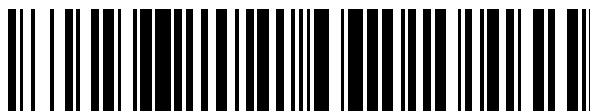


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2012 PCT/GB2012/000690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2012 E 12770178 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2751564**

54 Título: **Procedimientos para desencadenar la activación de sustancias encapsuladas generadoras de señal**

30 Prioridad:

30.08.2011 US 201113221600
24.11.2011 GB 201120357

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2017

73 Titular/es:

JUPITER DIAGNOSTICS HOLDING COMPANY LIMITED (100.0%)
10-14 Accommodation Road
London NW11 8ED, GB

72 Inventor/es:

CAMPBELL, NEIL J.;
MORAVICK, KEITH EDWARD;
PENNIMAN, JOSEPH D. y
RICHARDSON, BRUCE J.

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 629 929 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

Procedimientos para desencadenar la activación de sustancias encapsuladas generadoras de señal

5 La presente invención se refiere a bioensayos, por ej., para detectar contaminación bacteriana en alimentos, para detectar contaminantes biológicos en agua, o para detectar la presencia de sustancias como anticuerpos, antígenos y ácidos nucleicos en fluidos corporales como la sangre y sus componentes, fluidos nasofaríngeos, orina o saliva. El material que se desee detectar a menudo se denomina generalmente el objeto o analito.

10 En particular, en bioensayos que utilizan una sustancia que genera una señal encapsulada para indicar la presencia del objeto en una muestra (cualitativa) o para determinar la cantidad del objeto presente en una muestra (cuantitativa), la invención se refiere a procedimientos para controlar el inicio de la generación de la señal desde las cápsulas que contienen un material precursor de señal que es convertible desde un formato latente en el cual sustancialmente no se genera una señal a un formato en el cual puede generar una señal detectable.

15 Más particularmente, la invención se refiere al control de la liberación del material precursor de señal desde las cápsulas, y al control de esta conversión desde su formato latente al formato generador de señal. En la descripción siguiente, este proceso se denominará "desencadenar activación".

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los bioensayos se basan en la interacción de al menos una biomolécula etiquetada con un analito (objetivo) para ser detectado. La etiqueta actúa como un marcador indicando que se ha producido una reacción entre el objetivo y el receptor escogido deliberadamente o molécula de afinidad sobre la biomolécula que interactúa exclusivamente con el objetivo y se une a este. La etiqueta puede medirse usando diferentes técnicas:

25 (i) ópticamente mediante la medición de la absorción de una tintura o de la luz fluorescente emitida por fluoróforos, o la luz luminiscente emitida por compuestos luminiscentes o quimioluminiscente, o la medición de la turbidez causada por dispersión de la luz de partículas de látex aglutinadas;

30 (ii) radioactivamente mediante la medición de los isótopos de radio;

(iii) electroquímicamente mediante la medición de sustancias mediadoras o electroactivas;

35 (iv) magnéticamente mediante la medición de la fuerza magnética; o,

(v) piezoeléctricamente mediante la medición de los cambios en la masa.

40 Etiquetas bien conocidas incluyen enzimas como las usadas en los ensayos ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs) y los isótopos de radio usados en radioinmunoensayos; otros tipos de etiquetas incluyen fluoróforos, luminóforos, cromóforos, liposomas, partículas de látex en inmunoensayos de aglutinación, tinturas, mediadores y partículas de oro.

45 La presente invención se relaciona particularmente, aunque no exclusivamente, con las etiquetas que son detectables usando técnicas ópticas y con el control del inicio de la salida de señal máxima de forma que las lecturas puedan ser tomadas y, si se desea, repetidas, durante un periodo de tiempo antes de la salida de señal se deteriore o antes de que la señal se disipe mediante dilución y/o difusión.

50 El propósito de las cápsulas en la presente invención es doble: primero, sirven como vehículo o sustrato para las moléculas de afinidad o los receptores que están adheridos a la superficie de la cápsula que se seleccionan por su capacidad de reconocer específicamente y ligarse a una molécula objetivo en una muestra. Segundo, las cápsulas contienen muchas moléculas (10^7 a 10^9 más alto) del precursor de la señal.

55 Consecuentemente, tras ligar una molécula objetivo con una de las moléculas de afinidad en la superficie de la cápsula y tras la posterior conversión del precursor de la señal con la cápsula desde su formato latente a su formato de generación de señal, la presencia de una única molécula objetivo puede indicarse por muchas decenas de millones o incluso miles de millones de moléculas generadoras de señal detectable.

60 Esta es una técnica de amplificación muy potente que puede ampliar los límites de detección de los bioensayos.

Las cápsulas que contienen una sustancia orgánica generadora de señal para su uso en bioensayos son conocidas a partir de la patente internacional publicada, solicitud nº WO02/12888 A2, la descripción de la cual se incorpora en el presente como referencia en su totalidad. Estas cápsulas conocidas se preparan tratando una sustancia generadora de señal orgánica sólida y sin carga que tiene una baja solubilidad en agua o que es insoluble en agua (como el diacetato de fluoresceína (FDA)) con una solución acuosa de una sustancia anfifílica (por ejemplo, detergente iónico). La sustancia anfifílica se dispone sobre la superficie de la sustancia sólida generadora de señal,

impartiendo una carga eléctrica a su superficie y volviéndola susceptible para un revestimiento posterior con una capa de un polielectrolito cargado, seguida de múltiples capas alternativas de polielectrolitos opuestamente cargados.

5 Las capas de polímero se auto ensamblan sobre la sustancia sólida generadora de señal (con su carga inducida de la sustancia anfifílica) por medio de una deposición electrostática capa por capa, formando así un caparazón polimérico multicapa alrededor del núcleo sólido.

10 La etapa de revestimiento también puede realizarse usando una única capa de una sustancia portante de grupos funcionales para el acoplamiento covalente de la capa de revestimiento, no usando deposición electrostática.

15 Las cápsulas obtenidas de esta forma se modifican para su uso en un bioensayo al tener moléculas de afinidad adheridas a su superficie, las moléculas de afinidad seleccionadas según el tipo de molécula objetivo que se pretende detectar.

En una primera etapa de un procedimiento de detección usando las cápsulas descritas anteriormente, una solución de moléculas objetivos se incuba con cápsulas modificadas con moléculas de afinidad que reconocen específicamente las moléculas objetivo.

20 La incubación se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para obtener un complejo de moléculas afines al objetivo; la molécula de afinidad permanece ligada a la cápsula.

25 En una segunda etapa del procedimiento de detección, los complejos de cápsula de molécula afines al objetivo se separan de las cápsulas cuyas moléculas de afinidad no han formado complejos con las moléculas objetivo.

En una tercera etapa del procedimiento de detección, las cápsulas se desintegran para liberar la sustancia orgánica generadora de la señal en la solución, por ejemplo, tratándolas con un disolvente orgánico como un alcohol, una cetona, un éster, un éter, etc.

30 En la etapa final del procedimiento de detección, la señal que se genera por la sustancia orgánica generadora de señal liberada y disuelta se detecta y se mide. La señal detectada se relaciona con la cantidad de moléculas objetivo.

35 Sin embargo, una de las desventajas de este conocido procedimiento de detección es que la desintegración de las cápsulas y la generación de la señal por la sustancia orgánica generadora de señal es generalmente lenta y puede tardar diferentes cantidades de tiempo. Esto no es deseable porque, en una prueba de flujo lateral usando una membrana permeable líquida o una prueba usando canales de microfluidos, por ejemplo, las moléculas generadoras de señal se liberan a un flujo de disolvente que se está sometiendo a un flujo lateral. Por tanto, la liberación lenta de las moléculas generadoras de señal puede llevar a una señal detectable que es difusa porque ha sido dispersada por el flujo de disolvente.

RESUMEN DE LA INVENCION

45 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para controlar el inicio de la generación de la señal en un bioensayo, como se define en la reivindicación 1.

50 Se han descubierto procedimientos para controlar la liberación del precursor de la señal desde dentro de las cápsulas y para controlar la conversión del precursor de la señal desde su formato latente a su formato de generación de señal en un corto periodo de tiempo. Se consigue un máximo de señal en unos segundos, permitiendo tomar lecturas (y repetidamente si es necesario) mientras la señal está en su valor más alto, y antes de que la fuerza de la señal disminuya o la señal se disipe a mediante difusión o dilución.

55 Los procedimientos son aplicables para los precursores de señal que son convertibles por hidrólisis catalizada ácida o base, desde el formato latente al formato generador de señal.

60 La característica clave es someter las cápsulas (realmente, los complejos cápsula/molécula de afinidad/objetivo) a una solución de tratamiento que tiene un pH equilibrado que es demasiado alto para que se produzca una hidrólisis basada en ácido significativa o, en la alternativa, demasiado bajo para que se produzca una hidrólisis catalizada base significativa, y luego someter la solución de tratamiento a un golpe de calor para conseguir una temperatura de la solución de tratamiento en el rango de 45 °C a 65 °C. Esto acelera la cinética de la reacción, desencadenando la activación de la generación de señal: el precursor de señal está hidrolizado de su formato latente a su formato generador de señal y se vuelve detectable en la solución como una señal brillante. En algunas circunstancias, puede ser suficiente si la señal generada es detectada a simple vista. Por ejemplo, una señal fuerte que es detectable a simple vista puede ser suficiente para una prueba cualitativa para indicar que un objetivo o analito está presente en una muestra. En otras circunstancias, puede ser deseable detectar la cantidad de señal generada para una

determinación cuantitativa de la cantidad de objetivo o analito presente en una muestra. En este caso, la detección de la señal puede realizarse electrónicamente usando un dispositivo lector.

5 En un flujo lateral o prueba de microfluidos según la presente invención, la señal máxima se genera lo suficientemente rápido para que ningún efecto de difusión o disipación interfiera con la lectura de la señal. Además, la solución de tratamiento antes del calentamiento puede mantener las cápsulas en un formato estable durante un tiempo suficiente para que los reactantes y reactivos fluyan a lo largo de la membrana de la tira de prueba o los canales de microfluidos como está previsto antes de implementarse la etapa de activación de desencadenante.

10 Una realización de la presente invención mejora la cinética de la reacción, permitiendo obtener los resultados más rápidamente. La salida de señal es gestionable y controlable por el usuario. En una realización, la salida máxima de la señal se consigue casi inmediatamente. Esto significa que las lecturas pueden completarse casi inmediatamente, y pueden realizarse lecturas repetidas antes de que la salida de la señal comience a degradarse.

15 En una realización, la invención proporciona un procedimiento para desencadenar la generación de una generación de señal en un bioensayo usando cápsulas que contienen un precursor de señal que es hidrolizable desde un formato latente en el cual no se genera sustancialmente una señal a un formato en el cual se puede generar una señal detectable. El procedimiento comprende el tratamiento de las cápsulas con una solución de tratamiento cuyo pH y temperatura son tales que no se produce una hidrólisis significativa del precursor de señal, y luego calentar las
20 cápsulas en la solución de tratamiento para iniciar el comienzo de la hidrólisis del precursor de la señal al formato en el cual pueda generar una señal detectable.

En el pH y temperatura equilibrados, el precursor de señal es estable, pero se hidroliza cuando se calienta. Puede usarse vibración ultrasónica para efectuar el calentamiento, además de formas más tradicionales de calentamiento.

25 En otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para realizar un bioensayo como se define en las reivindicaciones 3 y 16.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 .
La Figura 1 es una representación esquemática de un procedimiento de detección por bioensayo según una realización de la presente invención para detectar una molécula objetivo (analito) usando moléculas precursoras de señal encapsuladas;

35 La Figura 2 es una representación esquemática del aparato experimental usado para investigar el desencadenamiento de la activación del precursor de la señal encapsulada bajo condiciones diferentes de pH y temperatura;

40 La Figura 3 es una ilustración esquemática de parte del aparato experimental representado en la Figura 2, mostrando el detalle del portatubo de muestra con temperatura controlada;

45 La Figura 4 es una ilustración esquemática de parte del aparato experimental representado en la Figura 2 mostrando el acoplamiento de una fuente de luz de excitación al portatubo de muestra con temperatura controlada y el acoplamiento de un detector de fotodiodos al portatubo;

La Figura 5 es un gráfico que muestra varias características de los datos experimentales de activación por calor por diacetato de fluoresceína (FDA) en cápsulas en una solución de tratamiento básica que tiene un pH de 10.1 (justo por debajo del valor requerido para la hidrólisis del FDA a fluoresceína);

50 Las Figuras 6 a 9 son gráficos adicionales que muestran los efectos de las diferentes temperaturas y los diferentes valores de pH sobre la activación del FDA a fluoresceína en soluciones de tratamiento básicas para cápsulas de un primer tipo;

55 Las Figuras 10 a 13 son gráficos adicionales que muestran los efectos de las diferentes temperaturas y los diferentes valores de pH sobre la activación del FDA a fluoresceína en soluciones de tratamiento básicas para cápsulas de un segundo tipo;

60 La Figura 14 es una vista esquemática en perspectiva de una tira de prueba y un dispositivo lector adaptado para recibir la tira de prueba.

La Figura 15 es una vista transversal esquemática de un lector mostrado en la Figura 14 tomada en línea 15'-15', y mostrando en perfil el lado de una tira de prueba insertada totalmente en el lector;

65 La Figura 16 es una vista de plano esquemática de una tira de prueba de flujo lateral alternativa;

La Figura 17 es una vista esquemática en perspectiva de la tira de prueba de flujo lateral alternativa de la Figura 16 y su aparato lector asociado;

5 La Figura 18 es una vista transversal esquemática de un lector mostrado en la Figura 17 tomada en línea 18'-18', y mostrando en perfil el lado de una tira de prueba insertada totalmente en el lector;

La Figura 19 es un diagrama que muestra una secuencia de etapas para un inmunoensayo alternativo usando cápsulas que contienen un precursor de señal;

10 La Figura 20 es un diagrama que muestra las partes de otro esquema alternativo para realizar un inmunoensayo usando cápsulas que contienen un precursor de señal;

15 La Figura 21 es un diagrama que muestra las partes de otro esquema alternativo para realizar un ensayo de hibridación usando cápsulas que contienen un precursor de señal, y

la Figura 22 es un diagrama que muestra las partes de otro esquema para realizar un ensayo de hibridación usando cápsulas que contienen un precursor de señal.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

En referencia a la Figura 1, esta muestra una representación esquemática de las etapas de un ejemplo de procedimiento de detección por bioensayo según una realización de la presente invención, usando cápsulas etiquetadas para ligarse con una molécula objetivo o analito, las cápsulas conteniendo un precursor de señal que es convertible a un formato de generación de señal que se libera de las cápsulas.

25 **Etapa 1 - Formación de complejos entre moléculas objetivo y moléculas de afinidad sobre la superficie de la cápsula**

30 En la primera etapa, una muestra de prueba que se sospecha que contiene el analito 10 se mezcla en solución con las cápsulas 20 que contienen un material precursor de señal 30. Las paredes de las cápsulas pueden, por ejemplo, estar formadas de lípidos con cabezas hidrofóbicas 21 y colas hidrofílicas 22.

35 Las cápsulas tienen moléculas de afinidad 40 en su superficie que se eligen por su capacidad de interactuar específicamente con el analito y de ligarse a él. El analito, si está presente, se ligará a las cápsulas mediante la intermediación de moléculas de afinidad para formar complejos 50.

40 **Etapa 2 - Inmovilización de los complejos**

45 En la segunda etapa, los complejos 50 se inmovilizan sobre un sustrato 60 que tiene moléculas de captura 70 adheridas a su superficie. Las moléculas de captura 70 también se eligen por su capacidad de ligarse específicamente con el analito 10, de forma que las cápsulas que no se han ligado con el analito no interactuarán con las moléculas de captura 70 y no se inmovilizarán. Los complejos inmovilizados forman un "sándwich" en el punto de inmovilización, comprendiendo la molécula de captura 70 inmovilizada, el analito 10, y una molécula de afinidad 40 (que permanece adherida a la cápsula 20).

50 **Etapa 3 - Conversión del precursor de señal a formato generador de señal - desencadenar activación**

55 En la tercera etapa, los complejos inmovilizados se tratan en una solución de tratamiento para convertir el precursor de señal 30 a su formato generador de señal en el cual las moléculas generadoras de señal 80 individuales se liberan de las cápsulas a la solución para la detección por medios de detección de señal (no mostrados).

60 Esta tercera etapa se realiza tratando los complejos inmovilizados a una etapa de calentamiento en una solución con pH equilibrado. Una solución de pH equilibrada es una en la cual el pH es ligeramente demasiado alto para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por ácido a su formato de generación de señal, o una en la cual el pH es ligeramente demasiado bajo para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por base a su formato generador de señal. Las cápsulas están estables en la solución de tratamiento con pH equilibrado y el precursor de señal contenido en las cápsulas no se somete a ninguna cantidad de hidrólisis apreciable. Sin embargo, cuando se aplica calor adicional, la cinética de la reacción se altera y la hidrólisis del precursor de señal se produce para convertirlo a su formato de generación de señal.

65 En una realización alternativa de la presente invención, donde se requiere poco intervalo o nada entre la adición de la solución de tratamiento a los complejos inmovilizados y el inicio de la hidrólisis (desencadenante de la activación), una solución de tratamiento fuertemente ácida o fuertemente básica puede usarse y no es necesario realizar la etapa de calentamiento.

Determinación experimental de desencadenante de activación del precursor de señal encapsulado bajo diferentes condiciones de pH y temperatura.

5 Consultando ahora las Figuras 2 a 5, la configuración experimental se describirá como utilizada para evaluar el desencadenamiento de la activación para el precursor de señal encapsulado bajo diferentes condiciones de pH y temperatura.

10 La Figura 2 es una ilustración esquemática de la configuración experimental general, que comprende un ordenador 201 para controlar los experimentos, una tarjeta de adquisición de datos 202, una fuente de luz de excitación 203 que alimenta la luz de excitación mediante fibra óptica 209 a una muestra que va a ser probada contenida en un tubo de muestras 205 colocado en un portatubo 204 con temperatura controlada. Un controlador de temperatura 206, bajo el control del ordenador 201, regula la temperatura del portatubo 204. Una segunda fibra óptica 209 alimenta la luz emitida al detector 207 y un medidor de potencia óptica 208 convierte la luz emitida detectada a una lectura numérica que es retroalimentada al ordenador 201.

15 La Figura 3 es una ilustración esquemática que muestra el detalle del portatubo de muestra 204 controlado por temperatura.

20 El portatubo comprende un bloqueo térmico 301 en el cual el tubo de muestra 205 es insertable, y un bloque aislante 302. En la parte trasera del bloque térmico 301 hay un dispositivo Peltier 303 usado para calentar la muestra en el tubo 205.

25 El bloque térmico 301 transfiere el calor del dispositivo Peltier 303 a la muestra en el tubo 205; el bloque aislante 302 aísla el sistema, evitando que el calor escape del montaje y evitando que el aire ambiental del exterior añada o elimine calor. El dispositivo Peltier 303 está montado sobre una placa fría 304 que tiene aletas de refrigeración 305. El enfriamiento forzado puede proporcionarse por medio de un ventilador 306. El montaje del portatubo con temperatura controlada se monta sobre un soporte disipador térmico 307.

30 Consultando ahora la Figura 4, se describirá la configuración óptica. El portatubo con temperatura controlada 204 está equipado con dos fibras ópticas 209 que están sustancialmente en ángulo recto la una de la otra y en una orientación de plano casi perpendicular al eje largo del tubo 205 cuando está posicionado en el portatubo. Una de las fibras ópticas 209 está conectada a una fuente de luz filtrada 401 que puede ser, por ejemplo, un LED. La luz de la fuente 401 pasa a través de una lente colimadora 402, luego a través de un filtro de excitación 403 que filtra las longitudes de onda que no contribuyen a la excitación de las moléculas generadoras de señal cuya activación debe desencadenarse, y a través de una lente de acoplamiento 404 a la fibra óptica 209. La segunda fibra óptica es para transmitir la luz emitida desde el tubo de muestra 205 a un medidor de potencia óptico de alta sensibilidad filtrado ópticamente (208, véase la Figura 2) para medir la cantidad de luz emitida desde las moléculas de excitación en el tubo de muestra. La luz de esta segunda fibra óptica 209 pasa a través de una lente colimadora 405, luego a través de un filtro de emisiones 406 que filtra las longitudes de onda de emisión no deseadas, y luego a través de lentes de enfoque 407 al fotodiodo 408. Tanto el filtro de excitación 403 como el filtro de emisión 406 son filtros pasa banda de 10 nm de anchura.

Las siguientes partes se utilizaron para construir el aparato experimental:

- 45 Controlador de temperatura - calentamiento de tubo y solución (TE Tech, modelo: TC-36-25-RS232) Suministro eléctrico CC 24 V (Mean Well, modelo: SP 320-24)
 Dispositivo de adquisición de datos (Measurement Computing, modelo: USB-1280FS)
 Controlador LED de alta potencia (Luminus, modelo: DK-114N-3)
 Cabezal detector (Newport Corp., modelo: 918D)
 50 Fibras ópticas (recubiertas de PVC, 1000um núcleo, NA=.50)
 Módulo Peltier (TE Tech, modelo: TE 63-1.0-1.3)
 Red de resistores para ajustar la tensión al dispositivo Peltier Cabezal LED conectado con fibra (personalizado para maximizar la conexión)
 Portatubo con temperatura controlada:
 55 A. Bloque adaptador de fibra (personalizado para maximizar el aislamiento)
 B. Bloque de tubo térmico (personalizado para maximizar la masa térmica)
 C. Montaje de intercambio térmico (placa fría, aletas, ventilador)
 60 Cubierta opaca

El aparato se cubrió con la cubierta opaca (no mostrada) cuando se realizaron los experimentos.

65 Como se ha descrito anteriormente, el portatubo con temperatura controlada 204, la fuente de luz de excitación 203, y el medidor de potencia óptico 208 están conectados al ordenador 201 que controla cuándo se aplica el calor, cuándo la luz de excitación está encendida y cuándo el medidor de potencia óptico recoge datos de emisión.

Al comienzo de cada experimento, un volumen conocido de una solución de activación con pH ajustado se colocó en un tubo de microcentrifugación como el tubo de muestra 205 que se colocó a su vez en un portatubo con temperatura controlada 204. El ordenador recogió un flujo continuo de datos de emisiones del tubo que contenía solo la solución de activación. Esto proporcionó una referencia para las circunstancias donde no haya presente un precursor de señal ni moléculas generadoras de señal.

Cuando se estableció una referencia estable, una cantidad conocida de una solución de cápsulas que contenían diacetato de fluoresceína (FDA) como el precursor de señal fue dispensado en el tubo 205, que contenía la solución de activación con temperatura controlada. La solución de las cápsulas estaba a la misma temperatura que la solución de activación en el tubo de muestra 205 en el portatubo 204. El diacetato de fluoresceína es no-fluorescente, pero hidrolizable en fluoresceína que fluoresce intensamente cuando se somete a excitación.

El ordenador 201 luego comienza un ciclo de tomar una lectura "oscura" de la luz emitida sin excitación, luego encendiendo la luz de excitación y tomando una lectura de la fluorescencia excitada. Los datos registrados contenían tres piezas de información: número de ciclo, lectura oscura, y lectura con excitación fluorescente.

Cada ciclo fue de 1 segundo de duración. Cada lectura consistió en un promedio de 1000 muestras individuales del incidente de luz recogido en el fotodiodo 408 del medidor de potencia óptico 208. Este ciclo continuó durante el experimento de calentamiento. Tras cierto número de ciclos (representando un retraso de tiempo deseado), y sin romper el ciclo, el ordenador 201 encendió el calentador Peltier 303 que elevó la temperatura del volumen de reacción a su punto establecido elevado en segundos. Una vez que se hubo encendido el calentador y la temperatura se elevó al nivel deseado, la temperatura se mantuvo constante durante el resto del experimento. Los datos se registraron continuamente durante todo el experimento.

Cuando las cápsulas fueron introducidas en la solución de activación, se produjo cierta hidrólisis y se inició un proceso de auto-luminiscencia y auto-extinción. La referencia de la salida de luz desde la solución aumentó, y corriente del detector subió desde aproximadamente 10^{-11} amperios a 10^{-9} amperios y luego se quedó bastante constante hasta que se aplicó calor.

Durante la fase "semi-estable"/"retraso de tiempo" del experimento, las lecturas de la luz detectada durante la excitación siempre fueron más altas que los niveles de luz de lectura oscura registrados al mismo tiempo. Esta diferencia se atribuyó a dos causas:

(i) Una pequeña cantidad de luz de excitación pasa a través del filtro de emisiones 406. Esto sucede cuando parte de la luz de excitación se acopla en la fibra de recogida de emisiones 209. A pesar de tener tres decenas (10^3) de rechazo de luz fuera de la pasabanda del filtro de emisiones, se detectó esta luz de excitación.

(ii) Cuando se excitaba, parte de la fluoresceína liberada durante el evento de hidrólisis inicial fluoresce más allá de la capacidad de la solución para auto-extinguirse. Esta fluorescencia se detectó.

Independientemente de qué lectura se utilizó (excitada o no excitada), hay una correlación directa entre la cantidad de fluorescente en la solución, y la cantidad de luz detectada a través del filtro de emisiones. Es un fenómeno bien conocido que la fluoresceína se auto-extingue, es decir absorbe su propia fluorescencia debido a su amplia banda de excitación. El descenso de la luz detectada una vez que se aplicó el calor muestra que, cuando la concentración de fluoresceína aumenta, la capacidad de la solución para auto-extinguirse también aumenta. Esto se explicará con más detalle a continuación con referencia a la Figura 5.

Características de los datos experimentales de activación del calor

La Figura 5 es un gráfico que muestra trazas típicas de salida de luz de las cápsulas formadas a partir del lípido DSPEPEG2000 Amina y el dodecilsulfato sódico (SDS) y conteniendo FDA como precursor de señal. Las cápsulas se colocaron en una solución de activación con un pH de 10.1, que está justo por debajo del valor de pH en el cual el FDA en este tipo de cápsula se someterá a hidrólisis a fluoresceína sin calor adicional. En la siguiente descripción, el comportamiento en los puntos A a G se explicará.

A. En tiempo cero, las cápsulas se añadieron a una solución de activación a temperatura ambiente con pH 10.1. En segundos, una cantidad de fluoresceína fue liberada a la solución.

B. En la curva de excitación 5e, un rápido aumento de fluoresceína en la solución durante los primeros 30 segundos produjo un impulso en la fluorescencia detectada que estaba activamente extinguida por las moléculas de fluoresceína adyacentes infraexcitadas.

C. En la curva de no excitación 5n, un aumento simultáneo en la auto-extinción redujo la auto-luminiscencia detectable. La salida luminosa total detectable de la solución se dirigió a un equilibrio semi-estable. A lo largo del tiempo esta referencia aumenta incluso sin la adición de calor.

D. En la curva de excitación 5e, el valor de referencia registrado durante las lecturas excitadas es siempre fraccionalmente mayor que las lecturas tomadas sin luz de excitación. Sin desear estar sujeto a la teoría, se piensa que esto se debe en parte a dos factores:

- (A) Fuga de luz de excitación detectable a través del filtro de emisión
- (B) Una pequeña cantidad de emisiones fluorescentes estimuladas.

E. En la curva de no excitación 5n, este es el valor de referencia de la auto-luminiscencia detectable que no está auto-extinguida.

F. En la curva de excitación 5e, existe un aumento detectable en la salida de luminiscencia debido a la hidrólisis del FDA en las cápsulas tras la aplicación de calor para aumentar la temperatura a 65 °C (Luz total = Fluorescencia estimulada + Auto-luminiscencia -Auto-extinción).

G- En la curva de no excitación 5n, existe un aumento detectable en la auto-extinción de la auto-luminiscencia debido a un rápido aumento de la concentración de fluoresceína en la solución. (Luz total = Auto-luminiscencia-Auto-extinción).

Desencadenante de activación bajo condiciones diferentes

Consultando ahora las Figuras 6 a 9, estas son una serie de gráficos que muestran el comportamiento de las cápsulas que contienen FDA formadas con DSPE-PEG2000 Amina y dodecilsulfato sódico (SDS), como se utiliza en la evaluación de la Figura 5 descrita anteriormente.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la salida de luz desde las cápsulas en una solución de tratamiento con un valor de pH bajo de 9.5 al cual se aplicó calor tras 250 segundos *para* aumentar la temperatura de la solución de tratamiento de temperatura ambiente (23 °C) a 45 °C. No se produjo activación; la curva de excitación 6e y la curva de no excitación 6n continúan sus caminos sustancialmente paralelos tras la aplicación de calor. Las cápsulas están estables a 45 °C a un pH de 9.5.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la salida de luz desde las cápsulas en una solución de tratamiento con un valor de pH alto de 11.0. Como antes, la temperatura de la solución se aumentó desde temperatura ambiente (23 °C) a 45 °C tras 250 segundos, pero el pH alto causa el inicio de la activación casi de inmediato tras la adición de las cápsulas a la solución y antes de la etapa de calentamiento. La curva de excitación 7e y la curva de no excitación 7n se separan ampliamente tras unos 25 segundos.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la salida de luz de las cápsulas en una solución de tratamiento equilibrada con un valor de pH de 10.1 a la cual se aplicó calor tras 300 segundos para elevar la temperatura de la solución de tratamiento desde temperatura ambiente (23 °C) a 65 °C. Tras el calentamiento se produjo una fuerte activación. La curva de excitación 8e y la curva de no excitación 8n están bastante cerca la una de la otra durante el periodo de tiempo de 50 segundos a 300 segundos tras la adición de las cápsulas a la solución de tratamiento. Esto demuestra que las cápsulas son estables bajo estas condiciones de pH a temperatura ambiente, pero que la activación puede desencadenarse por calor.

La Figura 9 es otro gráfico que muestra la salida de luz desde las cápsulas en una solución de tratamiento con un valor de pH alto; en este experimento, el PH era de 12.5. Tras 250 segundos, la temperatura de la solución se aumentó desde temperatura ambiente (23 °C) a 65 °C, pero el pH alto causa el inicio de la activación casi de inmediato tras la adición de las cápsulas a la solución y antes de la etapa de calentamiento. La curva de excitación 9e y la curva de no excitación 9n están ampliamente separadas tras unos 25 segundos, aunque un ligero aumento en la salida de fluorescente puede verse en la curva de excitación 9e tras elevar la temperatura en los 250 segundos, este no es un aumento significativo.

Este experimento demostró que un pH alto puede usarse por sí mismo para desencadenar la activación sin retardo.

Esto puede ser útil en circunstancias donde se desee una activación inmediata, y no se necesita un periodo de equilibrio estable antes de desencadenar la activación.

Consultando ahora las Figuras 10 a 13, estas son una serie de gráficos que muestran el comportamiento de un tipo diferente de cápsulas que contienen FDA bajo un pH y condiciones de temperatura especificados. Este lote de cápsulas que contienen FDA fue preparado usando una deposición capa por capa de polielectrolitos como se describe en la solicitud de patente internacional publicada n° WO02/12888 A2.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la salida de luz de las cápsulas en una solución de tratamiento con un valor de pH bajo de 10.5 a la cual se aplicó calor tras 250 segundos para elevar la temperatura de la solución de tratamiento desde temperatura ambiente (23 °C) a 45 °C. No se produjo la activación; la curva de excitación 10e y la

curva de no excitación 10n continuaron su camino de forma sustancialmente paralela tras la aplicación de calor. Estas cápsulas están estables a 45 °C a un pH de 10.5.

5 La Figura 11 es un gráfico que muestra la salida de luz de las cápsulas en una solución de tratamiento equilibrada con un valor de pH de 11 a la cual se aplicó calor tras 300 segundos para elevar la temperatura de la solución de tratamiento desde temperatura ambiente (23 °C) a 45 °C. Tras el calentamiento se produjo una fuerte activación. La curva de excitación 11e y la curva de no excitación 11n están bastante cerca la una de la otra durante el periodo de tiempo de 75 segundos a 300 segundos tras la adición de las cápsulas a la solución de tratamiento.

10 Esto demuestra que las cápsulas son estables bajo estas condiciones de pH a temperatura ambiente, pero que la activación puede desencadenarse rápidamente solo por calor moderado.

15 La Figura 12 es un gráfico similar al de la Figura 10 que muestra la salida de luz de las cápsulas en una solución de tratamiento con un valor de pH aún más bajo de 10.0 a la cual se aplicó más calor tras 250 segundos para elevar la temperatura de la solución de tratamiento desde temperatura ambiente (23 °C) a 65 °C. De nuevo, no se produjo activación;

20 la curva de excitación 12e y la curva de no excitación 12n permanecen cercanas la una a la otra y continúan sus caminos sustancialmente paralelos tras la aplicación del calor. Estas cápsulas están estables a un pH de 10.0 incluso a 65 °C.

25 La Figura 13 es un gráfico similar al de la Figura 11 que muestra la salida de luz de las cápsulas en una solución de tratamiento equilibrada con un valor de pH de 11 a la cual se aplicó calor tras 250 segundos para elevar la temperatura de la solución de tratamiento desde temperatura ambiente (23 °C) a 45 °C. Se produjo una fuerte activación tras el calentamiento. La curva de excitación 13e y la curva de no excitación 13n están bastante cerca la una de la otra durante el periodo de tiempo de 75 segundos a 250 segundos tras la adición de las cápsulas a la solución de tratamiento. Esto demuestra que las cápsulas son estables bajo estas condiciones de pH a temperatura ambiente, pero que la activación puede desencadenarse rápidamente por calor.

30 Este experimento también demuestra que el desencadenamiento de la activación está causado por el aumento de la temperatura.

35 El calor se aplicó 50 segundos antes en este experimento que en el caso de la Figura 11 y la activación se produjo 50 segundos antes, correspondientemente. Por tanto, el inicio de la activación es atribuible al aumento de temperatura y no a la duración de la incubación en la solución con pH equilibrado.

Determinación del pH equilibrado de las soluciones de activación

40 A partir de los experimentos anteriores que investigan el desencadenamiento de la activación del precursor de señal encapsulado bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, los autores de la invención notaron que para los diferentes tipos de cápsulas era necesario ajustar el pH a un valor diferente para conseguir el equilibrio deseado.

45 Esto es de esperar porque los diferentes tipos de cápsulas tendrán diferentes permeabilidades a la solución de activación, diferentes tamaños de poros, diferentes grosores de la pared, etc. Estos son todos los factores que pueden afectar la tasa de hidrólisis del precursor de señal contenido dentro de las cápsulas.

Además, cambiar el precursor de señal probablemente significará que la hidrólisis se produce a un pH diferente.

50 Por tanto, para cada combinación de tipo de cápsula y tipo de precursor de señal, el pH equilibrado debe determinarse.

Esto se hace fácilmente mediante un experimento:

55 Para cualquier combinación seleccionada de tipo de cápsula y tipo de precursor de señal, una serie de soluciones a temperatura ambiente con pH diferente se prepara y una porción de cápsulas se añade luego a cada solución. Las soluciones se irradian con luz de excitación y, si se detecta una señal intensa, la solución se anota como que cae fuera del rango de pH equilibrado. Si no se detecta ninguna señal, la solución se calienta entre 45 °C y 65 °C y de nuevo se irradia con luz de excitación. Las soluciones calentadas que emiten una señal intensa se anotan como que cae dentro del rango de pH equilibrado. Las soluciones calentadas que siguen sin emitir una señal se anotan como que caen fuera del rango de pH equilibrado.

60 Si es necesario, puede realizarse un ajuste preparando una serie de soluciones con pequeños cambios incrementales al pH dentro del rango de pH que ha sido anotado como el rango de pH crítico a partir de la primera ronda de experimentos descrita anteriormente.

65 En resumen, el pH equilibrado puede determinarse:

(a) añadiendo una parte de cápsulas que contienen el precursor de señal a una serie de soluciones a temperatura ambiente y con diferentes pH;

5 (b) irradiando la serie de soluciones a temperatura ambiente con luz de excitación;

(c) rechazando las soluciones que emiten una señal intensa a temperatura ambiente;

10 (d) calentando las soluciones que no emiten sustancialmente una señal a temperatura ambiente;

(e) rechazando las soluciones que no emiten sustancialmente una señal tras el calentamiento, y

15 (f) anotando el valor de pH de la solución o soluciones que emiten una señal intensa tras el calentamiento como que definen el pH equilibrado.

Preferiblemente, la activación o solución de tratamiento se regula para mantener su pH cuando se mezcla con otras soluciones en un sistema de ensayo.

20 Preferiblemente el pH de la activación o solución de tratamiento con pH equilibrado es demasiado alto en un 0.5 para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por ácido significativa a su formato generador de señal, o demasiado bajo en un 0.5 para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por base significativa a su formato generador de señal. Más preferiblemente el pH de la activación o solución de tratamiento es demasiado alto en un 0.2 para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por ácido significativa a su formato generador de señal, o demasiado bajo en un 0.2 para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por base significativa a su formato generador de señal. Aún más preferiblemente, el pH de la activación o solución de tratamiento es demasiado alto en un

25 0.1 para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por ácido significativa a su formato generador de señal, o demasiado bajo en un 0.1 para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por ácido significativa a su formato generador de señal.

Rango de temperatura para la etapa de calentamiento

35 Un rango de temperatura de 40 °C a 70 °C, preferiblemente de 45 °C a 65 °C es el rango de temperatura al cual deberían elevarse las soluciones de prueba. Se ha seleccionado 40 °C como la temperatura "elevada" más baja a usar porque, en la mayoría de las ubicaciones geográficas, esto está bien por encima de la temperatura ambiente predominante y puede por tanto distinguirse de una condición sin calentar. Por debajo de los 40 °C, la activación completa puede tardar demasiado tiempo, lo que provoca el problema de la disipación de señal que la presente invención pretende resolver. El límite superior de 70 °C fue elegido porque está caliente, pero no peligrosamente

40 caliente al tocarlo con la mano. Una temperatura aún más alta puede causar una inestabilidad no deseada en el sistema químico. Además, los creadores de la invención consideraron que no sería práctico para un simple dispositivo lector portátil calentarse tanto.

45 En el rango de temperatura preferido de 45 °C a 65 °C, es posible conseguir una medición de control sobre el retardo de tiempo antes de que se detecte el máximo de señal.

Ejemplo de aparato para poner en práctica la invención

50 Consultando las Figuras 14 y 15, se muestra un ejemplo de un aparato para realizar una prueba de flujo lateral.

La Figura 14 es una vista esquemática en perspectiva de una tira de prueba de flujo lateral 1410 y un dispositivo lector 1401 que se adapta para recibir la tira de prueba 1410 y procesarla como se describirá con más detalle a continuación.

El lector 1401 comprende una carcasa 1402. En un extremo, la carcasa tiene una ranura 1403 a través de la cual la tira de prueba 1410 es insertable como indica la flecha 1418.

60 La ranura lleva a una bandeja 1404 proporcionada en el espacio interior de la carcasa 1402, la bandeja sirve como guía para la tira de prueba 1410 cuando se inserta en el lector. Posicionado debajo de la bandeja está el dispositivo de calentamiento 1406 y sobre la bandeja, en registro con la posición del dispositivo de calentamiento 1406, está el sistema óptico 1407 para iluminar una tira de prueba insertada con luz de excitación y para recibir y procesar la luz emitida. La superficie superior de la carcasa 1402 tiene una abertura o ventana de observación 1408 a través de la cual puede verse la lectura del sistema óptico 1407.

65

La bandeja 1404 tiene una esquina biselada 1405.

La tira de prueba 1410 comprende un sustrato de soporte 1411 alargado impermeable que puede estar conformado por una resina termoplástica como cloruro polivinílico, polipropileno o similar, sobre el cual se monta una membrana porosa 1412 hecha de un material altamente absorbente como la nitrocelulosa o la fibra de vidrio capaz de transportar una solución acuosa mediante acción capilar, empapado o simple humectación.

La tira de prueba 1410 tiene una esquina de corte 1413 que está configurada para corresponderse con la esquina biselada 1405 de la bandeja 1404 en el lector 1401. Esta característica tiene la intención de impedir que el usuario inserte la tira de prueba 1410 en el lector 1401 de forma incorrecta porque la tira de prueba 1410 solo puede insertarse completamente si la tira de prueba está orientada de tal forma que su esquina de corte 1413 coopere con la esquina biselada 1405 de la bandeja 1404.

En el extremo que tiene la esquina de corte 1413, la tira de prueba tiene una almohadilla empapadora 1414 que sirve como depósito para acumular fluidos a medida que pasan a lo largo de la ruta de flujo definida por la membrana porosa 1412 en la dirección de izquierda a derecha como se muestra en el dibujo. La almohadilla empapadora 1414 puede ser, por ejemplo, un material sorbente o supersorbente comprendiendo sales de poliacrilato entrelazadas que son capaces de absorber muchas veces su propio peso en agua. En o cerca del otro extremo de la tira de prueba 1410, hay una zona de aplicación de muestras 1415 sobre la membrana porosa 1412 donde se aplica una muestra sospechosa de contener un analito de interés. La zona de aplicación de muestras 1415 está precargada con cápsulas que contienen un material precursor de señal, las cápsulas teniendo en su superficie moléculas de afinidad para el ligado específico al analito que se pretende detectar.

Entre la zona de aplicación de muestras 1415 y la almohadilla empapadora 1414 está la zona de prueba 1416 donde las moléculas de captura se inmovilizan, las moléculas de captura teniendo también la capacidad de ligarse específicamente al analito que se pretende detectar. Las moléculas de captura pueden inmovilizarse en la zona de prueba 1416 usando adsorción, absorción o conexión iónica o covalente según los procedimientos que son bien conocidos en la técnica.

Hacia abajo de la zona de prueba 1416 hay una zona de control 1417 que incluye moléculas de captura no específicas, es decir, moléculas de captura que no se ligan específicamente con el analito pero que son capaces de ligarse a las cápsulas libres que fluyen más allá de la zona de prueba 1416. La zona de control no es esencial, pero sirve para confirmar que la prueba se ha realizado correctamente, por ejemplo, indicando que la tira de prueba se ha humedecido correctamente y que el flujo de soluciones ha pasado a lo largo de la tira de prueba desde la zona de aplicación de muestras 1415 y a través de la zona de prueba 1416.

Aunque el dibujo muestra la zona de prueba 1416 y la zona de control 1417 como dispuestas en serie a lo largo de la ruta de flujo, las zonas de prueba y control pueden estar dispuestas alternativamente una al lado de la otra en otras relaciones especiales.

La alta absorción de la almohadilla empapadora 1414 promueve el flujo de líquido a lo largo de la tira de prueba y asegura que las soluciones pasan a través de la zona de prueba 1416.

La Figura 15 es una vista esquemática transversal del lector 1401 tomada en línea 15'-15' en la Figura 14 pero mostrando en perfil el lado de una tira de prueba 1410 insertada completamente en la bandeja 1404 a través de la ranura 1403. La tira de prueba 1410 se muestra ligeramente elevada de la superficie superior de la bandeja 1404 para mayor claridad.

Como puede verse claramente desde esta vista lateral, la zona de prueba 1416 y la zona de control 1417 de la tira de prueba completamente insertada 1410 sobreyacen sobre el dispositivo de calentamiento 1406 y están dispuestas directamente por debajo del sistema óptico 1407.

El uso del aparato ilustrado en las Figuras 14 y 15 se describirá a continuación.

Primero, una solución de una muestra de prueba que se sospeche que contiene un analito a ser detectado se aplica a la zona de aplicación de muestras 1415 de la tira de prueba 1410. Las cápsulas que han sido precargadas en la tira de prueba en la zona de aplicación de la muestra son asumidas en la solución de prueba aplicada e interactúan con cualquier analito presente mediante la intermediación de las moléculas de afinidad sobre la superficie de la cápsula. Como se ha indicado previamente, las moléculas de afinidad se ligan específicamente con el analito.

La solución fluye a lo largo de la membrana 1412 en la dirección de izquierda a derecha como se muestra en los dibujos, atraída por la acción de la almohadilla empapadora 1414. Arrastrados en la solución están los complejos formados entre las moléculas del analito y las moléculas de afinidad adheridas a las cápsulas, y las cápsulas libres que no tienen analitos ligados a ellas.

A medida que pasan las moléculas de captura inmovilizadas sobre la membrana en la zona de prueba 1416, los

complejos se eliminan de la solución mediante la interacción entre el analito y las moléculas de captura. Las cápsulas libres que no tienen analitos ligados a ellas continúan en el flujo de la solución, pasada la zona de prueba y a través de la zona de control.

5 Una solución de lavado regulada puede aplicarse al flujo ascendente de la membrana de la zona de prueba 1416 para asegurar que las cápsulas libres que no tienen analitos ligados a ellas se laven más allá de la zona de prueba.

Cuando la zona de control 1417 muestra que la prueba se ha realizado correctamente, una solución de tratamiento con pH equilibrado se aplica a la membrana 1412 ascendente de la zona de prueba.

10 La solución de tratamiento con pH equilibrado puede aplicarse a la membrana 1412 antes de insertar la tira de prueba 1410 en el lector 1401. Alternativamente, la solución de tratamiento con pH equilibrado puede añadirse tras insertar la tira de prueba 1410 en el lector 1401, en cuyo caso se aplica a la porción de la membrana 1412 que sobresale fuera del lector 1401 (véase la Figura 15).

15 Sin importar el orden en el cual la tira de prueba 1410 se inserte en el lector 1401 y la solución de tratamiento con pH equilibrado se aplique a la membrana 1412, se permite un tiempo suficiente para que la solución de tratamiento con pH equilibrado fluya a la zona de prueba 1416 antes de accionarse el dispositivo de calentamiento 1406 para causar un aumento de temperatura del volumen de la solución de tratamiento por encima de la ubicación del dispositivo de calentamiento. Ya que solo participan pequeños volúmenes de la solución en dichas pruebas, el aumento de temperatura de la solución de tratamiento a un valor nominal elevado es muy rápido.

20 El desencadenamiento de la activación del precursor de señal en las cápsulas se produce en unos segundos o fracciones de un segundo de la etapa de calentamiento y las moléculas generadoras de señal individuales se liberan de las cápsulas.

A continuación, se acciona el sistema óptico 1407. La luz de excitación, por ejemplo, de un LED, se dirige sobre la zona de prueba para causar que las moléculas generadoras de señal fluorescan y se detecta la fluorescencia emitida. Una lectura de la fluorescencia detectada es visible a través de la ventana de observación 1408.

30 Como se ha indicado anteriormente, solo participan pequeños volúmenes de fluido, de forma que el dispositivo 1406 no necesita ser muy potente. Igualmente, el sistema óptico 1407 no tiene una gran demanda de energía, así que el lector 1401 puede auto suficiente incluyendo una batería (no mostrada) dentro de la carcasa 1402 para alimentar el dispositivo de calentamiento 1406 y el sistema óptico 1407. Alternativamente, el lector puede alimentarse externamente.

Ejemplos de aparato alternativo

40 En el ejemplo descrito anteriormente, la tira de prueba 1410 se precargó con cápsulas que contenían el material precursor de señal y que tenían en su superficie moléculas de afinidad para el ligado específico con el analito. Por supuesto, es posible en vez de eso añadir las cápsulas a la muestra de la solución de prueba antes de la aplicación de la solución de prueba a la zona de aplicación de la muestra 1415.

45 Consultando las Figuras 16 a 18, se muestra una forma alternativa de aparato para realizar una prueba de flujo lateral donde la tira de prueba incorpora las soluciones que se utilizan en la prueba en depósitos desgarrables y donde el lector tiene actuadores para desgarrar los depósitos para liberar las soluciones.

50 La Figura 16 es una vista de plano esquemática de una tira de prueba 1610 que comprende un sustrato de barrera impermeable a los fluidos 1611 que puede estar hecho de una resina termoplástica como cloruro polivinílico, polipropileno o similar. Una tira estrecha de membrana porosa 1612 formada por un material muy absorbente como la nitrocelulosa o la fibra de vidrio se monta sobre el sustrato 1611. La membrana porosa 1612 define una ruta fluida para transportar soluciones acuosas mediante acción capilar, empapado o simple humectación.

55 En el extremo derecho como se muestra en el dibujo, la tira de prueba tiene una almohadilla empapadora 1614 que sirve como depósito para acumular fluidos a medida que pasan a lo largo de la ruta de flujo definida por la membrana porosa 1612 en la dirección de izquierda a derecha como se muestra en el dibujo. La almohadilla empapadora 1614 puede ser, por ejemplo, un material sorbente o supersorbente capaz de absorber muchas veces su propio peso en agua.

60 En el otro extremo de la tira de prueba 1610 hay un depósito de solución portadora regulada desgarrable 1610 con una línea de alimentación 1621 en su borde derecho. Justamente en línea descendente de la línea de alimentación 1621 hay una zona de aplicación de muestras 1615 en comunicación fluida con la membrana porosa 1612 para recibir una muestra que se sospeche que contenga un analito de interés. La zona de aplicación de muestras 1615 está precargada con cápsulas que contienen un material precursor de señal; las cápsulas teniendo en su superficie moléculas de afinidad para el ligado específico al analito que se pretende detectar.

65

En línea descendente desde la zona de aplicación de muestras 1615 hay una segunda línea de alimentación 1623 conectando la membrana porosa 1612 a un depósito de agente bloqueador 235 desgarrable. Más hacia abajo hay una tercera línea de alimentación 1625 conectando la membrana porosa 1612 a un depósito de solución de activación 1624 desgarrable.

Entre tercera línea de alimentación 1625 y la almohadilla empapadora 1614 está la zona de prueba 1616 donde las moléculas de captura se inmovilizan, las moléculas de captura teniendo también la capacidad de ligarse específicamente al analito que se pretende detectar. Las moléculas de captura pueden inmovilizarse en la zona de prueba 1616 usando adsorción, absorción o conexión iónica o covalente según los procedimientos que son bien conocidos.

Consultando ahora la Figura 17, aquí la tira de prueba 1610 se muestra en vista esquemática en perspectiva lista para insertarse en el aparato lector 1601, también mostrado en la vista esquemática en perspectiva. El lector 1601 comprende una carcasa 1602 con una ranura 1603 a su izquierda como se muestra en el dibujo para recibir la tira de prueba 1610. La ranura lleva a una bandeja 1604 proporcionada en el espacio interior de la carcasa 1602 que como guía para la tira de prueba 1610 cuando se inserta en el lector.

Posicionado debajo de la bandeja está el dispositivo de calentamiento 1606 y sobre la bandeja, en registro con la posición del dispositivo de calentamiento 1606, está el sistema óptico 1607 para iluminar una tira de prueba insertada con luz de excitación y para recibir y procesar la luz emitida. La superficie superior de la carcasa 1602 tiene ventana de observación 1608 a través de la cual puede verse la lectura del sistema óptico 1607.

El lector 1601 también tiene actuadores 1632, 1633 y 1638 que son operables desde el exterior de la superficie superior de la carcasa para desgarrar los depósitos desgarrables 1620, 1622, y 1624 respectivos sobre la tira de prueba 1610, como se describirá como más detalle a continuación. El actuador 1632 se proporciona con un botón 1631 en su extremo superior que sobresale a través de la superficie superior de la carcasa 1602. Una depresión cóncava 1630 rodea el botón. Similarmente, el actuador 1635 tiene un botón 1634 en su extremo superior que está rodeado por una depresión cóncava 1633 formada en la superficie superior de la carcasa 1602. De igual forma, el actuador 1638 tiene un botón 1637 en su extremo superior rodeado por una depresión cóncava 1636 formada en la superficie superior de la carcasa 1602.

La Figura 18 es una vista esquemática transversal del lector 1601 tomada en línea 18'-18' en la Figura 17 pero mostrando en perfil el lado de una tira de prueba 1610 insertada completamente en la bandeja 1404 a través de la ranura 1603. La tira de prueba 1610 se muestra ligeramente elevada de la superficie superior de la bandeja 1604 para mayor claridad.

Como puede verse claramente desde esta vista lateral, la zona de prueba 1616 de la tira de prueba completamente insertada 1610 sobreyace sobre el dispositivo de calentamiento 1606 y están dispuesta directamente por debajo del sistema óptico 1607. También, puede verse que el actuador 1632 está dispuesto sobre el depósito de solución portadora regulada 1620 desgarrable, el actuador 1635 está dispuesto sobre el depósito de agente bloqueador 1622 desgarrable y el actuador 1638 está dispuesto sobre el depósito de solución de activación 1624 desgarrable.

El uso del aparato ilustrado en las Figuras 16 y 18 se describirá a continuación.

Primero, la tira de prueba 1610 se inserta en el lector 1601 a través de la ranura 1603. Luego el actuador 1635 se utiliza para desgarrar el depósito de agente bloqueador 1622 desgarrable pulsando el botón 1635 hacia abajo. Esto libera el agente bloqueador, que normalmente consta de PBS/BSA y fluye a la membrana porosa 1612 a través de la línea de alimentación 1623. El agente bloqueador fluye a lo largo de la membrana porosa 1612 en la dirección de izquierda a derecha como se muestra en el dibujo, atraída por la acción de succión de la almohadilla empapadora 1614. El agente bloqueador pasa sobre la zona de prueba 1616 donde las moléculas de captura se inmovilizan. El agente bloqueador pre-humedece y/o bloquea los puntos de reacción que no están cargados con moléculas de captura. Esto asegura que dichos puntos de reacción se neutralizan de forma que no puedan interactuar con una muestra bajo prueba.

Luego la tira de prueba 1610 se retrae ligeramente del lector 1601 para exponer su zona de aplicación de muestras 1615. una solución de una muestra de prueba que se sospeche que contiene un analito a ser detectado se aplica entonces a la zona de aplicación de muestras 1615 y la tira de prueba se vuelve a insertar completamente en el lector 1601. Las cápsulas que han sido precargadas en la tira de prueba en la zona de aplicación de la muestra son asumidas en la solución de prueba aplicada e interactúan con cualquier analito presente mediante la intermediación de las moléculas de afinidad sobre la superficie de la cápsula. Como se ha indicado previamente, las moléculas de afinidad se ligan específicamente con el analito.

La solución fluye a lo largo de la membrana 1612 en la dirección de izquierda a derecha como se muestra en los dibujos, atraída por la acción de la almohadilla empapadora 1614. Arrastrados en la solución están los complejos formados entre las moléculas del analito y las moléculas de afinidad adheridas a las cápsulas, y las cápsulas libres que no tienen analitos ligados a ellas.

5 A continuación, el actuador 1632 se utiliza para desgarrar el depósito de solución portadora regulada 1620 desgarrable pulsando el botón 1631 hacia abajo. Esto libera la solución portadora regulada que fluye a la membrana porosa 1612 a través de la línea de alimentación 1621. La solución portadora regulada fluye a lo largo de la membrana porosa 1612 en una dirección de izquierda a derecha como se muestra en el dibujo, atraída por el poder de succión de la almohadilla empapadora 1614 y lleva los complejos formados entre las moléculas del analito y las moléculas de afinidad adheridas a las cápsulas, y también las cápsulas libres, a la zona de prueba

10 A medida que pasan las moléculas de captura inmovilizadas sobre la membrana en la zona de prueba 1616, los complejos se eliminan de la solución mediante la interacción entre el analito y las moléculas de captura. La solución portadora regulada lava cualquier cápsula libre que no tenga analito ligado a ella más allá de la zona de prueba.

15 A continuación, el actuador 1638 se utiliza para desgarrar el depósito de solución de activación 1624 pulsando el botón 1637 hacia abajo. El depósito de solución de activación contiene una solución de activación con pH equilibrado. Cuando el depósito 1624 se desgarrar, esto libera la solución de activación con pH equilibrado que fluye a la membrana porosa 1612 a través de la línea de alimentación 1625. La solución de activación con pH equilibrado fluye a lo largo de la membrana porosa 1612 en la dirección de izquierda a derecha como se muestra en el dibujo, atraída por la acción de succión de la almohadilla empapadora 1614.

20 Se permite un tiempo suficiente para que la solución de activación con pH equilibrado fluya a la zona de prueba 1616 antes de que el dispositivo de calentamiento 1606 se encienda para causar un aumento de la temperatura del volumen de solución de activación sobre la ubicación del dispositivo de calentamiento. Ya que solo hay presente un volumen pequeño de solución en la membrana porosa 1612 sobre el dispositivo de calentamiento 1606, el aumento de temperatura de la solución de activación a un valor nominal elevado es muy rápido.

25 El desencadenamiento de la activación del precursor de señal en las cápsulas se produce en unos segundos o fracciones de un segundo de la etapa de calentamiento y las moléculas generadoras de señal individuales se liberan de las cápsulas.

30 A continuación, se acciona el sistema óptico 1607. La luz de excitación, por ejemplo, de un LED, se dirige sobre la zona de prueba para causar que las moléculas generadoras de señal fluorescan y se detecta la fluorescencia emitida. Una lectura de la fluorescencia detectada es visible a través de la ventana de observación 1608.

35 En una variante del procedimiento anterior, la etapa de bloquear los puntos de reacción que no están cargados con moléculas de captura usando un agente de bloqueo puede omitirse si las tiras de prueba se tratan previamente con una solución de bloqueo antes de su distribución a los usuarios finales. En estas circunstancias, no es necesario que la tira de prueba incluya un depósito de agente de bloqueo desgarrable y la solución de la muestra de prueba puede aplicarse a la zona de aplicación de muestra 1615 antes de que la tira de prueba 1610 se inserte por primera vez en el lector 1601.

40 *Variantes del calentador*

45 Pueden usarse varios tipos de dispositivo de calentamiento para conseguir el calentamiento deseado de la solución de activación para desencadenar la activación, incluyendo, pero no restringido a, dispositivos resistivos, radiantes, microondas o inductivos. Otro ejemplo es un dispositivo Peltier como el utilizado en los experimentos descritos anteriormente para investigar el comportamiento de las cápsulas que contienen precursor de señal bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. También es posible calentar la solución de activación mediante la aplicación de ultrasonidos.

50 Por ejemplo, la solución de activación puede calentarse aplicando ultrasonidos de baja frecuencia en el rango de 20 a 60 kHz. Alternativamente, la solución de activación puede calentarse aplicando ultrasonidos de alta frecuencia en el rango de 1 a 8 MHz.

55 *Comportamiento de la cápsula tras desencadenar la activación y variantes de la cápsula*

60 El destino de las paredes de la cápsula del desencadenamiento de la activación no parece afectar el rendimiento de los ensayos del comprador. En WO02/12888 A2 se reportó que las cápsulas se desintegraban, pero ahora el mejor entendimiento del comportamiento de la cápsula se ha conseguido y se sabe que ciertos tipos de cápsulas permanecen intactas una vez que el precursor de señal activa las moléculas generadoras de señal liberadas de la encapsulación.

65 Si la pared de la cápsula es un tensioactivo, la hidrólisis del material precursor encapsulado resulta en una cápsula tensioactivo vacía, equivalente a micela, debido a la disipación de las moléculas generadoras de señal hidrolizadas, o la cápsula se desintegra debido a una concentración de tensioactivos menor que la concentración crítica de micelas.

Por otra parte, si la pared de la cápsula es un tensioactivo acompañado de un polímero, la cápsula puede permanecer intacta. Véase Caruso, F. Langmuir 2000, 16, 1485-1488.

5 Los tensioactivos que pueden ser usados en la preparación de las cápsulas para encapsular precursores de señal en conexión con la presente invención incluyen:

(i) Tensioactivos catiónicos:

10 DSPE-PEG (2000) Cloruro de benzalconio de amina, Cloruro de bencetonio, Bronidox, Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), Cloruro de cetiltrimetilamonio, Cloruro de dimetildioctadecilamonio, Lauril metil glucet-10 hidroxipropildiamonio cloruro, Tetrametilamonio hidróxido.

(ii) Tensioactivos aniónicos:

15 Lauril sulfato de amonio, Dioctilsulfosuccinato de sodio, Ácido sulfónico de perfluorooctano, Ácido perfluorononanoico, Ácido perfluorooctanoico, Ácido perfluorooctanoico, Sulfato lauril de potasio, Dodecilsulfato sódico, Sulfonato del dodecilbenceno del sodio, Lauril éter sulfato sódico, Lauroil sarcosinato de sodio, Lauril éter sulfato de sodio, Palmitato de sodio, Paret sulfato de sodio, Estearato de sodio, Sebato de sodio.

20 (iii) Tensioactivos zwitteriónicos:

Molécula anfifílica, Detergente CHAPS, Cocamidopropil betaína, Cocamidopropil hidroxisultaína, Lecitina, Lauroanfoacetato de Sodio.

25 (iv) Tensioactivos no iónicos:

30 Cetomacrogol 1000, Alcohol cetoestearílico, Alcohol cetílico, Cocamida DEA, Cocamida MEA, Decil glucósido, Gliceril laurato, Isoceteth 20, Lauril glucosido, Etoxilato de rango estrecho, Nonidet P 40 (Marca comercial registrada), Nonoxinol-9, Nonoxinoles, NP-40, Éter de glicol monododecil octoetileno, Octil glucósido, Alcohol oléico, Éter de glicol monododecil pentaetileno, Poloxámero, Poloxámero 407, Polirricinoleato de poliglicerol, Polisorbato, Polisorbato 20, Polisorbato 80, Monoestearato de sorbitán, Tristerato de sorbitán, Alcohol estearílico, Triton X-100 (Marca comercial registrada).

35 (v) Moléculas polares sin carga:

Esteroles, carbohidratos, etc.

Los polímeros que pueden ser usados en la preparación de las cápsulas para encapsular precursores de señal en conexión con la presente invención incluyen:

40 (vi) Polímeros básicos:

45 Poli PAH (hidrocloruro de alanina), PVP (polivinilo pirrolidone), PEI (polietilenimina), PEG (glicol de polietileno), Polilisina, polipéptidos incluyendo histonas, proteína ribosomal, protamina, (vii) Polímeros ácidos:

Poli PSS (estirenesulfonato 4 de sodio), poliglutamato, poliaspartato, ácidos nucleicos, etc.

Las cápsulas pueden prepararse también usando combinaciones de tensioactivos y polímeros.

50 *Otras variantes de bioensayo*

55 En lo anterior, un procedimiento de bioensayo ha sido descrito con referencia a la Figura 1, en el cual, en la primera etapa, una muestra de prueba sospechosa de contener el analito 10 se mezcla en una solución con cápsulas 20 que contienen material precursor de señal 30. Por supuesto se entiende bien que este no tiene que ser necesariamente la primera etapa para realizar un bioensayo. Ahora se describirán brevemente procedimientos alternativos con referencia a las Figuras 19 a 22.

La Figura 19 es un diagrama que muestra una secuencia de etapas para realizar un inmunoensayo usando cápsulas que contienen un precursor de señal.

60 Se utiliza un dispositivo que comprende un anticuerpo de captura 191 específico inmovilizado sobre un sustrato 192. El anticuerpo de captura 191 inmovilizado sobre el sustrato 192 podría, por ejemplo, corresponderse a las moléculas de captura inmovilizadas en una zona de prueba en un aparato de prueba de flujo lateral como el descrito anteriormente en conexión con las Figuras 14 a 18. El anticuerpo de captura 191 tiene una afinidad para, y es capaz de ligarse específicamente a, un antígeno 195 que es la especie de destino a detectar en el inmunoensayo.

65

5 En en una primera etapa (no mostrada) el sustrato 192 con el anticuerpo de captura 191 inmovilizado sobre su superficie se humedece previamente y/o se bloquea mediante el tratamiento con una solución de albúmina de suero bovino en un salino regulado con fosfato (PBS/BSA) para asegurar que cualquier punto reactivo sobre el sustrato 192 se neutralice de forma que no puedan interactuar con el antígeno aplicado más tarde. Los puntos reactivos no bloqueados podrían, de lo contrario, dar lecturas falsas.

10 En la segunda etapa, mostrado en la parte superior del dibujo, una solución sospechosa de contener el antígeno 195 se hace fluir sobre el dispositivo. Si el antígeno está presente, al menos parte de él será capturado al ligarse con el anticuerpo de captura 191. Para simplificar las cosas, la Figura 19 muestra un único antígeno 195 que se liga a un único anticuerpo de captura 191. En la práctica, la zona de captura del dispositivo tendrá muchos anticuerpos de captura 191 inmovilizados sobre el sustrato 192 y cualquiera de estos anticuerpos de captura serán capaces de ligarse a un antígeno 195. Cada anticuerpo de captura 191 es solo capaz de ligarse a un único antígeno 195 debido a la naturaleza altamente específica de la geometría del punto de ligado anticuerpo/antígeno.

15 En la tercera etapa, una solución de cápsulas 193 que contiene un precursor de señal 30 y con moléculas de afinidad sobre su superficie en la forma de anticuerpos 194 se hace fluir sobre el dispositivo. Igual que los anticuerpos de captura 191, los anticuerpos 194 sobre la superficie de las cápsulas 193 tienen una afinidad por, y también pueden ligarse específicamente a, el antígeno 195. Por conveniencia, las cápsulas que tienen anticuerpos 194 en su superficie se denominarán cápsulas emparejadas 196. En virtud de los anticuerpos 194 actuando como las moléculas de afinidad de las cápsulas 193 y en virtud de la afinidad de los anticuerpos 194 por el antígeno 195, las cápsulas emparejadas Ab 196 se ligan a los antígenos 195 que han sido capturados por los anticuerpos de captura 191. De este modo se forma un complejo capturado 197.

25 En la cuarta etapa, el dispositivo con sus complejos capturados 197 se lava para eliminar cualquier cápsula emparejada Ab y luego se aplica al dispositivo una solución de tratamiento con pH equilibrado. Tras el periodo de incubación deseado, la solución de tratamiento se calienta para desencadenar la activación de las cápsulas. El precursor de señal 30 se hidroliza y se libera de las cápsulas en forma de moléculas individuales 80 de sustancia generadora de señal.

30 En la etapa final (no mostrado) las moléculas generadoras de señal 80 se irradian con luz de excitación y la luz emitida (señal generada) se detecta y mide.

35 La Figura 20 es un diagrama que muestra las partes de otro esquema alternativo para realizar un inmunoensayo usando cápsulas que contienen un precursor de señal.

40 En este esquema alternativo, un anticuerpo de detección etiquetado 207 se utiliza, y se liga al anticuerpo de captura 201 inmovilizado sobre un sustrato 202 de un dispositivo de detección. Al utilizar una etiqueta adecuada (denotada en el dibujo mediante el subíndice L) que es capaz de ligarse al anticuerpo de captura 201, el mismo anticuerpo de captura 201 puede usarse para muchos ensayos diferentes porque el ensayo se deriva específicamente del anticuerpo de detección 207.

45 En una primera etapa (no mostrado) el sustrato 202 con el anticuerpo de captura 201 inmovilizado sobre su superficie se humedece previamente y/o se bloquea mediante el tratamiento con una solución de albúmina de suero bovino en un salino regulado con fosfato (PBS/BSA) para asegurar que cualquier punto reactivo sobre el sustrato 202 se neutralice de forma que no puedan interactuar con el antígeno aplicado más tarde. Los puntos reactivos no bloqueados podrían, de lo contrario, dar lecturas falsas.

50 En la segunda etapa, una solución sospechosa de contener un antígeno 205 se mezcla previamente con las cápsulas emparejadas Ab 206 y los anticuerpos de detección 207 etiquetados. Las cápsulas emparejadas Ab 206 se forman a partir de las cápsulas 203 que contienen un precursor de señal 30 con moléculas de afinidad en la forma de anticuerpos 204 en su superficie. Los anticuerpos son capaces de ligarse al antígeno 205. Igualmente, los anticuerpos de detección etiquetados 207 también son capaces de ligarse al antígeno 205. Esta etapa de mezclado previo resulta en la formación de un complejo tipo sándwich 208 cuando el antígeno 205 está presente. El antígeno 205 se intercala entre uno de los anticuerpos 204 de la cápsula emparejada Ab 206 y uno de los anticuerpos de detección etiquetados 207.

60 En la siguiente etapa, la solución mezclada previamente de los complejos intercalados 208 se hace fluir sobre el dispositivo. Por virtud de la afinidad de las etiquetas L de los anticuerpos de detección etiquetados 207 para los anticuerpos de captura inmovilizados 201, los complejos intercalados 208 se capturan como un complejo capturado 209.

65 En la cuarta etapa, el dispositivo con sus complejos capturados 209 se lava para eliminar cualquier complejo intercalado no capturado 208. Tras el lavado, se aplica una solución de activación de pH al dispositivo y luego, tras el periodo de incubación deseado, la solución de activación se calienta para desencadenar la activación de las cápsulas.

El precursor de señal 30 se hidroliza y se libera de las cápsulas en forma de moléculas individuales 80 de sustancia generadora de señal.

5 En la etapa final (no mostrado) las moléculas generadoras de señal 80 se irradian con luz de excitación y la luz emitida (señal generada) se detecta y mide.

10 El esquema descrito en la Figura 20 tiene los siguientes requisitos: Primero, el anticuerpo de captura 201 se inmoviliza sobre el sustrato 202. Esto puede hacerse mediante emparejamiento químico o alternativamente permitiendo que el anticuerpo de captura se absorba directamente a un sustrato plástico, como el poliestireno. Segundo, las cápsulas 203 tienen que ser emparejadas con los anticuerpos 204 como las moléculas de afinidad que son capaces de ligarse al objetivo a ser detectado. Tercero, un anticuerpo que se especifica con la etiqueta "L" se requiere, que debe ser capaz de ligarse al objetivo a ser detectado. La etiqueta "L" puede ser cualquier conjugado disponible comúnmente para un anticuerpo, por ejemplo, DNP, digoxina o diferentes tinturas.

15 La Figura 21 es un diagrama que muestra las partes de otro esquema alternativo para realizar un ensayo de hibridación usando cápsulas que contienen un precursor de señal. En este esquema, el dispositivo de detección tiene un fragmento de ácido nucleico (oligonucleótido) 211 inmovilizado sobre un sustrato 212. El fragmento de ácido nucleico 211 funciona casi de la misma forma que los anticuerpos de captura 191 y 201 descritos arriba en conexión con las Figuras 19 y 20 y, como esos anticuerpos de captura, podría considerarse como un ejemplo de una molécula de captura en una zona de captura de un dispositivo de prueba de flujo lateral como el descrito anteriormente en conexión con las Figuras 14 a 18.

20 En una primera etapa (no mostrado) el sustrato 212 con el oligonucleótido 211 inmovilizado sobre su superficie se humedece previamente y/o se bloquea mediante el tratamiento con una solución de albúmina de suero bovino en un salino regulado con fosfato (PBS/BSA) para asegurar que cualquier punto reactivo sobre el sustrato 212 se neutralice de forma que no puedan interactuar con la solución objetivo aplicada más tarde que contiene secuencias de ácido nucleico complementarias porque los puntos reactivos no bloqueados pueden causar falsas lecturas.

25 En una etapa independiente, una solución de cápsulas 213 que contienen el precursor de señal se prepara, las cápsulas 213 son conjugadas a los oligonucleótidos 214 que se van a detectar. Por conveniencia, las cápsulas conjugadas a los oligonucleótidos se denominarán complejos de ácido nucleico 216.

30 La siguiente etapa se muestra en el dibujo; la solución de complejos de ácido nucleico 216 se hace fluir sobre el dispositivo. Esos complejos 216 que tienen un oligonucleótido 214 que es complementario al oligonucleótido 211 sobre el sustrato 212 será capturado mediante hibridación de los dos oligonucleótidos 211 y 214 complementarios, formando así complejos capturados 215. [0126] El dispositivo con sus complejos capturados 215 se lava para eliminar cualquier complejo de ácido nucleico 216 no capturado.

35 En la segunda etapa mostrada en el dibujo se aplica una solución de activación de pH al dispositivo y luego, tras el periodo de incubación deseado, la solución de activación se calienta para desencadenar la activación de las cápsulas. El precursor de señal 30 se hidroliza y se libera de las cápsulas en forma de moléculas individuales 80 de sustancia generadora de señal.

40 En la etapa final (no mostrado) las moléculas generadoras de señal 80 se irradian con luz de excitación y la luz emitida (señal generada) se detecta y mide.

45 El esquema de hibridación descrito en la Figura 21 tiene los siguientes requisitos: Primero, los oligonucleótidos 211 se inmovilizan sobre el sustrato 212. Esto requiere cierta forma de emparejamiento químico y control sobre la direccionalidad de forma que la dirección 5'-3' sea la misma para cada oligonucleótido inmovilizado y la dirección opuesta desde como los oligonucleótidos 214 se inmovilizan en las cápsulas 213. Segundo, los oligonucleótidos 214 se conjugan a las cápsulas 213 de nuevo con direccionalidad controlada. Tercero, los oligonucleótidos 211 deben tener complementariedad para los oligonucleótidos 214 que vayan a ser detectados.

50 La Figura 22 es un diagrama que muestra las partes de otro esquema alternativo para realizar un ensayo de hibridación usando cápsulas que contienen un precursor de señal.

55 En este esquema, el dispositivo de detección tiene un fragmento de ácido nucleico (oligonucleótido) 221 inmovilizado sobre un sustrato 222, casi de la misma forma que el dispositivo usado en el esquema de hibridación descrito en la Figura 1. Por tanto, el oligonucleótido 221 podría considerarse como un ejemplo de una molécula de captura usada en la zona de prueba de un dispositivo de prueba de flujo lateral como el descrito anteriormente en conexión con las Figuras 14 a 18.

60 Como antes, el dispositivo de detección que comprende los primeros oligonucleótidos 221 inmovilizados sobre el sustrato 222 se humedece previamente y/o bloquea mediante un tratamiento con PBS/BSA para asegurar que cualquier punto reactivo sobre el sustrato 222 se neutraliza para eliminar falsas lecturas.

65

Para esto se provee una solución que contiene el tercer fragmento de ácido nucleico (oligonucleótido) que se denominará aquí como un oligonucleótido 227 "puente". Los oligonucleótidos puente 227 se hibridan con los oligonucleótidos 224 conjugados a las cápsulas 223 formando completos de oligonucleótido puentes 226 que tienen una cola 228 que es capaz de una posterior hibridación.

5 En la siguiente etapa, la solución de complejos de oligonucleótidos puente 226 se hace fluir sobre el dispositivo. Las colas 228 de los complejos 226 son complementarias a los oligonucleótidos inmovilizados 221 sobre el sustrato 222 y por tanto se produce una posterior hibridación y los complejos 226 son capturados por el dispositivo por esta hibridación adicional, formando complejos capturados 225.

10 El dispositivo con sus complejos capturados 225 se lava para eliminar cualquier complejo de ácido nucleico 226 no capturado.

15 En la siguiente etapa, se aplica una solución de activación con pH equilibrado al dispositivo y luego, tras el periodo de incubación deseado, la solución de activación se calienta para desencadenar la activación de las cápsulas. El precursor de señal 30 se hidroliza y se libera de las cápsulas en forma de moléculas individuales 80 de sustancia generadora de señal.

20 En una etapa final (no mostrado) las moléculas generadoras de señal 80 se irradian con luz de excitación y la luz emitida (señal generada) se detecta y mide.

El esquema de hibridación descrito en la Figura 22 tiene los siguientes requisitos: Primero, los oligonucleótidos 221 tienen que ser inmovilizados sobre el sustrato 222.

25 Esto requiere cierta forma de emparejamiento químico y control sobre la direccionalidad de forma que la dirección 5'-3' sea la misma para cada oligonucleótido inmovilizado y la misma que la dirección 5'-3' de los oligonucleótidos 224 conjugados con las cápsulas 223. Segundo, los oligonucleótidos 224 tienen que conjugarse a las cápsulas 223 de nuevo con direccionalidad controlada. Tercero, los oligonucleótidos 221 deben tener complementariedad para los oligonucleótidos puente 227 que deben tener al mismo tiempo complementariedad para los oligonucleótidos 224 que se pretende detectar.

Ejemplos de tipos de molécula de afinidad diferentes para su uso sobre las cápsulas y sus procedimientos de conjugación.

35 Dependiendo de las moléculas de destino a detectar, las moléculas de afinidad pueden ser moléculas de biorreconocimiento seleccionadas a partir de los siguientes grupos de materiales.

40 (a) péptidos o proteínas seleccionados del grupo consistente de anticuerpos, anticuerpos modificados genéticamente, anticuerpos policlonales, receptores, antígenos, lecitinas, avidinas, oligopéptidos, lipoproteínas, glicoproteínas, hormonas péptidas, y alérgenos y sus partes;

(b) los ácidos nucleicos seleccionados del grupo consistente de ADN, ARN, oligonucleótidos, altámeros y partes de los mismos.

45 (c) carbohidratos seleccionados del grupo consistente de mono-, oligo-, y polisacáridos, glucolípidos, proteo-polisacáridos y partes de los mismos; o

(d) ligandos de bajo peso molecular seleccionados del grupo consistente de biotina, derivados de la biotina, esteroides, hormonas, cofactores, activadores, inhibidores, drogas, alérgenos o haptenos.

50 Las moléculas de afinidad pueden conjugarse a la superficie externa de las cápsulas, por ejemplo, mediante fuerzas van der Waals, ligaduras de hidrógeno o interacciones electroestáticas, o pueden ligarse covalentemente a la superficie exterior de las cápsulas directamente o mediante moléculas de enlace. La molécula de enlace es normalmente una biomolécula, preferiblemente avidina, estreptavidina, neutravidina, proteína A, proteína G, lecitina, o un reticulante molecular bajo.

55 Aunque la invención ha sido descrita anteriormente con referencia a realizaciones y ejemplos particulares, estos no son limitantes y una persona experta en el material comprenderá que son posibles otras variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para controlar el inicio de la generación de la señal es un bioensayo usando cápsulas que contienen un precursor de señal que es hidrolizable desde un formato latente en el cual no se genera sustancialmente una señal a un formato en el cual puede generar una señal detectable, las cápsulas teniendo en su superficie exterior moléculas de afinidad para el reconocimiento específico de y el ligado a cualquier molécula objetivo en una muestra a evaluar para permitir la formación de complejos de cápsula de destino, el procedimiento comprendiendo:
- (i) el tratamiento de las cápsulas con una solución cuya temperatura es tal que sustancialmente no se produce hidrólisis del precursor de señal y cuyo pH está equilibrado de forma que:
- (a) el pH es demasiado alto para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por ácido significativa a temperatura ambiente, pero al cual el precursor de señal se somete a una hidrólisis significativa a una temperatura elevada;
- o:
- (b) el pH es demasiado bajo para que el precursor de señal se someta a una hidrólisis catalizada por base significativa a temperatura ambiente, pero al cual el precursor de señal se somete a una hidrólisis significativa a una temperatura elevada;
- y
- (ii) el calentamiento posterior de las cápsulas en la solución de tratamiento para iniciar el inicio de la hidrólisis del precursor de señal al formato en el cual puede generar una señal detectable.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el pH equilibrado está predeterminado por:
- (a) la adición de una parte de dichas cápsulas que contienen el precursor de señal a una serie de soluciones a temperatura ambiente y con diferentes pH;
- (b) irradiando la serie de soluciones de temperatura ambiente con luz de excitación;
- (c) rechazo de las soluciones que emiten una señal intensa a temperatura ambiente;
- (d) calentamiento de las soluciones que no emiten sustancialmente una señal a temperatura ambiente;
- (e) rechazo de las soluciones que no emiten sustancialmente una señal tras el calentamiento, y
- (f) anotación del valor de pH de la solución o soluciones que emiten una señal intensa tras el calentamiento definitivas del pH equilibrado.
3. Un procedimiento para realizar un bioensayo por la detección de una o más moléculas objetivo en una muestra, el procedimiento comprendiendo:
- (i) adherir una pluralidad de moléculas de captura a un sustrato, las moléculas de captura teniendo una afinidad por las moléculas objetivo;
- (ii) mezclar la muestra en la solución con cápsulas que contienen un precursor de señal que es hidrolizable desde un formato latente en el cual no se genera sustancialmente una señal a un formato en el cual puede generar una señal detectable, las cápsulas portando en su superficie exterior moléculas de afinidad para el reconocimiento específico de y el ligado a cualquier molécula objetivo en una muestra a evaluar para permitir la formación de complejos de cápsula de destino;
- (iii) poner en contacto la solución con las moléculas de captura sobre el sustrato y permitir que cualquier complejo de cápsulas de captura se ligue con las moléculas de captura;
- (iv) separar las cápsulas que no están en complejo con las moléculas objetivo desde cualquier complejo de cápsulas objetivo ligado a las moléculas de captura;
- (v) tratar cualquier complejo de cápsulas objetivo ligado a las moléculas de captura con una solución de tratamiento cuya temperatura y pH están equilibrados según la etapa (i) de la reivindicación 1;
- (vi) tratar cualquier complejo de cápsulas objetivo ligado a las moléculas de captura con una solución de tratamiento con pH equilibrado según la etapa (ii) de la reivindicación 1;
- (vii) irradiar la solución de tratamiento con pH equilibrado con luz de excitación en los alrededores de las moléculas de captura en el sustrato, y
- (viii) detectar cualquier señal generada.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de calentar las cápsulas en la solución de tratamiento comprende calentar la solución de tratamiento a una temperatura en el rango de 40 °C a 75 °C.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la etapa de calentar las cápsulas en la solución de tratamiento comprende calentar la solución de tratamiento a una temperatura en el rango de 45 °C a 65 °C.

- 5 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de calentar las cápsulas en la solución de tratamiento comprende calentar la solución de tratamiento usando un dispositivo calentador seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de calentamiento resistivo, un dispositivo de calentamiento radiante, un dispositivo de calentamiento por microondas, un dispositivo de calentamiento inductivo y un dispositivo Peltier.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la etapa de calentar las cápsulas en la solución de tratamiento comprende calentar la solución por ultrasonidos.
- 10 8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el ultrasonido es ultrasonido de baja frecuencia en el rango de 20 a 60 kHz.
- 15 9. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el ultrasonido es ultrasonido de alta frecuencia en el rango de 1 a 8 MHz.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de calentar las cápsulas en la solución de tratamiento se realiza tras un intervalo de 100 segundos a 500 segundos tras la adición de la solución de tratamiento a las cápsulas.
- 20 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la sustancia generadora de señal contenida en las cápsulas es un material orgánico.
- 25 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las cápsulas contienen de 10^7 a 10^9 moléculas del precursor de señal por cápsula.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el precursor de señal se selecciona de un grupo consistente en fluoróforos hidrolizables, luminóforos hidrolizables, cromóforos hidrolizables, proteínas bioluminogénicas hidrolizables y proteínas fluorogénicas hidrolizables.
- 30 14. El procedimiento según la reivindicación 13 en el que el precursor de señal es un fluoróforo hidrolizable.
- 35 15. El procedimiento según la reivindicación 13 en el que el precursor de señal es diacetato de fluoresceína.
- 40 16. Un procedimiento para realizar un bioensayo que comprende la activación de cápsulas que contienen un precursor de señal que está en formato hidrolizable desde un formato latente en el cual sustancialmente no se genera señal a un formato en el cual se puede generar una señal detectable, dicha activación comprendiendo el tratamiento de dichas cápsulas con calor y con una solución catalizadora ácida o base, la combinación de dicho calor y el pH de la solución catalizadora siendo tales que se hidroliza dicho precursor al formato en el cual puede generar una señal detectable.
- 45 17. El procedimiento de la reivindicación 16 en el que dicha activación además comprende exponer dichas cápsulas a radiación de excitación.

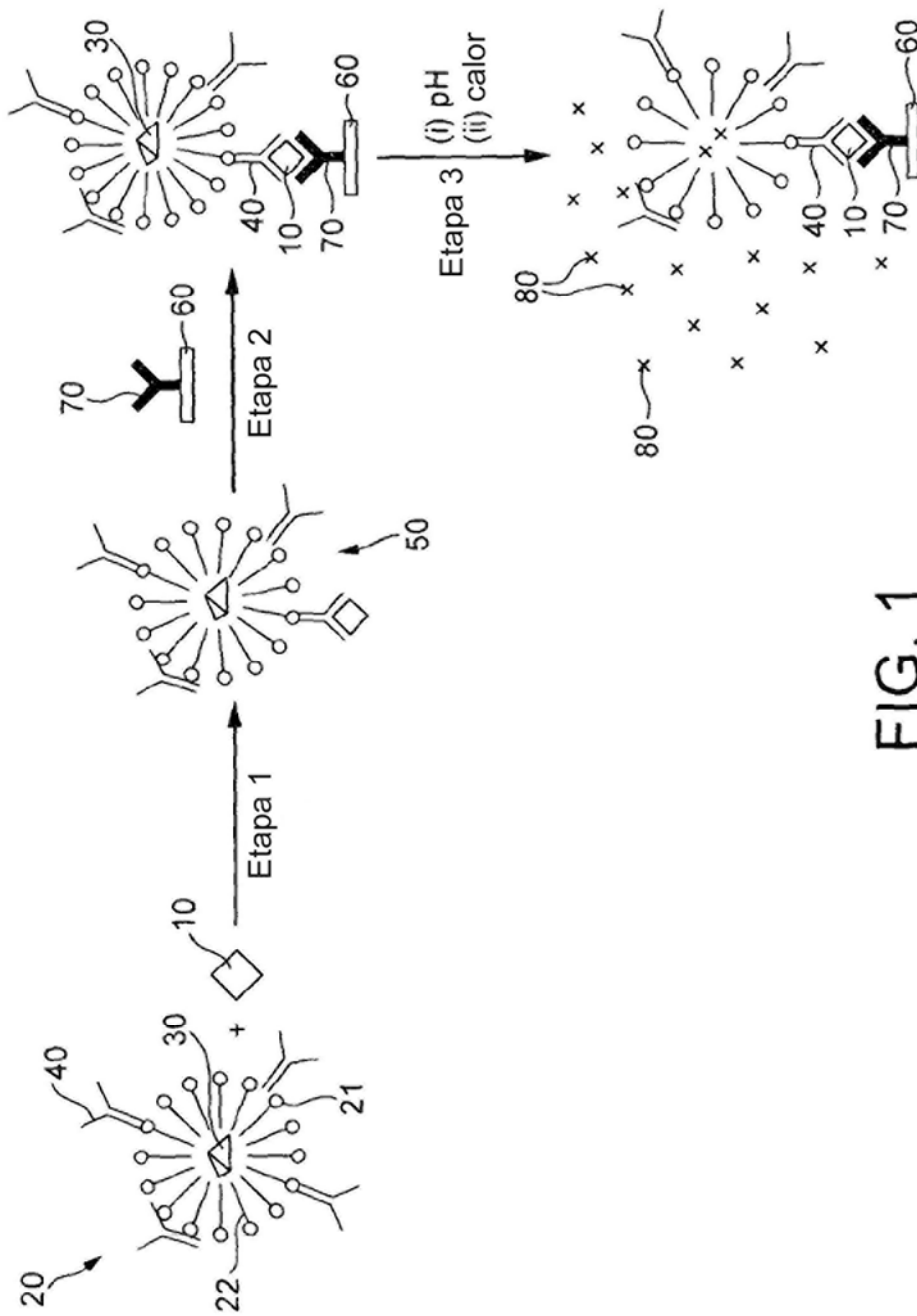


FIG. 1

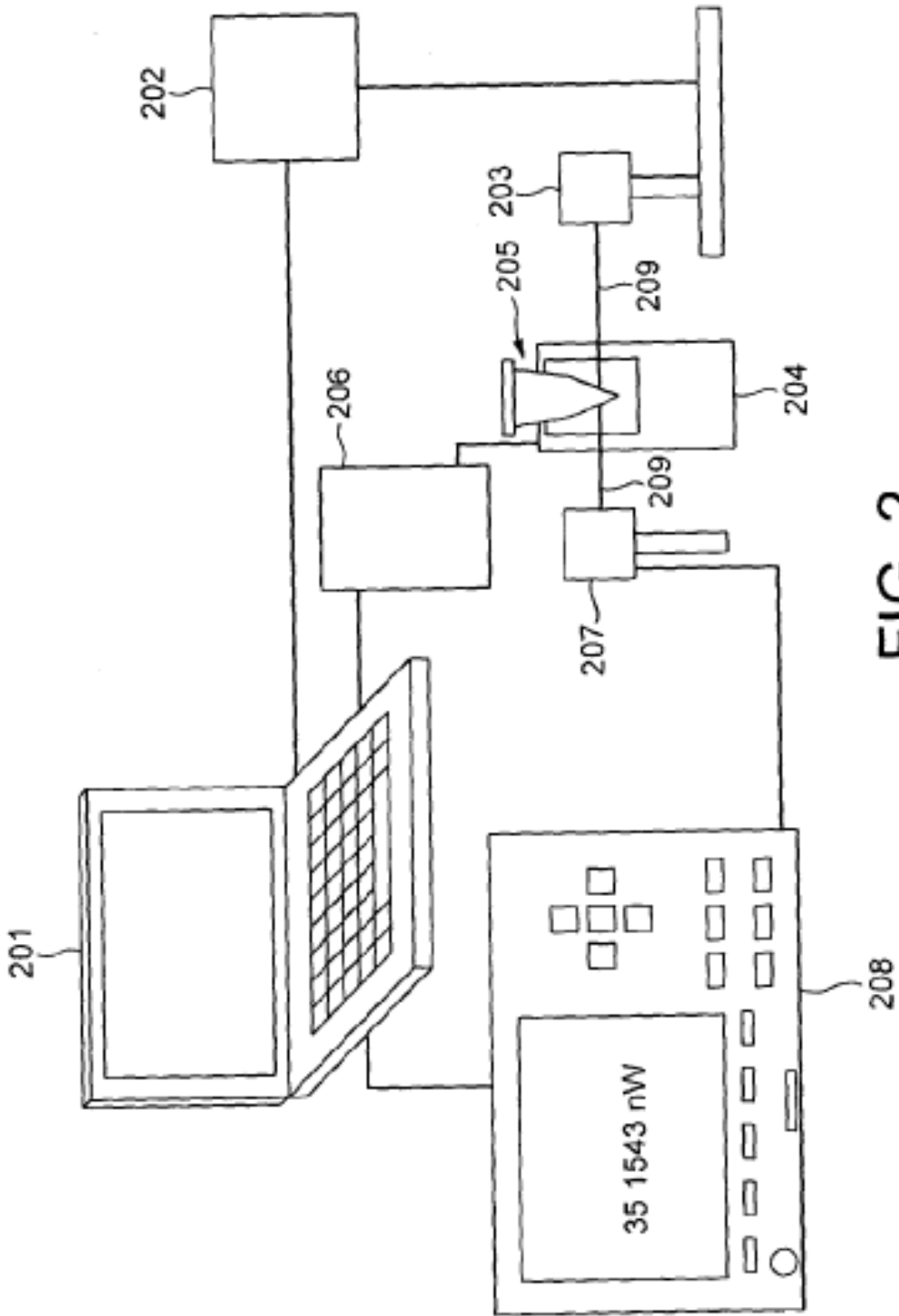


FIG. 2

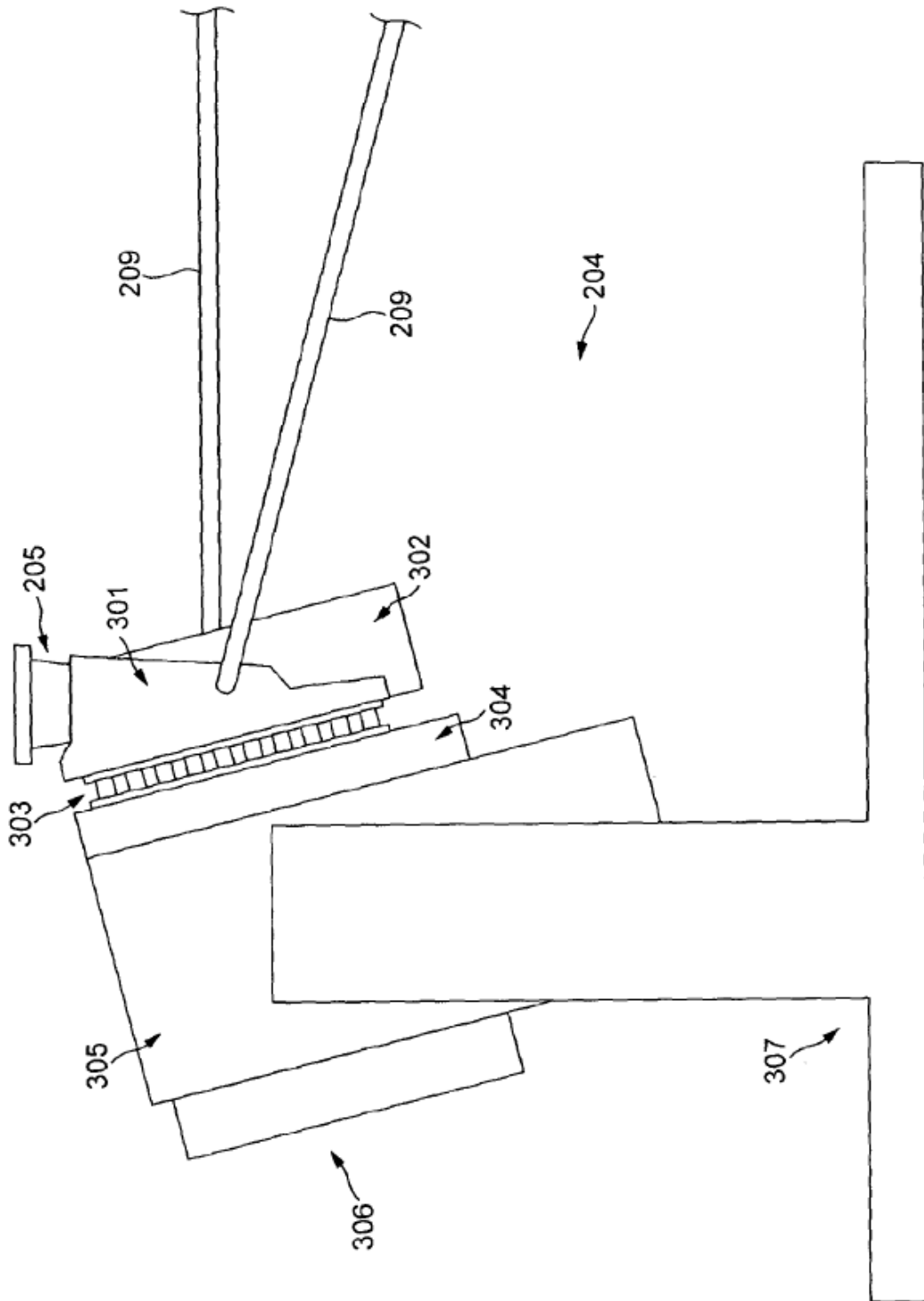


FIG. 3

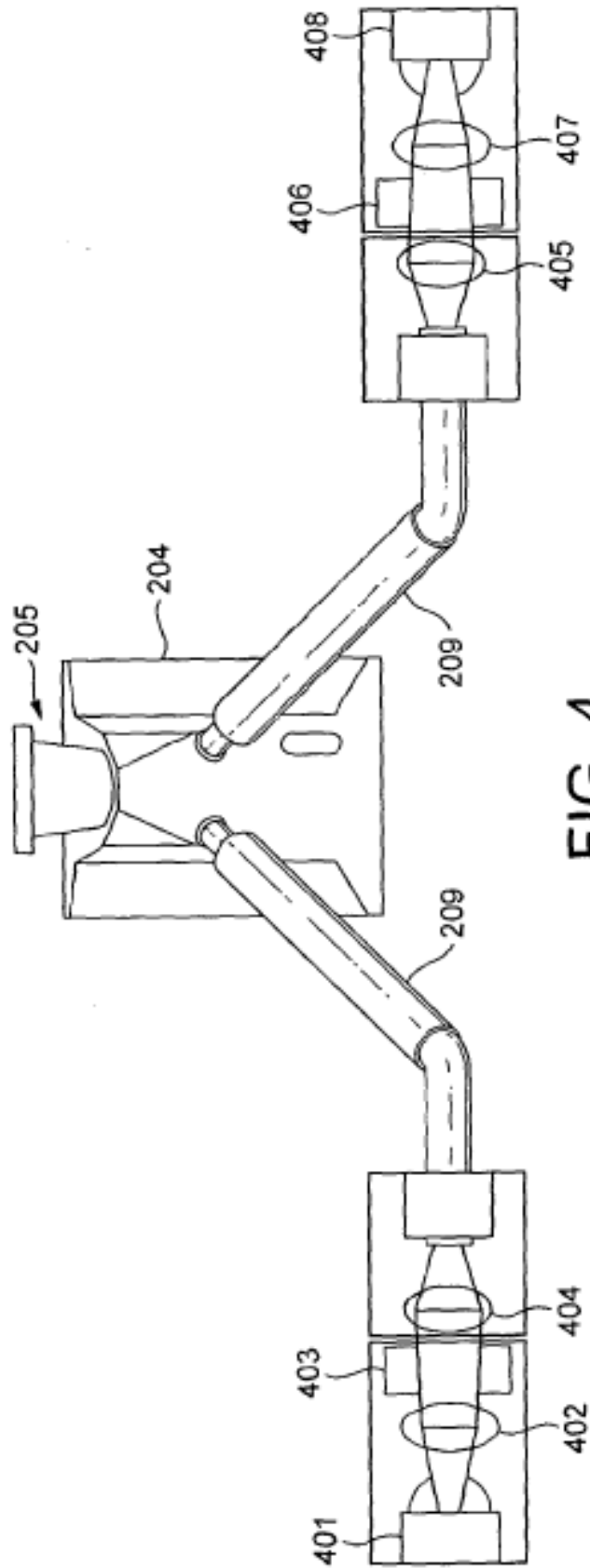


FIG. 4

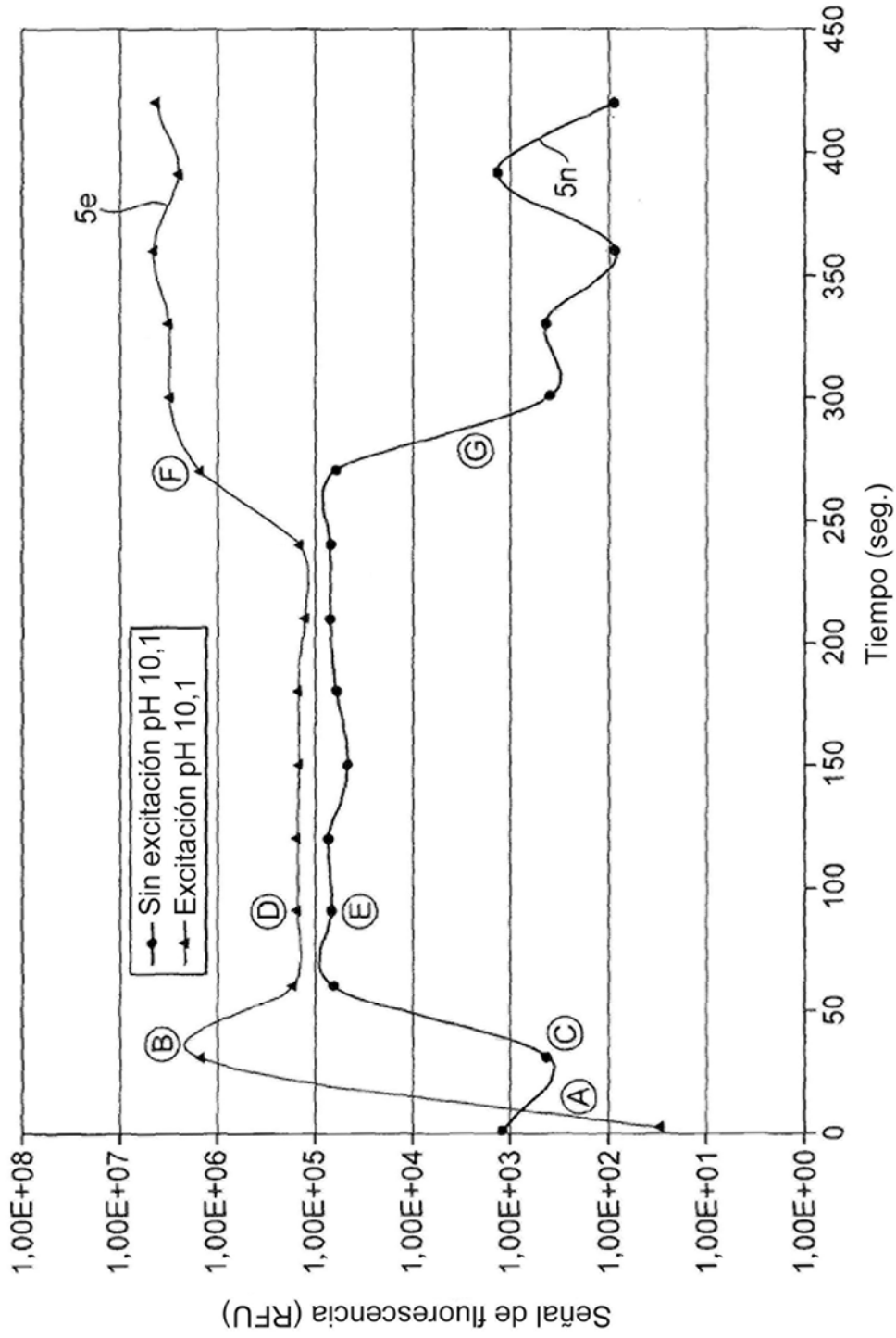


FIG. 5

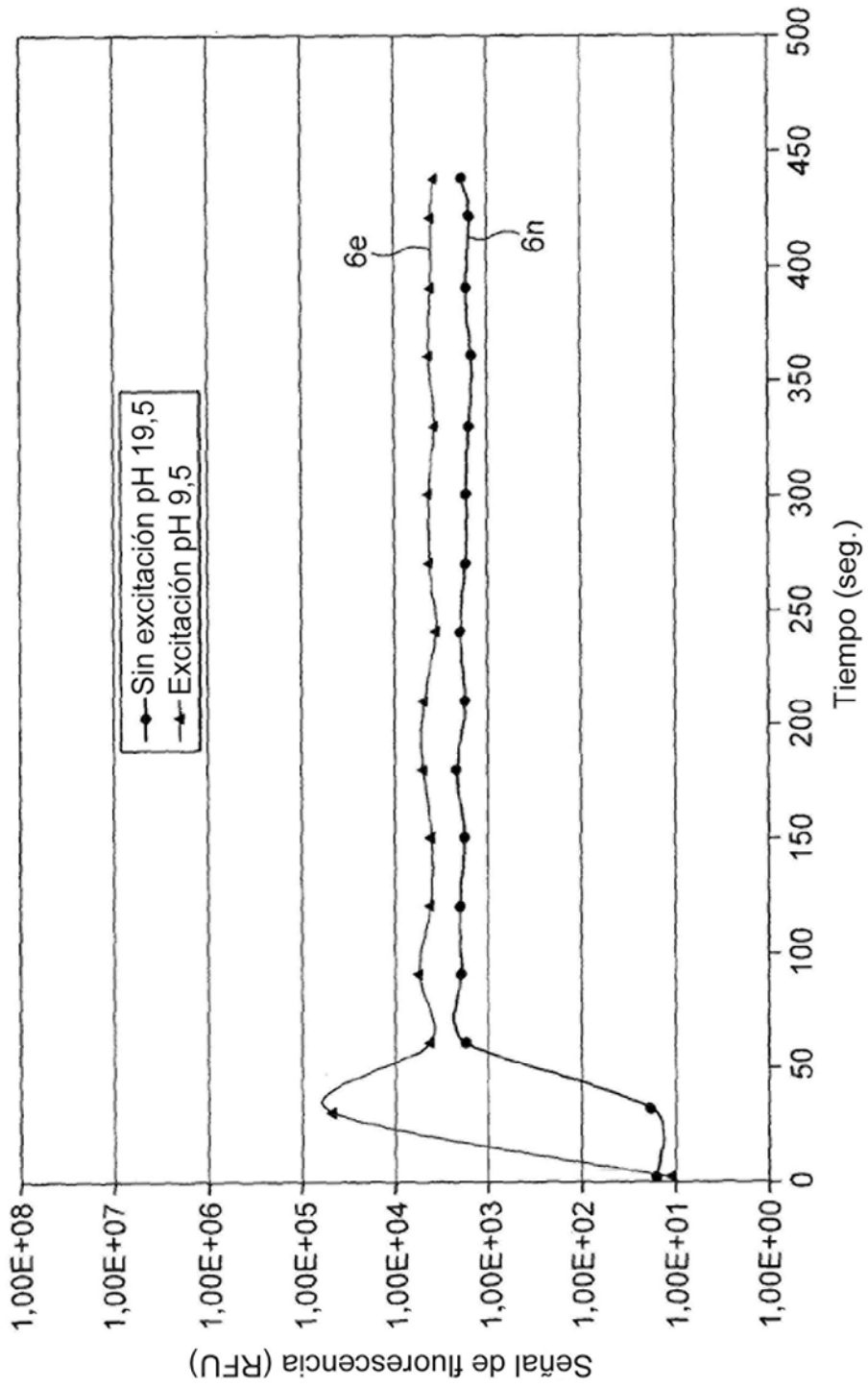


FIG. 6

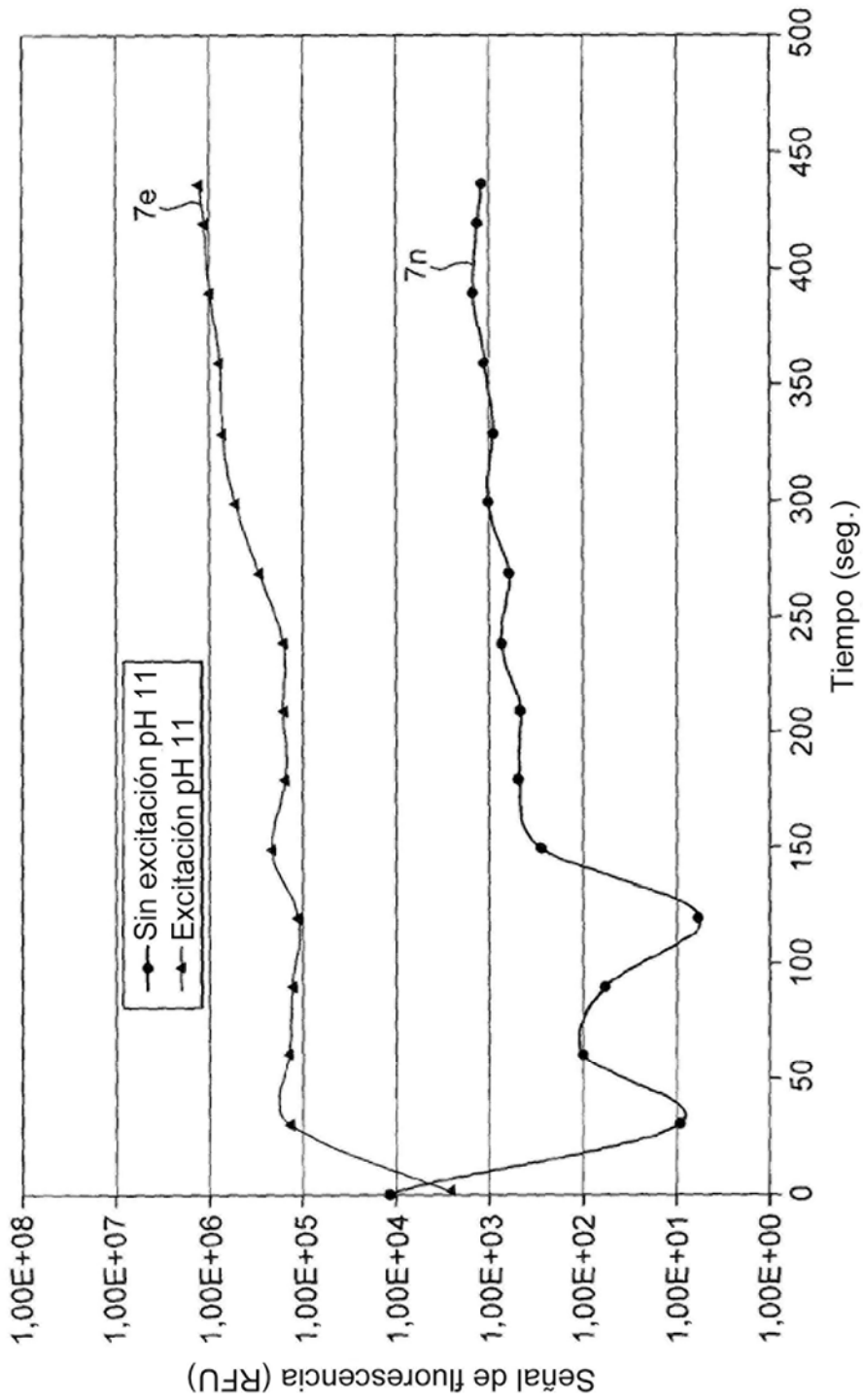


FIG. 7

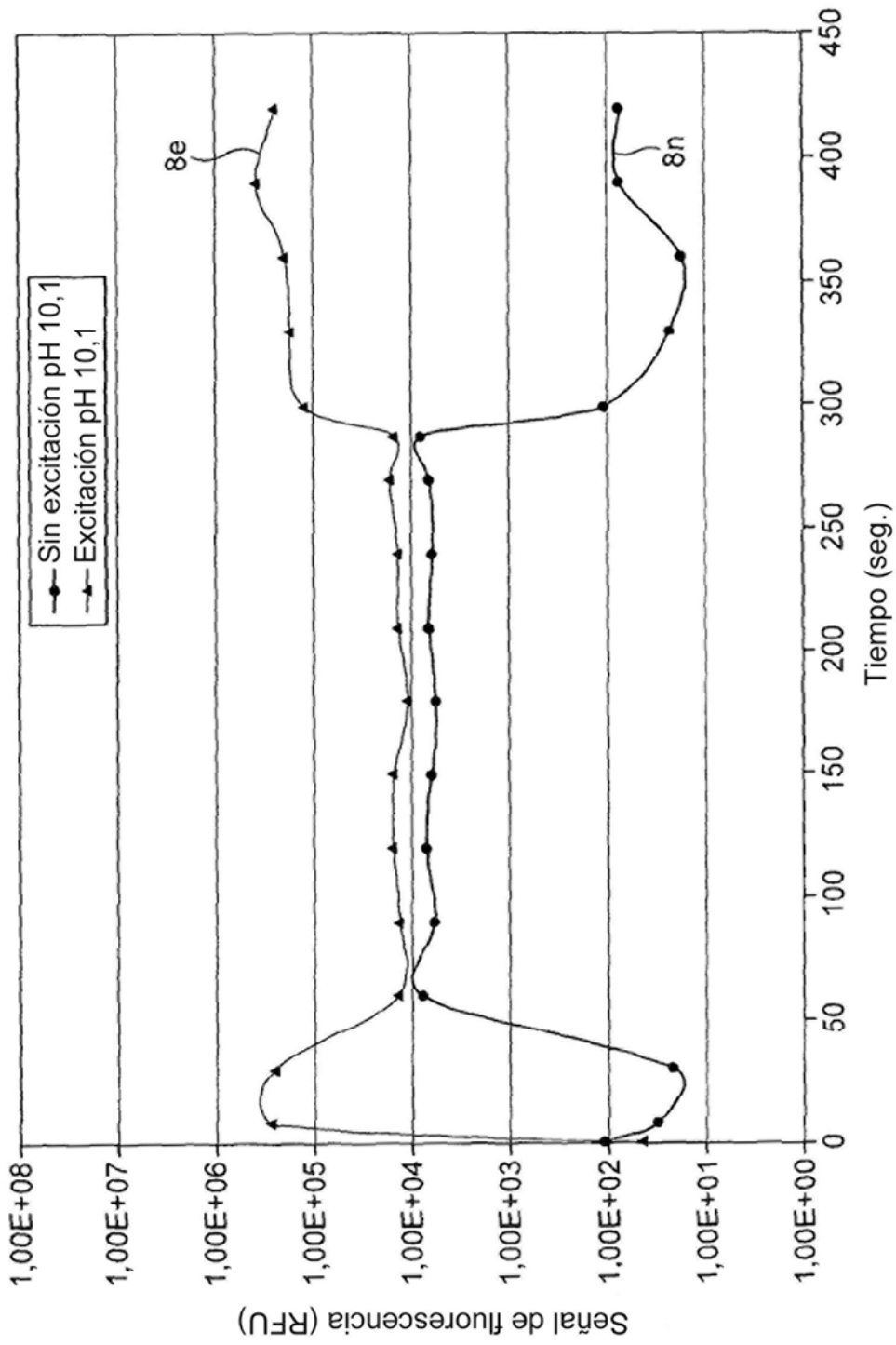


FIG. 8

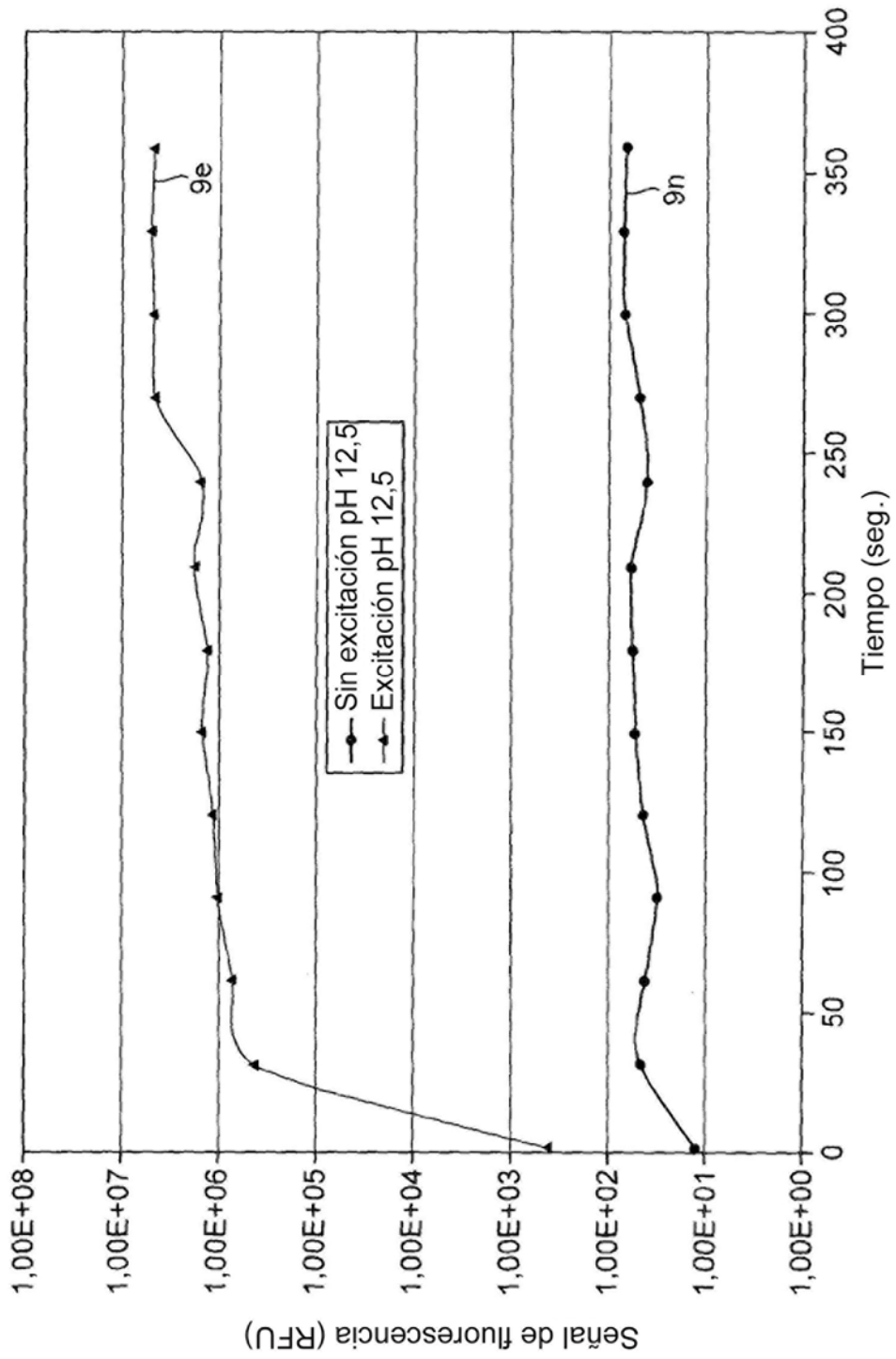


FIG. 9

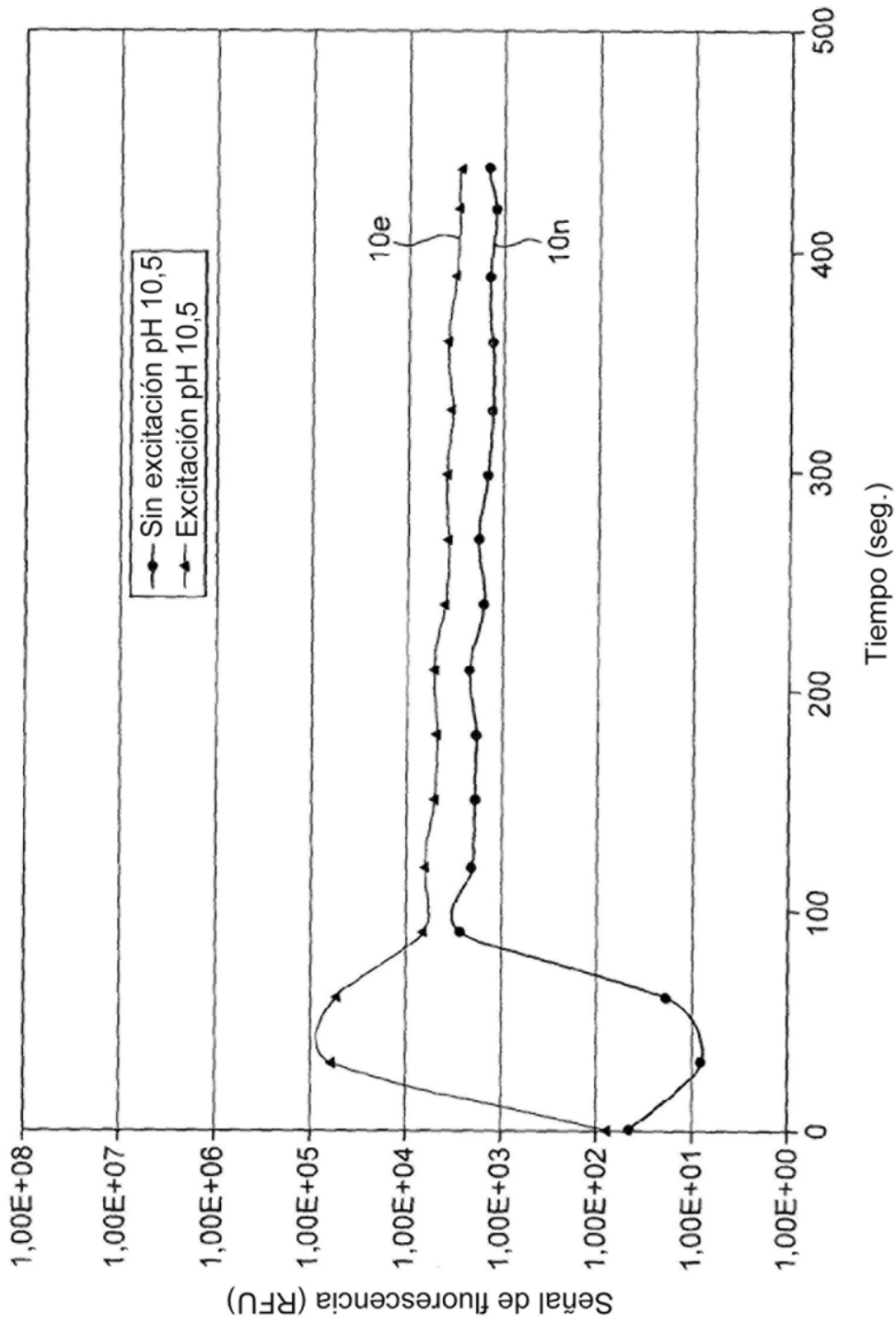
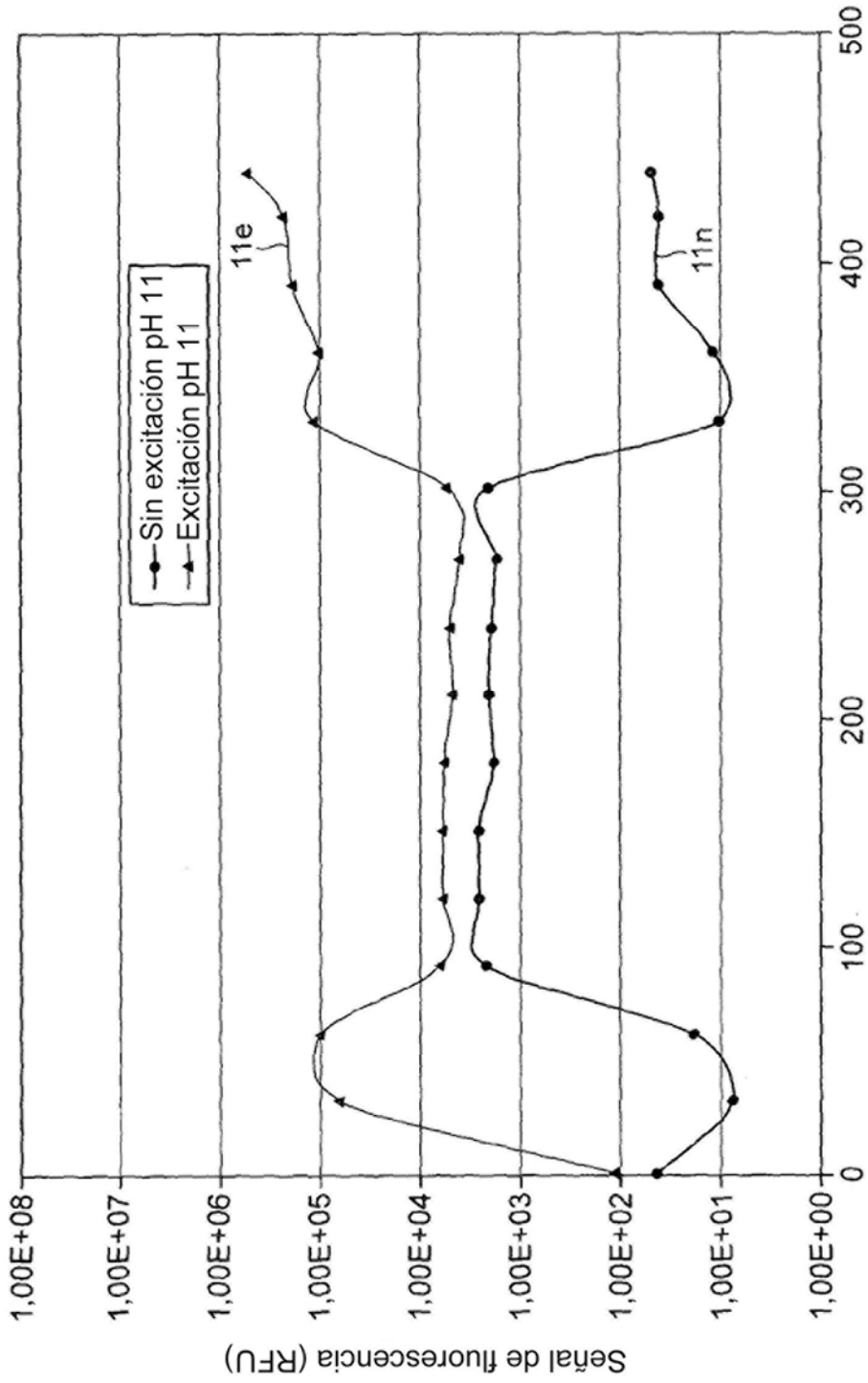


FIG. 10



Tiempo (seg.)

FIG. 11

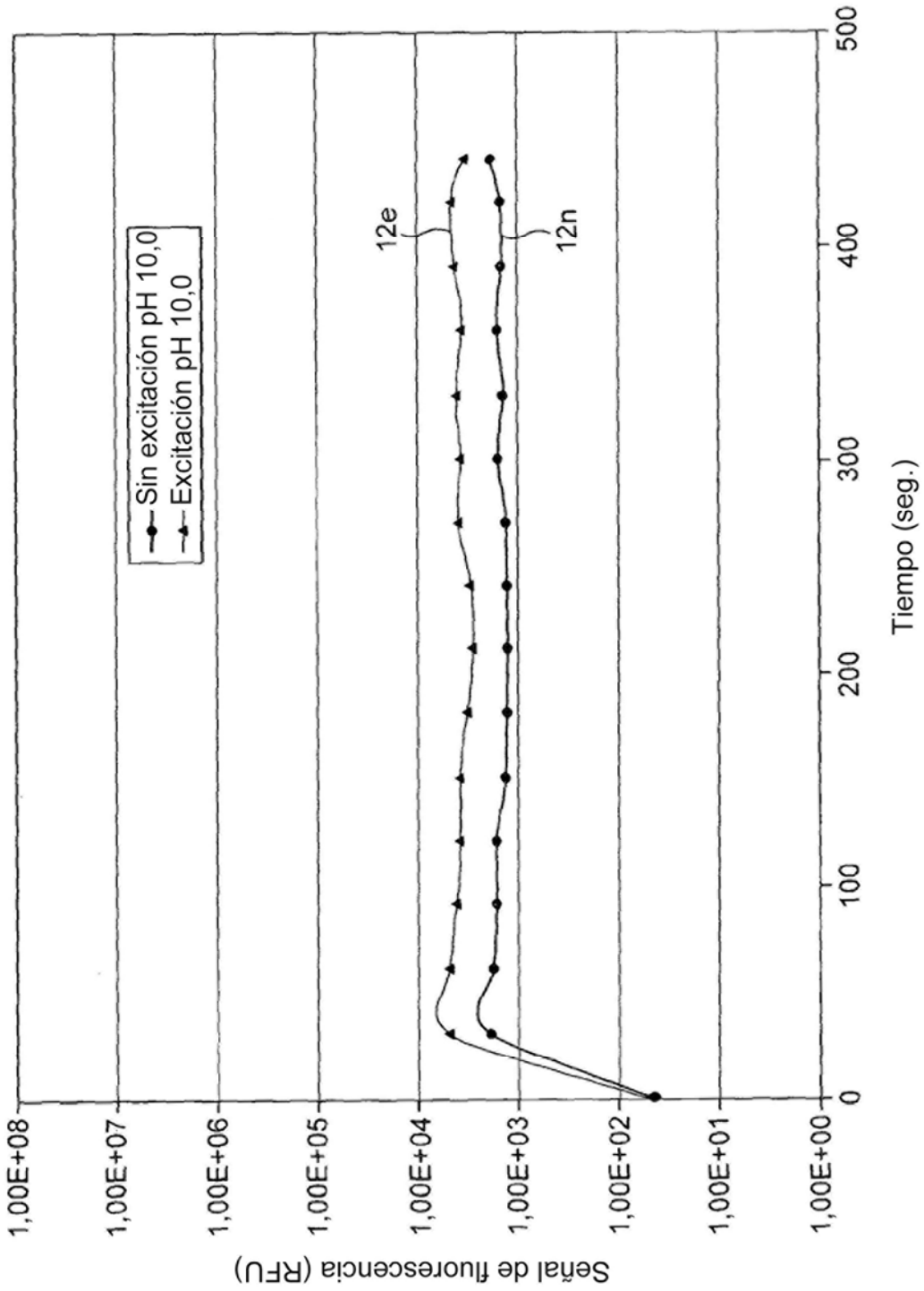


FIG. 12

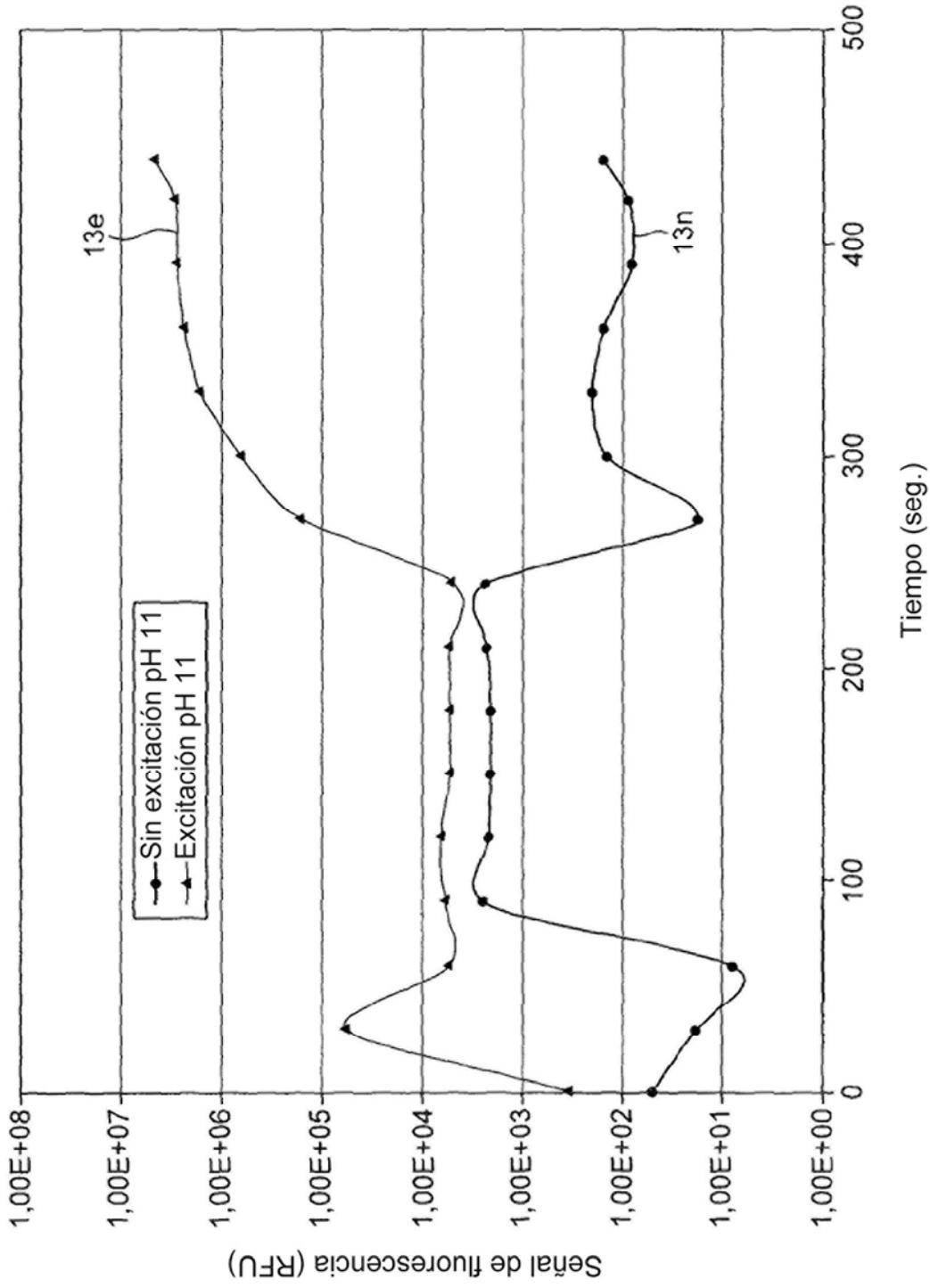


FIG. 13

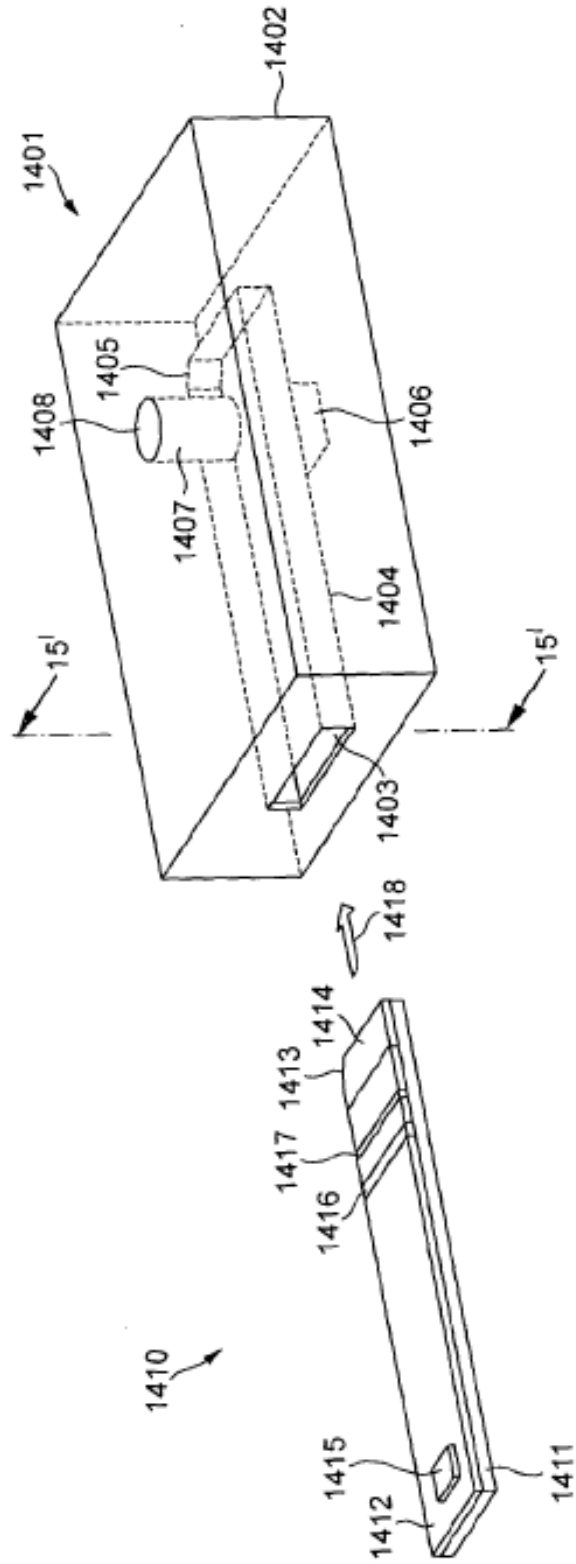


FIG. 14

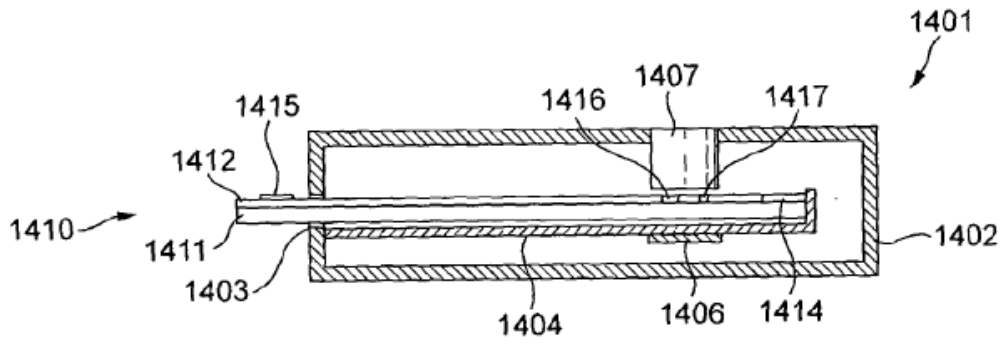


FIG. 15

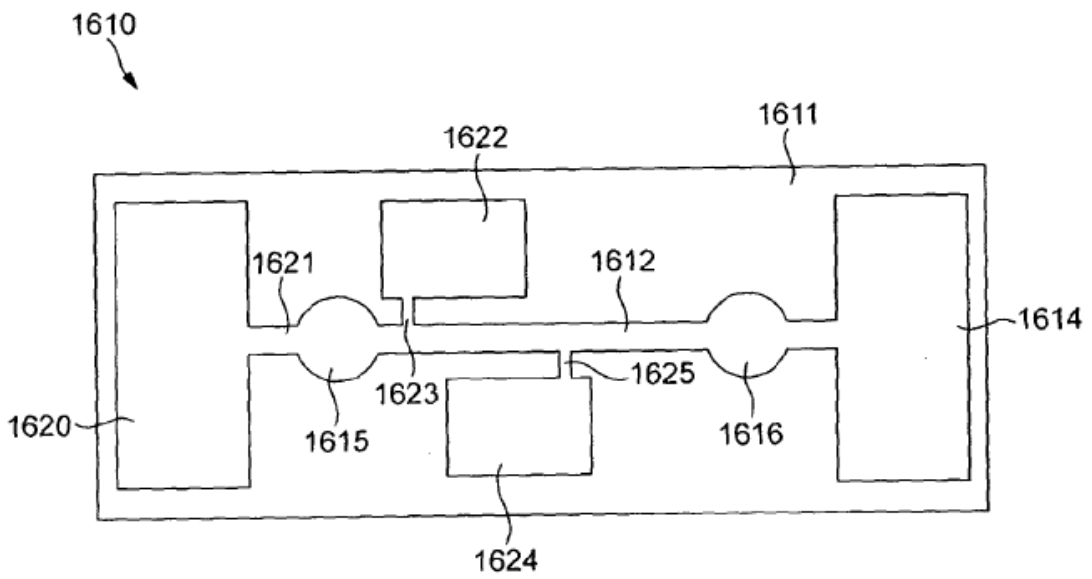
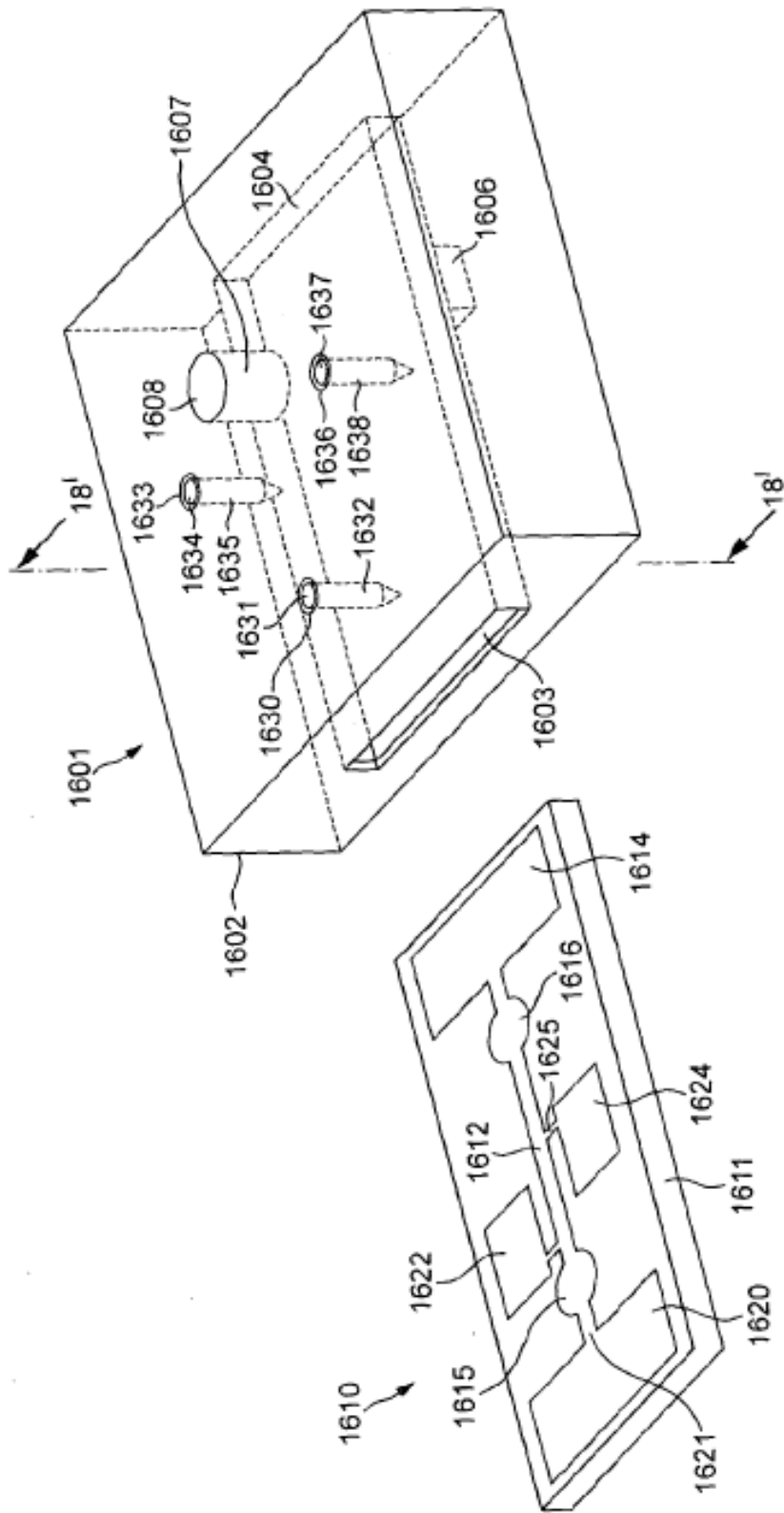


FIG. 16



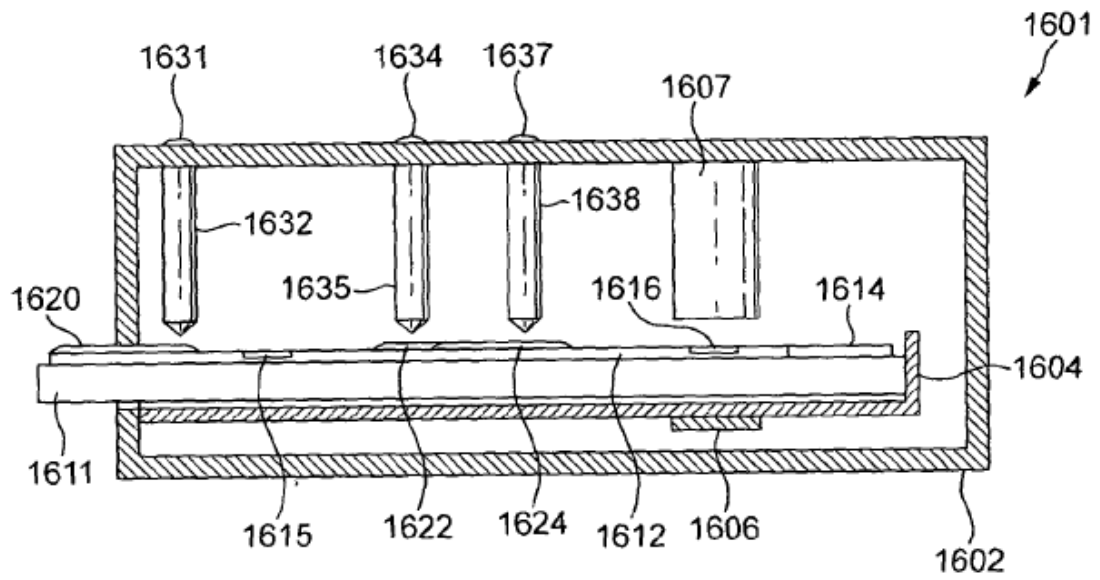


FIG. 18

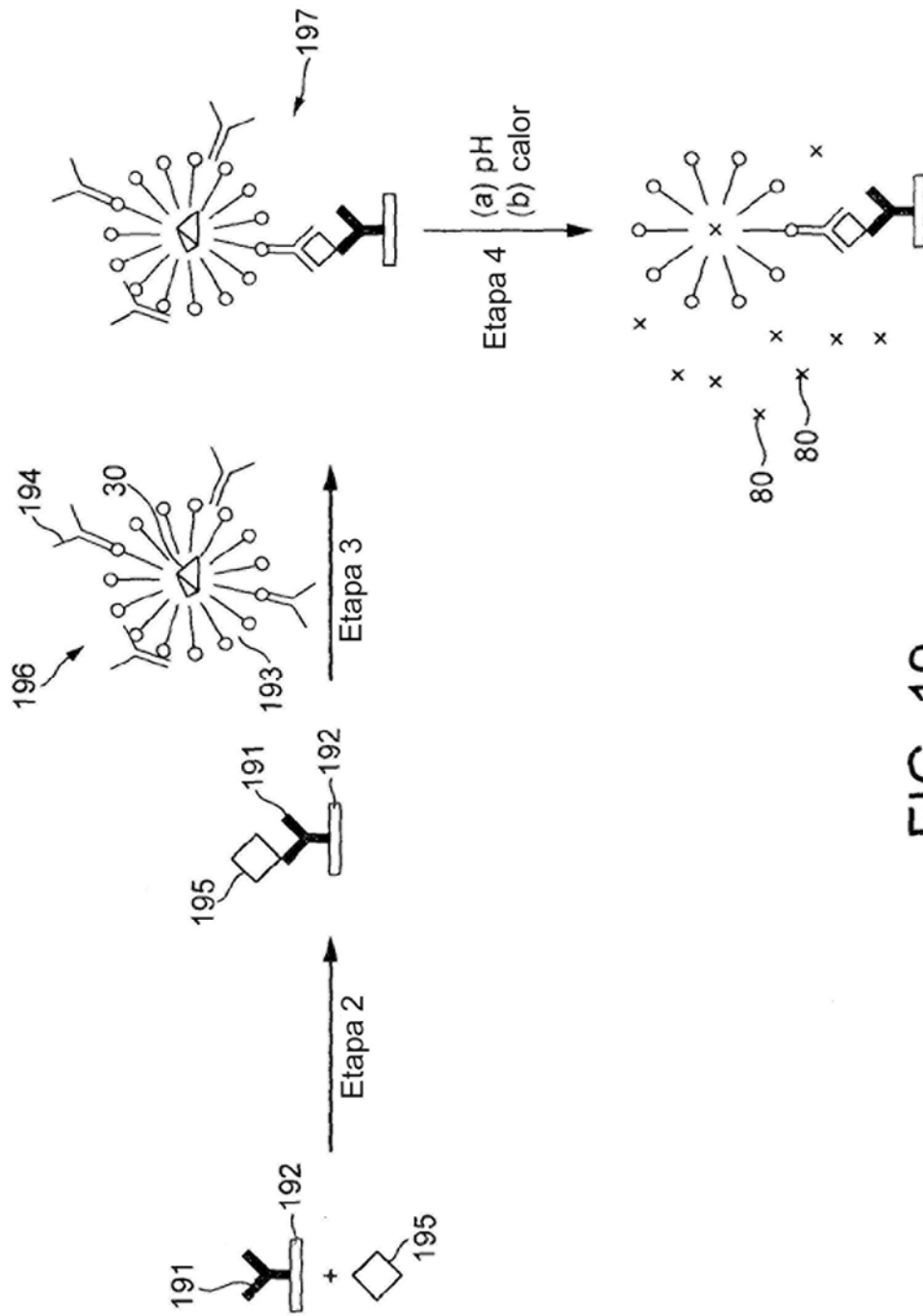


FIG. 19

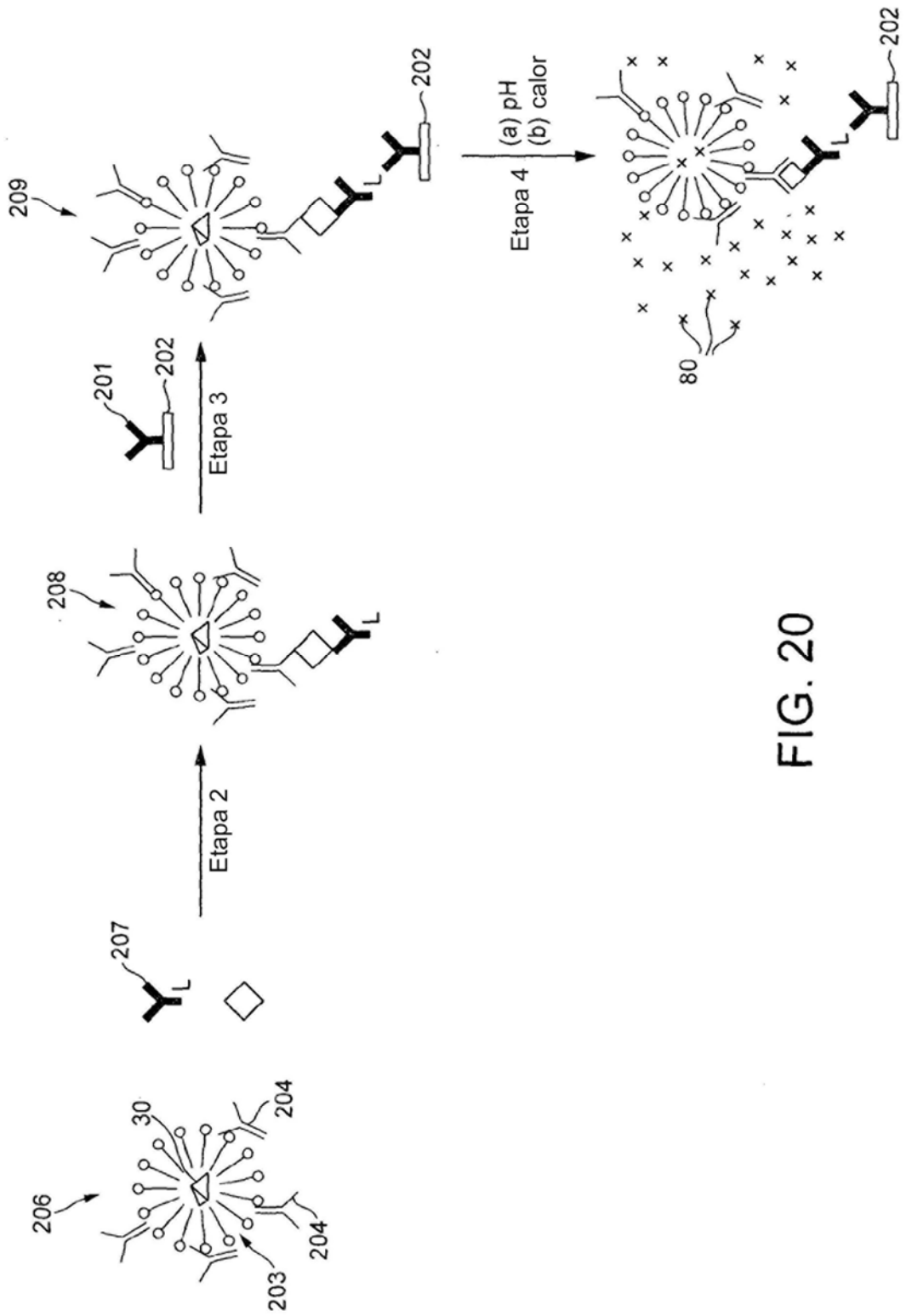


FIG. 20

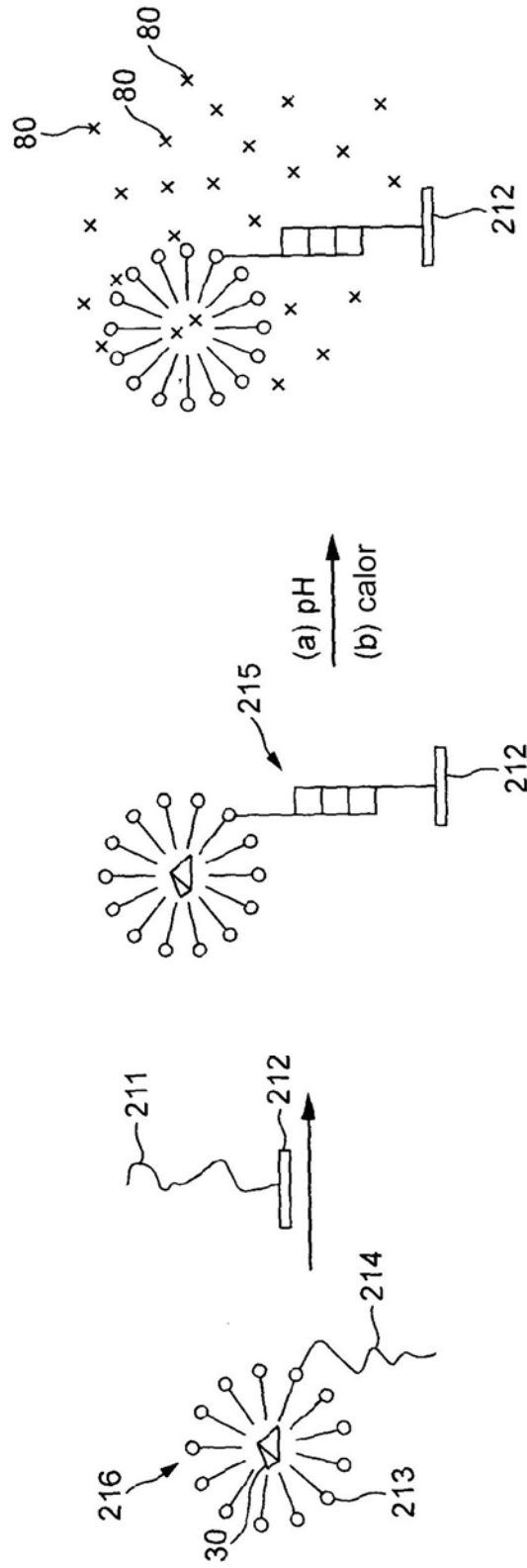


FIG. 21

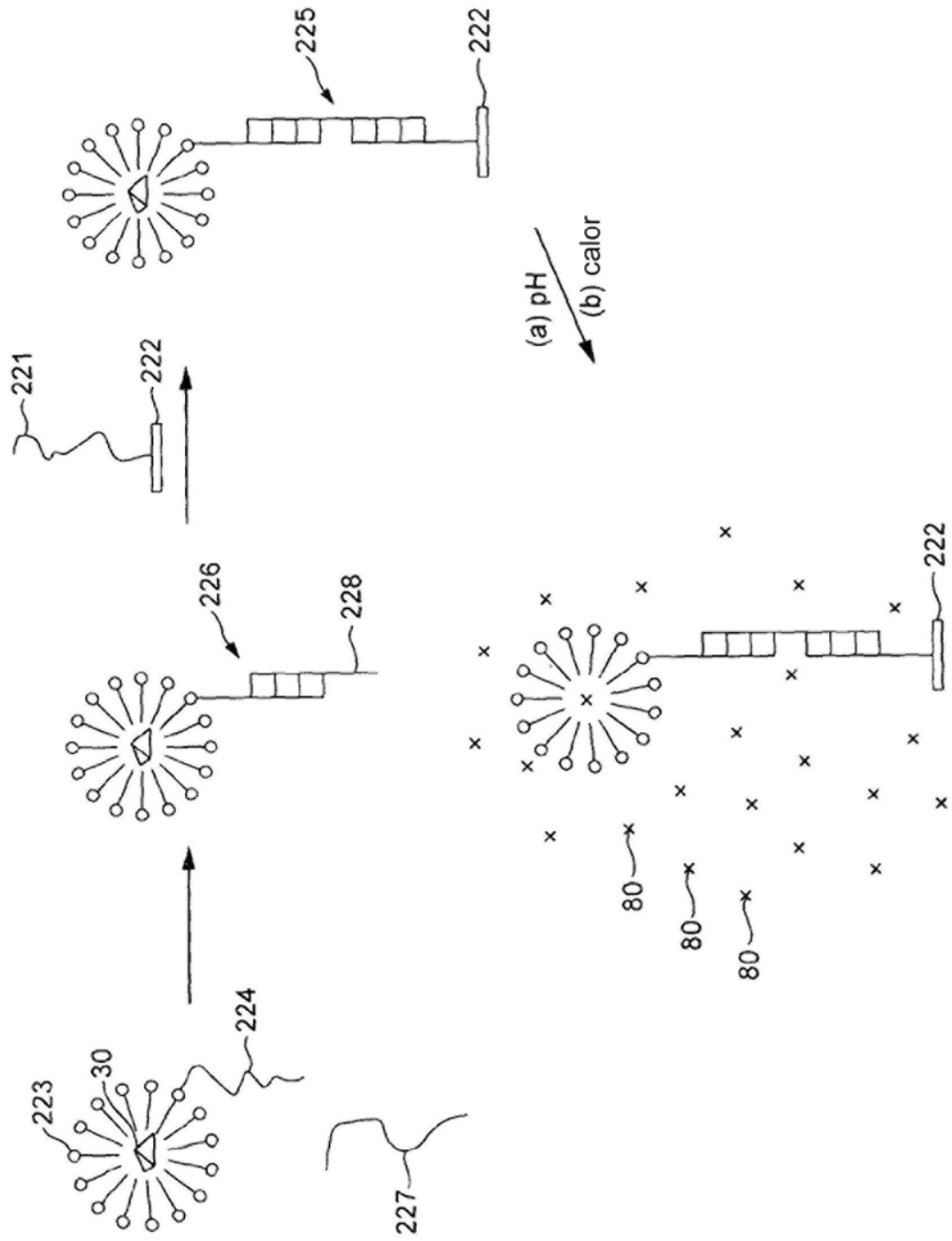


FIG. 22