(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 695 165**

(51) Int. CI.:

G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027025**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152165**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14768580 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2970852**

(54) Título: **Inmunoensayos luminiscentes de canalización de oxígeno que utilizan la descarga electroquímica del oxígeno singlete y métodos de producción y uso de los mismos**

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201361788692 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2019

(73) Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC. (100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US

(72) Inventor/es:

LEDDEN, DAVID J.

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayos luminiscentes de canalización de oxígeno que utilizan la descarga electroquímica del oxígeno singlete y métodos de producción y uso de los mismos.

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patentes de los Estados Unidos No. 61/788.692, presentada el 15 de marzo de 2013.

Antecedentes

Las tecnologías de inmunoensayo se usan ampliamente en el campo de los diagnósticos médicos. Un ejemplo de un inmunoensayo usado comercialmente es la tecnología de inmunoensayo de luminiscencia inducida (LOCI®). El inmunoensayo de luminiscencia inducida se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.340.716 (Ullman). La tecnología LOCI® actualmente disponible implica un ensayo homogéneo (es decir, sin etapas de lavado involucradas) que tiene alta sensibilidad, y el ensayo usa varios reactivos y requiere que dos de estos reactivos (conocidos como "sensibead" y "chemibead") contenidos por otros reactivos de inmunoensayo estén cerca para lograr una señal. Al exponerse a la luz a una cierta longitud de onda, el sensibead libera oxígeno singlete, y si las dos perlas están muy cerca, el oxígeno singlete se transfiere el chemibead; esto provoca una reacción química que da como resultado que el chemibead emita luz que se puede medir a una longitud de onda diferente. Un biosensor que puede usarse para la cuantificación de un componente o analito específico en una muestra líquida se divulga en el documento WO 03/012422 A1. Este documento divulga un sensor electroquímico para medir un primer analito en una muestra, donde el sensor comprende un electrodo de trabajo que está en contacto con una peroxidasa y un mediador redox, en donde el mediador redox puede ser un compuesto capaz de generar quimioluminiscencia. Además, Duran et al.: "Singlet oxygen formation during peroxidase catalyzed degradation of carcinomig N-nitrosamine", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC: ORLANDO, FL, EE.UU., vol.83, no. 1, 14 de julio de 1978, páginas 287-294, divulga que la peroxidasa es capaz de generar oxígeno singlete. Además, el documento US 5340716 divulga un método y un kit para determinar un analito que implica un ensayo homogéneo I basado en perlas, cuyo oxígeno singlete se genera mediante fotosensibilización, que activa un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo.

Sin embargo, existen obstáculos para esta tecnología. Hay múltiples factores que pueden contribuir a la señal de fondo, tales como, pero sin limitarse a, (1) la unión no específica de dos perlas entre sí, y (2) la presencia de dos perlas no unidas que están simplemente muy cerca la una de la otra. Por estas razones, la mezcla de reacción final se diluye antes de la exposición a la luz para disociar las perlas unidas no específicamente y para aumentar la distancia media de las partículas entre las perlas no unidas. Además, dado que el ensayo es homogéneo, se requiere separación por plasma, y por lo tanto, la sangre entera no puede usarse directamente en esta plataforma de diagnóstico.

El concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados se refieren a composiciones, ensayos y métodos de uso nuevos y mejorados de los mismos; esta tecnología proporciona un formato de ensayo heterogéneo en el que la señal de fondo se reduce o se elimina y no se requiere separación de plasma. La invención se define en las reivindicaciones.

Descripción de las diversas vistas de los dibujos

La Figura 1 ilustra una realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 2 ilustra una segunda realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 3 ilustra una tercera realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 4 ilustra otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 5 ilustra otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 6 ilustra aún otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 7 ilustra aún otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 8 ilustra aún otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se divulga en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica de síntesis y química médica y farmacéutica descritas aquí son las bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica.

Todas las patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones no de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a los que pertenecen este concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en la presente memoria pueden realizarse y ejecutarse sin una experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación.

Como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

El uso de la palabra "un" o "uno, una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno, una", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cuando se utiliza el término "aproximadamente", el valor designado puede variar en más o menos doce por ciento, u once por ciento, o diez por ciento, o nueve por ciento, u ocho por ciento, o siete por ciento, o seis por ciento, o cinco por ciento, o cuatro por ciento, o tres por ciento, o dos por ciento, o uno por ciento. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye tanto uno como cualquier cantidad mayor a uno, incluyendo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1.000 o más, dependiendo del término al cual está unido; además, las cantidades de 100/1.000 no deben considerarse limitantes, ya que los límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término "al menos uno de X, Y y Z" incluye X solamente, Y solamente, y Z solamente, así como cualquier combinación de X, Y y Z. El uso de ordinal la terminología numérica (es decir, "primero", "segundo", "tercero", "cuarto", etc.) tiene el único propósito de diferenciar dos o más elementos y no implica ninguna secuencia, orden o importancia para un elemento sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.

Como se usa en esta memoria descriptiva y una reivindicación o reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de, que comprende, tal como "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de, que tiene, tal como "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de, que incluye, tal como "incluye") o "que contiene" (y cualquier forma de, que contiene, tal como "contiene") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos adicionales, no enumerados o etapas de método.

El término "o combinaciones de los mismos" tal como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" está destinado a incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la materia entenderá que, por lo general, no existe un límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente a partir del contexto.

Como se usa en el presente documento, la frase "asociado con" incluye la unión covalente de una unidad estructural a otra unidad estructural mediante un enlace directo o a través de un grupo espaciador, unión no covalente de una unidad estructural a otra unidad estructural ya sea por unión directa o a través de un grupo espaciador, unión no covalente de una unidad estructural a otra unidad estructural ya sea directamente o por medio de mediante miembros pares de unión específica con las unidades estructurales, incorporación de una unidad estructural en otra unidad estructural tal como mediante la disolución de una unidad estructural en otra unidad estructural o mediante síntesis, y recubrimiento de una unidad estructural sobre otra unidad estructural, por ejemplo.

El término "purificado" como se usa en el presente documento significa que se consigue al menos una orden de magnitud de purificación en comparación con el material de partida o el material natural, por ejemplo, pero no a modo

de limitación, dos, tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud de purificación del material de partida o del material natural. De este modo, el término "purificado" tal como se utiliza en la presente memoria no significa necesariamente que el material esté 100% purificado, y por lo tanto tal término no excluye la presencia de otro u otros materiales presentes en la composición purificada.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que los términos "sustancialmente" y "aproximadamente" no están limitados a los términos específicos calificados por estos adjetivos/adverbios, sino que permiten variaciones menores y/o desviaciones que no resultan en un impacto significativo en el mismo. Por ejemplo, en ciertos casos, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor y/o la variación que existe entre los sujetos de estudio. De manera similar, el término "sustancialmente" también puede referirse a 80% o más, tal como 85% o más, o 90% o más, o 95% o más, o 99% o más, y similares.

Los términos "análogo" y "derivado" se usan en la presente memoria indistintamente y se refieren a una sustancia que comprende la misma estructura de carbono básica y función de carbono en su estructura tal como un compuesto dado, pero también pueden contener una o más sustituciones de la misma. El término "sustitución" como se usa en este documento se entenderá que se refiere el reemplazo de al menos un sustituyente en un compuesto con un residuo R. En ciertas realizaciones no limitantes, R puede incluir H, hidroxilo, tiol, un halógeno seleccionado de fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro, un compuesto C1-C4 seleccionado de uno de los siguientes: alquilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, y alquenilo lineal ramificado o cíclico, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan de uno o más de alquenilalquilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo, y arilheterocicloalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido en donde los sustituyentes opcionales se seleccionan de uno o más de alquenilalquilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilalquilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, fenilo, ciano, hidroxilo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH(cicloalquilo)2, carboxi y -C(O))-alquilo.

En realizaciones particulares, el término "análogo", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se une al mismo compañero de unión (es decir, anticuerpo) como un analito objetivo pero que es químicamente diferente del analito objetivo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cuando el analito objetivo es un péptido, polipéptido o proteína, el analito objetivo puede poseer un epítopo al que se une un compañero de unión (es decir, para asociación indirecta de la composición quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y/o sensibilizador con el analito objetivo). En este ejemplo, un análogo del analito objetivo posee un epítopo que es idéntico al epítopo del analito objetivo que es reconocido por el compañero de unión; por lo tanto, el análogo es capaz de unirse al compañero de unión al que se une el analito objetivo, incluso a través del analito puede tener una secuencia de aminoácidos diferente que el analito objetivo y, por lo tanto, ser menos del 100% idéntico al mismo.

El término "muestra", como se usa en la presente memoria, se entenderá que incluye cualquier tipo de muestra biológica que pueda utilizarse de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. Los ejemplos de muestras biológicas que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, sangre entera o cualquier porción de la misma, plasma, suero, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), piel, fluidos intersticiales, lágrimas, moco, orina, hisopos, y similares.

El término "compañero de unión" como se usa en el presente documento se entenderá que se refiere a cualquier molécula capaz de asociarse con otra molécula. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la pareja de unión puede ser un anticuerpo (que incluye anticuerpos policlonales o monoclonales), fragmentos de anticuerpos (tales como, pero sin limitación, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv, Fd, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios y otros fragmentos de anticuerpos que retienen al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto), un receptor, un ligando, aptámeros, proteínas o péptidos sustitutos de anticuerpos (es decir, proteínas/péptidos de unión modificados genéticamente), polímeros de impresión molecular (es decir, matrices inorgánicas), combinaciones o derivados de los mismos, así como cualquier otra molécula capaz de unirse específicamente al analito.

Volviendo ahora a realizaciones particulares del concepto o conceptos de la invención ahora reivindicados y divulgados, se divulgan composiciones de ensayo así como kits que los contienen y sus métodos de uso. En algunas realizaciones de ensayo, los miembros del sistema de producción de señal (sps) comprenden un electrodo y una composición quimioluminiscente, donde la excitación del electrodo da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. Un miembro del sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro del sps enlazados y/o no enlazados, es decir, la cantidad de miembro del sps enlazados o no al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad de analito a ser detectado. Un ejemplo de realización de una plataforma de ensayo en la que se basan el o los conceptos de la invención divulgados y reivindicados es el inmunoensayo de luminiscencia inducida (LOCI®). El inmunoensayo de luminiscencia inducida se divulga en la patente de Estados Unidos No. 5.340.716 (Ullman).

El o los conceptos de la invención divulgados y reivindicados ahora proporcionan un nuevo método para generar oxígeno singlete en comparación con el ensayo LOCI® disponible actualmente, eliminando el sensibead de la tecnología actual y reemplazándolo con un electrodo. Un complejo tipo sándwich (formado por un analito objetivo unido directa o indirectamente a un compuesto quimioluminiscente) se captura en el electrodo (a través de la unión directa o

indirecta del analito objetivo al mismo, como se divulga en mayor detalle a continuación). Una vez que se ha capturado el complejo, la mezcla se puede lavar, si se desea, proporcionando así un formato de ensayo heterogéneo en el que todas las partículas no específicamente unidas se pueden eliminar por lavado. Una molécula generadora de oxígeno singlete puede luego lavarse sobre el complejo capturado, y se puede aplicar un potencial al electrodo. Esto provoca la generación de oxígeno singlete que reacciona solo con el compuesto quimioluminiscente capturado, generando así una señal de luz. De esta manera, el sistema instrumental utilizado se simplifica, ya que no se requiere una fuente de luz para generar oxígeno singlete. Además, el reemplazo del sensibead con el electrodo elimina cualquier transferencia no deseada de señales sensibead-chemibead no específica (es decir, compuesto quimioluminiscente), proporcionando así un formato de ensayo con señal de fondo muy baja, así como una alta sensibilidad.

En una primera realización, el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgado y reivindicado se refieren a una composición que contiene un sistema de detección quimioluminiscente. La composición incluye un electrodo capaz de unirse directa o indirectamente a un analito objetivo y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado. La composición incluye además una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo y una composición que comprende un generador de oxígeno singlete.

En una segunda realización, el concepto o conceptos de la invención divulgados y reivindicados se refieren a una composición que contiene un sistema competitivo de detección quimioluminiscente. Dicha composición es similar a la composición descrita anteriormente, excepto que el electrodo o la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete se proporciona con un analito objetivo o un análogo del mismo unido a él que compite con el analito objetivo presente en una muestra para unirse a el otro componente.

Cualquiera de las composiciones descritas anteriormente o contempladas en el presente documento puede incluir además una solución de lavado. Además, cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento o bien contempladas en la presente memoria también puede incluir un dispositivo de microfluidos en el que están dispuestos uno o más de los componentes descritos anteriormente.

El término "electrodo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de conductor o medio que sea capaz de funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. Los ejemplos no limitantes de electrodos que caen dentro del alcance de los conceptos de la invención divulgados y reivindicados incluyen celdas electroquímicas que comprenden una pluralidad de electrodos. Ejemplos de construcciones de celdas electroquímicas incluyen una celda de dos electrodos que comprende un electrodo indicador y un electrodo de referencia, una celda de dos electrodos que comprende un ánodo y un cátodo, una celda de tres electrodos que comprende un ánodo, un cátodo y un electrodo de referencia y una célula de cuatro electrodos que comprende dos electrodos de trabajo, un electrodo contrario y un electrodo de referencia.

El término "generador de oxígeno singlete" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que sea capaz de generar oxígeno singlete de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención ahora divulgados y reivindicados. Los ejemplos no limitantes de generadores de oxígeno singlete que caen dentro del alcance de los conceptos de la invención divulgados y reivindicados incluyen Rosa de Bengala, Azul de Metileno, Eosina, Porfirina o Porfirinas y Ftalocianinas, y combinaciones de los mismos.

Un compuesto quimioluminiscente (agente quimioluminiscente) es un compuesto que es químicamente activable y, como resultado de dicha activación, emite luz a una cierta longitud de onda. Ejemplos de agentes quimioluminiscentes, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen olefinas capaces de reaccionar con oxígeno singlete o un peróxido para formar hidroperóxidos o dioxetanos, que pueden descomponerse en cetonas o derivados de ácido carboxílico; dioxetanos estables que pueden descomponerse por la acción de la luz; acetilenos que pueden reaccionar con oxígeno singlete para formar dicetonas; hidrazonas o hidrazidas que pueden formar compuestos azo o azo carbonilos tales como luminol; y compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, por ejemplo. Como consecuencia de la reacción de activación, los quimioluminiscentes causan directa o indirectamente la emisión de luz.

En ciertas realizaciones, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete puede ser una sustancia que sufre una reacción química con el oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o subsiguiente de la luz. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete puede asociarse con el analito objetivo por cualquier método conocido en la técnica; por ejemplo, pero no a modo de limitación, la composición puede tener un segundo compañero de unión específico del analito asociado con la misma que permita la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente con el analito objetivo. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente puede ser directamente excitada por el compuesto quimioluminiscente activado; alternativamente, la composición puede comprender además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado. Ejemplos particulares, no limitativos, de compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención divulgados y reivindicados se exponen en la patente de Estados unidos No. 5.340.716 (Ullman, et al).

En ciertas realizaciones del concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados, el electrodo puede ser capaz de unirse indirectamente al analito objetivo a través de una asociación con estreptavidina (es decir, un recubrimiento de estreptavidina dispuesto sobre al menos una porción de una superficie del electrodo). De esta manera,

la biotina se asocia con un primer compañero de unión específico del analito, y la unión de estreptavidina y biotina, en combinación con la unión del primer compañero de unión específico del analito con el analito objetivo, da como resultado la asociación indirecta del electrodo al analito objetivo.

Los reactivos de las composiciones/kits/métodos pueden proporcionarse en cualquier forma que les permita funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los reactivos pueden disponerse en forma de reactivos liofilizados de alícuota única. El uso de reactivos secos en dispositivos de microfluidos se describe en detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos en tramite junto con la presente No. 61/562.677.

El concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados incluyen adicionalmente kits útiles para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito; el kit puede contener cualquier combinación de los componentes/reactivos descritos anteriormente siempre que estén presentes los componentes/reactivos mencionados en la reivindicación 1. Además, el kit puede contener además otro u otros reactivos para llevar a cabo cualquiera de los ensayos particulares descritos o contemplados en el presente documento. La naturaleza de este reactivo o reactivos adicionales dependerá del formato de ensayo particular, y su identificación está dentro de los conocimientos de un experto en la técnica.

Los componentes/reactivos pueden estar cada uno en contenedores/compartimentos separados, o se pueden combinar diversos componentes/reactivos en uno o más contenedores/compartimentos, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los componentes/reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empacados por separado para llevar a cabo un ensayo, tales como miembros adicionales del sbp, miembros del sps y reactivos auxiliares, por ejemplo. Además, el kit puede incluir un dispositivo de microfluidos en el que los componentes/reactivos están dispuestos.

Las cantidades relativas de los diversos componentes/reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los componentes/reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que necesitan producirse durante los procedimientos de ensayo y además optimizan sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, se pueden proporcionar uno o más de los componentes/reactivos en el kit como un polvo seco, tal como un polvo liofilizado, y el kit puede incluir adicionalmente un excipiente o excipientes para la disolución de los reactivos secos; de esta manera, se puede obtener a partir de estos componentes una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. Se pueden incluir controles positivos y/o negativos con el kit. El kit puede incluir además un conjunto de instrucciones escritas que explican cómo usar el kit. Un kit de esta naturaleza se puede usar en cualquiera de los métodos descritos o contemplados en este documento.

El concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados se refieren adicionalmente a un dispositivo de microfluidos que incluye una cámara de aplicación de muestra en la que se puede aplicar una muestra y un canal de entrada en comunicación fluida con ella que también está en comunicación fluida con uno o más compartimentos que contienen uno o más de los componentes descritos aquí anteriormente (es decir, electrodo (con o sin analito objetivo (o un análogo del mismo) unido a él), composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y una composición que comprende un generador de oxígeno singlete). El dispositivo puede estar provisto con cualquier disposición de los compartimentos y la distribución del componente o componentes entre los mismos que permita que el dispositivo funcione de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados; ejemplos no limitativos de estructura del dispositivo se proporcionan en las Figuras con fines ilustrativos solamente.

Cualquiera de los compartimentos del dispositivo de microfluidos puede sellarse para mantener el o los reactivos dispuestos en el mismo en un entorno sustancialmente hermético al aire hasta su uso; por ejemplo, los compartimentos que contienen reactivo o reactivos liofilizados pueden sellarse para evitar cualquier reconstitución involuntaria del reactivo. El canal de entrada y un compartimento, así como dos compartimentos, se pueden describir como "capaces de estar en comunicación fluida" entre sí; esta frase indica que el o los compartimentos pueden aún estar sellados, pero los dos compartimentos son capaces de tener un flujo de fluido entre ellos tras la perforación de un sello formado allí o entre ellos.

Los dispositivos de microfluidos del concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados pueden proporcionarse con cualesquiera otras características deseadas conocidas en la técnica o bien contempladas en el presente documento. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los dispositivos de microfluidos del concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados pueden incluir además una cámara de lectura. La cámara de lectura puede ser el compartimento en el que está dispuesto el electrodo, o la cámara de lectura puede estar en comunicación fluida con el compartimento en el que está dispuesto el electrodo. El dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimentos que contienen otras soluciones, tales como, entre otras, soluciones de lavado, soluciones de dilución, excipientes, soluciones de interferencia, controles positivos, controles negativos, controles de calidad y similares. Por ejemplo, el dispositivo de microfluidos puede incluir uno o más compartimentos que contienen una solución de lavado, y este compartimiento o compartimentos pueden estar en comunicación fluida con cualquier otro compartimiento o compartimentos del dispositivo. En otro ejemplo, el dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimentos que contienen al menos un excipiente para la disolución de uno o más reactivos secos, y el compartimento o compartimentos pueden estar en comunicación fluida con cualquier otro

compartimento o compartimientos del dispositivo. En otro ejemplo adicional, el dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimentos que contienen una solución de dilución, y el compartimento o compartimentos pueden ser capaces de estar en comunicación fluida con cualquier otro compartimiento o compartimientos del dispositivo.

Además, cualquiera de los kits/dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en el presente documento puede incluir múltiples ensayos multiplexados en un único kit/dispositivo. Cuando están presentes múltiples ensayos, dichos ensayos pueden construirse y funcionar como se describe en este documento. Alternativamente, un ensayo como el descrito en la presente memoria se puede multiplexar con cualquier otro ensayo conocido en la técnica que sea capaz de estar contenido dentro de los kits/dispositivos de microfluidos del concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. Los ejemplos no limitantes de otros ensayos que pueden multiplexarse con los ensayos divulgados y reivindicados en este documento incluyen BMP, NT-proBNP, D-Dimer, CKMB, Mioglobina, Mieloperoxidasa, ST2, PCT, hCG, LH, FSH, iPTH, TSH, fT_4, T_4, PSA, fPSA y cPSA, y combinaciones de los mismos.

Cuando están presentes múltiples ensayos en un único dispositivo de microfluidos, se pueden conectar múltiples canales de entrada a la cámara de aplicación de muestra. En ciertas realizaciones, una parte de la muestra puede pasarse desde la cámara de aplicación de muestra a los canales de entrada múltiples sin tener en cuenta el contenido de la misma. Alternativamente, puede estar presente una estructura o estructuras en la cámara de aplicación de la muestra, los canales de entrada, y/o la conexión entre ellos que permite la separación de ciertos componentes de la muestra entera y la administración de dichos componentes a los diferentes ensayos. Un ejemplo no limitativo de un dispositivo de distribución de muestra que puede utilizarse de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados se divulga en detalle en la solicitud provisional No. 61/790.580, presentada el 15 de marzo de 2013, titulada "Microfluidic Distributing Device".

El concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados se refiere adicionalmente a un método para detectar la presencia y/o concentración de un analito objetivo en una muestra (tal como, pero sin limitarse a, sangre entera, células de sangre entera lisadas o glóbulos rojos). En una realización, el método incluye las etapas de combinación, simultánea o total o parcialmente secuencialmente: una muestra que se sospecha que contiene el analito objetivo, el electrodo, una composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, y la composición que comprende el generador de oxígeno singlete, cada uno como se describió aquí anteriormente. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente y el electrodo pueden unirse al analito objetivo, por lo que se forma el complejo en sándwich, y el electrodo se coloca muy cerca del compuesto quimioluminiscente. El complejo en sándwich se lava a continuación con una composición que comprende un generador de oxígeno singlete, y se aplica un potencial al electrodo para generar oxígeno singlete, donde la generación de oxígeno singlete en estrecha proximidad al compuesto quimioluminiscente provoca la activación del compuesto quimioluminiscente presente en el complejo en sándwich. La cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado se determina luego, y cualquiera de los pasos anteriores se puede repetir opcionalmente durante un número deseado de veces. La presencia y/o concentración del analito objetivo se detecta analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en donde la cantidad de quimioluminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

En otra realización, se proporciona un método competitivo y el electrodo tiene un analito objetivo o un análogo del mismo unido a él. De esta manera, se permite que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete se una al analito objetivo (o al análogo del mismo) unido al electrodo o analito objetivo presente en la muestra. La unión de la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete al analito objetivo (o análogo del mismo) unido al electrodo pone al electrodo muy cerca del compuesto quimioluminiscente, mientras que la unión de la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete al analito objetivo presente en la muestra impide su asociación con el electrodo. El resto del método se realiza como se describió aquí anteriormente, y la presencia y/o concentración del analito objetivo se detecta analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en donde la cantidad de quimioluminiscencia es inversamente proporcional a la cantidad de analito objetivo en la muestra.

En aún otra realización de un método competitivo, la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un analito objetivo o un análogo del mismo unido a él. De esta manera, se permite que el electrodo se una a cualquier analito objetivo (o al análogo del mismo) unido a la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete o al analito objetivo presente en la muestra. La unión del electrodo al analito objetivo (o análogo del mismo) unido a la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete pone al electrodo muy cerca del compuesto quimioluminiscente, mientras que la unión del electrodo al analito objetivo presente en la muestra evita la asociación del electrodo con la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. El resto del método se realiza como se describió aquí anteriormente, y la presencia y/o concentración del analito objetivo se detecta analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en donde la cantidad de quimioluminiscencia es inversamente proporcional a la cantidad de analito objetivo en la muestra.

Cuando la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente incluye una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, el método puede incluir además la etapa de medir la cantidad de luz emitida por las moléculas fluorescentes para determinar la cantidad de analito en la muestra.

Como se mencionó anteriormente, los diversos componentes del método se proporcionan en combinación (ya sea de manera simultánea o secuencial). Cuando los diversos componentes del método se agregan secuencialmente, el orden de adición de los componentes puede variarse; una persona con experiencia normal en la técnica puede determinar el orden de adición particular deseado de los diferentes componentes al ensayo. El orden más simple de adición, por supuesto, es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar la señal producida a partir de ellos. Alternativamente, cada uno de los componentes, o grupos de componentes, puede combinarse secuencialmente. En ciertas realizaciones, una etapa de incubación puede estar implicada después de cada adición como se discutió anteriormente.

Ciertas realizaciones del concepto o los conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados incluyen un ensayo heterogéneo; es decir, ciertas realizaciones del método pueden incluir además una o más etapas de lavado empleadas después de una etapa o etapas de incubación. Cuando los reactivos se añaden al ensayo en un formato secuencial, el método puede incluir múltiples etapas de lavado (es decir, después de cada adición de reactivo e incubación con la reacción). La etapa o etapas de lavado actúan para reducir la señal de fondo y potencialmente aumentar la sensibilidad analítica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, una realización del método puede incluir además la etapa de lavar sustancialmente la muestra no unida o no unida específicamente y/o el compuesto quimioluminiscente del electrodo antes de aplicar un potencial al electrodo.

Volviendo ahora a los Dibujos, la Figura 1 representa una primera realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el número de referencia general 10 e incluye una carcasa 12 que incluye una cámara 14 de aplicación de muestra, un canal 16 de entrada y un compartimiento/cámara 18 de lectura. Una muestra (tal como, pero no limitada a, una sangre muestra) puede aplicarse a la cámara 14 de aplicación de la muestra, que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el canal 16 de entrada. El canal 16 de entrada está en (o puede estar en) comunicación fluida con el compartimiento/cámara 18 de lectura. El compartimiento 18 contiene un electrodo 20, una cantidad predeterminada de una composición 22 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, y una cantidad predeterminada de una composición 24 que incluye un generador de oxígeno singlete. Se entenderá que si el dispositivo de microfluidos se utiliza en un formato de ensayo competitivo, el electrodo 20 o la composición 24 pueden tener un analito objetivo o un análogo del mismo unido a él.

El canal 16 de entrada puede simplemente transferir una porción de la muestra al compartimiento 18, o el canal 16 de entrada puede contener una estructura o estructuras que permiten la separación de ciertos componentes de la muestra entera (es decir, un filtro o filtros de separación que permiten la separación de plasma o glóbulos rojos de una muestra de sangre entera aplicada a la cámara 14 de aplicación de la muestra) y/o detección de degradación (tal como, pero sin limitarse a, hemólisis) en la muestra.

Cualquiera de los dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en este documento puede proporcionarse con compartimentos adicionales que contienen otros reactivos/soluciones. Por ejemplo, la Figura 2 representa un dispositivo 10a de microfluidos que es similar al dispositivo 10 de microfluidos de la Figura 1, con la excepción de que el dispositivo 10a de microfluidos está provisto de un formato de ensayo heterogéneo. Es decir, el dispositivo 10a de microfluidos incluye además un segundo compartimiento 26 que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el canal 16a de entrada y/o el primer compartimento 18a; el segundo compartimiento 26 contiene una cantidad predeterminada de solución 28 de lavado. El dispositivo 10a de microfluidos también incluye un compartimiento 30 de residuos que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el primer compartimento 18a y recibe la solución 28 de lavado una vez ha pasado a través del primer compartimento 18a. Sin embargo, el uso de una solución de lavado no debe interpretarse como limitante, y la presencia dentro del dispositivo de cualquier reactivo adicional descrito o contemplado en la presente memoria o conocido en la técnica dentro de uno o más compartimentos adicionales también cae dentro del alcance del concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 3 contiene otro ejemplo de un dispositivo de microfluidos que está provisto de compartimentos adicionales que contienen otros reactivos/soluciones. Cuando los reactivos están dispuestos en el compartimento o compartimentos (es decir, electrodo (con o sin analito objetivo (o un análogo del mismo) unido a él), el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y/o el generador de oxígeno singlete) están en forma de un reactivo seco, la muestra/plasma puede utilizarse para su reconstitución; alternativamente, el dispositivo de microfluidos puede estar provisto de uno o más compartimentos que contienen excipientes que pueden estar en (o pueden ser capaces de estar en) comunicación fluida con uno o más de los compartimientos que contienen dicho reactivo o reactivos. En la Figura 3, se muestra un dispositivo 10b de microfluidos) que es similar a los dispositivos 10 y 10a de microfluidos de las Figuras 1-2, excepto que el dispositivo 10b de microfluidos incluye además un tercer compartimento 32 que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el canal 16b de entrada y/o el primer compartimiento 18b y contiene una cantidad predeterminada de excipiente 34 para la reconstitución de al menos uno de los reactivos 20b, 22b y 24b, debe entenderse que el dispositivo 10b de microfluidos se ilustra como teniendo tanto el segundo como el tercer compartimentos 26b y 32 solo a modo de ejemplo. Cualquiera de los dispositivos divulgados o bien contemplados en el presente documento puede proporcionarse con el compartimento que contiene solo la solución de lavado o el compartimento que contiene solo excipientes. Alternativamente, cualquiera de los dispositivos descritos o contemplados en el presente documento puede proporcionarse con uno o más compartimentos que contienen solución de lavado y uno o más compartimentos que contienen excipientes.

Cualquiera de los compartimentos de cualquiera de los dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en la presente memoria puede sellarse para mantener el reactivo o los reactivos dispuestos en el mismo en un entorno sustancialmente hermético al aire y/o sustancialmente hermético a la luz hasta su uso; por ejemplo, los compartimentos que contienen un reactivo o reactivos liofilizados pueden sellarse para evitar la reconstitución involuntaria del reactivo y/o la exposición de cualquiera de los reactivos a la luz. El canal de entrada y un primer compartimento, así como dos compartimentos, se pueden describir como "capaces de comunicación fluida" entre sí; esta frase indica que el compartimento o compartimientos pueden aún estar sellados, pero son capaces de tener un flujo de fluido entre ellos tras la perforación de un sello formado entre ellos.

Además, debe entenderse que cualquiera de los dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en la presente memoria puede proporcionarse adicionalmente con cámaras adicionales y/u otros circuitos de fluidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cualquiera de los dispositivos de microfluidos puede contener adicionalmente una cámara o cámaras de mezcla y/o un circuito o circuitos de fluidos que están dispuestos entre dos cámaras de reactivo.

La Figura 4 representa otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el número de referencia general 50 y es similar a los dispositivos de microfluidos 10, 10a y 10b de las Figuras 1-3, excepto que el dispositivo de microfluidos 50 contiene dos compartimentos en los que los tres reactivos (es decir, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, el generador de oxígeno singlete y/o el electrodo (con o sin analito objetivo unido (o análogo del mismo)) están dispuestos.

El dispositivo de microfluidos 50 incluye una carcasa 52 que incluye una cámara 53 de aplicación de muestras, un canal 54 de entrada, un primer compartimento 56, un segundo compartimento 58 y un compartimento 60 de residuos. Una muestra (tal como, pero no limitada a, una muestra de sangre) puede aplicarse a la cámara 53 de aplicación de la muestra, que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el canal 54 de entrada. El canal 54 de entrada está en (o puede estar en) comunicación fluida con el primer compartimento 56. El primer compartimento 56 contiene una cantidad predeterminada de una composición 64 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y una cantidad predeterminada de electrodo 66 (con o sin analito objetivo (o análogo del mismo) unido a él). El segundo compartimiento 58 está en (o puede estar en) comunicación fluida con el canal 54 de entrada y/o el primer compartimento 56; el segundo compartimiento 58 contiene una cantidad predeterminada de una composición 68 que incluye un generador de oxígeno singlete. El primer compartimento 56 puede definirse además como una cámara de lectura y está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el compartimiento 60 de desechos.

El orden de distribución de los reactivos 64, 66 y 68 en los compartimentos 56 y 58 es únicamente a título de ejemplo y no debe interpretarse como limitativo. Los reactivos 64, 66 y 68 pueden distribuirse en los compartimentos 56 y 58 en cualquier orden deseado. Por ejemplo, la cantidad predeterminada de la composición 64 puede estar dispuesta en el segundo compartimiento 58 junto con la composición 68. El dispositivo 50 de microfluidos puede estar provisto además de uno o más compartimentos adicionales que contienen una solución o soluciones de lavado y/o excipiente o excipientes) (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 2-3). Cuando se proporcionan uno o más compartimentos adicionales, los compartimentos pueden estar en (o pueden ser capaces de estar en) comunicación fluida con el canal 54 de entrada, el primer compartimento 56 y/o el segundo compartimento 58. Además, cuando el dispositivo de microfluidos se usa en un formato de ensayo competitivo, la composición 64 o el electrodo 66 pueden tener un analito objetivo (o un análogo del mismo) unido a él.

La Figura 5 representa otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos se indica mediante el número de referencia general 150 y es similar a los dispositivos de microfluidos 10, 10a, 10b, y 50 de las Figuras 1-4, excepto que el dispositivo de microfluidos 150 contiene tres compartimientos en los que los tres reactivos (es decir, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, el oxígeno singlete y/o el electrodo (con o sin analito objetivo unido (o un análogo del mismo)) están dispuestos.

El dispositivo de microfluidos 150 incluye una carcasa 152 que incluye una cámara 153 de aplicación de muestras, un canal 154 de entrada, un primer compartimento 156, un segundo compartimento 158, un tercer compartimento 160 y un compartimento 162 de residuos. Una muestra (tal como, pero sin limitarse a, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 153 de aplicación de muestras, que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el canal 154 de entrada. El canal 154 de entrada está en (o puede ser en) comunicación fluida con el primer compartimento 156. El primer compartimento 156 contiene una cantidad predeterminada de una composición 164 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. El segundo compartimiento 158 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el primer compartimento 156; el segundo compartimento 158 contiene una cantidad predeterminada de una composición 166 que incluye un generador de oxígeno singlete. El tercer compartimiento 160 está en (o puede estar en) comunicación fluida con el segundo compartimento 158; el tercer compartimiento 160 contiene una cantidad predeterminada de un electrodo 168. El tercer compartimento 160 puede definirse además como una cámara de lectura y está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el compartimento 162 de residuos. Se entenderá que cuando el dispositivo 150 de microfluidos se utiliza en un formato de ensayo competitivo, la composición 164 o el electrodo 168 pueden tener un analito objetivo (o un análogo del mismo) unido a él.

El orden de distribución de los reactivos 164, 166 y 168 en los compartimentos 156, 158 y 160 es únicamente a título de ejemplo y no debe interpretarse como limitativo. Los reactivos 164, 166 y 168 pueden distribuirse en los compartimentos 156, 158 y 160 en cualquier orden deseado.

La Figura 6 representa otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el número de referencia general 150a y es similar al dispositivo de microfluidos 150 de la Figura 5, excepto que el dispositivo 150a de microfluidos está provisto de una configuración diferente para los tres compartimentos del mismo.

El dispositivo de microfluidos 150a incluye tres compartimentos 156a, 158a y 160a que contienen los reactivos 164a, 166a y 168a, respectivamente. Sin embargo, los compartimientos primero y segundo 156a y 158a no están en comunicación fluida entre sí; en su lugar, tanto el primer como el segundo compartimento 156a y 158a están en (o pueden estar en) comunicación fluida con el tercer compartimento 160a.

La Figura 7 representa aún otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el número de referencia general 150b y es similar al dispositivo de microfluidos 150a de la Figura 6, excepto que el dispositivo 150b de microfluidos está provisto de un cuarto compartimento 170 que contiene una cantidad predeterminada de solución 172 de lavado. El cuarto compartimento 170 se ilustra como estando en (o capaz de estar en) comunicación fluida con el tercer compartimento 160b; sin embargo, debe entenderse que el cuarto compartimiento 170 puede estar en (o ser capaz de estar en) comunicación fluida con cualquiera de los compartimentos 156b, 158b, y/o 160b y/o el canal 154b de entrada. La presencia de la solución 172 de lavado en el cuarto compartimento 170 es únicamente a manera de ejemplo; se debe entender que la solución presente en el cuarto compartimento 170 puede ser un excipiente u otro reactivo deseado.

Como se establece en el presente documento anteriormente, cualquiera de las estructuras de ensayo descritas aquí anteriormente puede multiplexarse con un ensayo o ensayos adicionales en un único dispositivo de microfluidos. La Figura 8 representa aún otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el número de referencia general 200 y es similar a los dispositivos de microfluidos 10, 10a, 10b, 50, 150, 150a y 150b de las Figuras 1-7, excepto que el dispositivo 200 de microfluidos contiene múltiples compartimentos que proporcionan un formato de ensayo multiplexado. El dispositivo 200 de microfluidos incluye una carcasa 202 que incluye una cámara 204 de aplicación de muestra, un primer canal 206 de entrada, un segundo canal 208 de entrada, un primer compartimento 210 y un segundo compartimento 212. Una muestra (tal como, pero no limitada a, una muestra de sangre) puede aplicarse a la cámara 204 de aplicación de muestra, que está en (o puede estar en) comunicación fluida con los canales 206 y 208 de entrada. El primer canal 206 de entrada está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el primer compartimento 210. El primer canal 206 de entrada y el primer compartimento 210 representan la estructura de ensayo descrita en detalle anteriormente (es decir, en donde el primer compartimento 210 contiene una composición 214 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, una composición 216 que incluye un generador de oxígeno singlete y un electrodo 218). Aunque esta estructura de ensayo representada es similar a la representada en la Figura 1, debe entenderse que cualquiera de las otras estructuras de ensayo descritas anteriormente en la presente memoria o bien contempladas en la presente memoria se pueden utilizar en el dispositivo de microfluidos de ensayo multiplexado. Además, el dispositivo 200 de microfluidos está provisto del segundo canal 208 de entrada que está en (o puede estar en) comunicación fluida con el segundo compartimento 212. El segundo compartimento 212 se proporciona simplemente para ilustrar la presencia de una segunda estructura de ensayo; debe entenderse que pueden estar presentes múltiples compartimentos según sea necesario para proporcionar la estructura requerida asociada con el segundo ensayo. Además, también debe entenderse que el segundo compartimento 212 puede estar provisto de reactivos similares a los presentes en el primer compartimento 210, de modo que están presentes múltiples ensayos que detectan diferentes analitos por el mismo mecanismo de ensayo en el mismo dispositivo de microfluidos. Alternativamente, el segundo compartimento 212 puede representar un formato de ensayo completamente diferente; el único requisito es que este segundo formato de ensayo pueda multiplexarse con uno de los ensayos descritos en este documento.

Por lo tanto, de acuerdo con el concepto o conceptos de la invención divulgados y reivindicados, se han proporcionado composiciones que comprenden un sistema quimioluminiscente, así como kits y dispositivos de microfluidos que contienen los mismos y métodos de uso de los mismos, que satisfacen plenamente los objetivos y ventajas expuestas anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que contiene un sistema de detección quimioluminiscente que comprende:

un electrodo capaz de unirse directa o indirectamente a un analito objetivo y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado;

una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo; y

una composición que comprende un generador de oxígeno singlete.

2. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1, en el que al menos una parte de una superficie del electrodo está provista de un recubrimiento de estreptavidina dispuesto sobre el mismo, y en donde la biotina está asociada con un primer compañero de unión específico del analito, por lo que la unión de la estreptavidina y la biotina y la unión del primer compañero de unión específico del analito al analito objetivo da como resultado la asociación indirecta del electrodo con el analito objetivo.

3. El kit de la reivindicación 1, en el que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un segundo compañero de unión específico del analito asociado con el mismo que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente con el analito objetivo.

4. El kit de la reivindicación 1, en el que uno de los electrodos y la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un analito objetivo o un análogo del mismo unido a él.

5. Un dispositivo de microfluidos, que comprende:

(a) un canal de entrada a través del cual se puede aplicar una muestra;

(b) al menos un compartimento capaz de estar en comunicación fluida con el canal de entrada, conteniendo al menos un compartimento:

(i) un electrodo capaz de unirse directa o indirectamente a un analito objetivo y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado;

(ii) una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo; y

(iii) una composición que comprende un generador de oxígeno singlete.

6. El dispositivo de microfluidos de la reivindicación 5, en el que uno de:

(a) el electrodo tiene analito objetivo o un análogo del mismo unido a él, por lo que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo presente en una muestra o al analito objetivo o análogo del mismo unido al electrodo; y

(b) la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un analito objetivo o un análogo del mismo unido a él, por lo que el electrodo puede unirse directa o indirectamente al analito objetivo presente en una muestra o al analito objetivo o análogo del mismo unido a la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete.

7. El dispositivo de microfluidos de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que al menos uno de (i), (ii) y (iii) está liofilizado.

8. El dispositivo de microfluidos de la reivindicación 7, que comprende además al menos un compartimento adicional capaz de estar en comunicación fluida con al menos otro compartimento, en donde al menos un compartimiento adicional contiene un excipiente para la reconstitución de al menos un reactivo liofilizado.

9. El dispositivo de microfluidos de una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que al menos una parte de una superficie del electrodo está provista de un recubrimiento de estreptavidina dispuesto sobre el mismo, y en el que la biotina está asociada con un primer compañero de unión específico del analito, por lo que la unión de estreptavidina y biotina y la unión del primer compañero de unión específico del analito al analito objetivo da como resultado la asociación indirecta del electrodo con el analito objetivo.

10. Un método para detectar la presencia y/o concentración de un analito objetivo en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) combinar, de forma simultánea o completamente o parcialmente secuencial:

(1) una muestra sospechosa de contener el analito objetivo;

(2) un electrodo capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado; y

(3) una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente al analito objetivo;

(b) permitir la unión de la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente y el electrodo al analito objetivo, mediante lo cual se forma un complejo en sándwich mediante la unión de (2) y (3) al analito objetivo de modo que el electrodo esté muy cerca al compuesto quimioluminiscente;

(c) lavar el electrodo con una composición que comprende un generador de oxígeno singlete;

(d) aplicar un potencial al electrodo para generar oxígeno singlete, en el que la generación de oxígeno singlete en las proximidades del compuesto quimioluminiscente provoca la activación del compuesto quimioluminiscente presente en el complejo en sándwich;

(e) determinar la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado;

(f) repetir opcionalmente las etapas (b) - (e); y

(g) detectar la presencia y/o concentración del analito objetivo analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en donde la cantidad de quimioluminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de analito objetivo en la muestra.

11. El método de la reivindicación 10, en el que al menos una porción de una superficie del electrodo está provista de un recubrimiento de estreptavidina dispuesto sobre él, y en la que la biotina está asociada con un primer compañero de unión específico del analito, por lo que la unión de estreptavidina y biotina y la unión del primer compañero de unión específico del analito al analito objetivo da como resultado la asociación indirecta del electrodo al analito objetivo.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un segundo compañero de unión específico del analito asociado con él que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente con el analito objetivo.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, que comprende además la etapa de lavar sustancialmente las composiciones no unidas o no unidas específicamente (1) y (3) del electrodo después de la etapa (b).

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente comprende además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado.

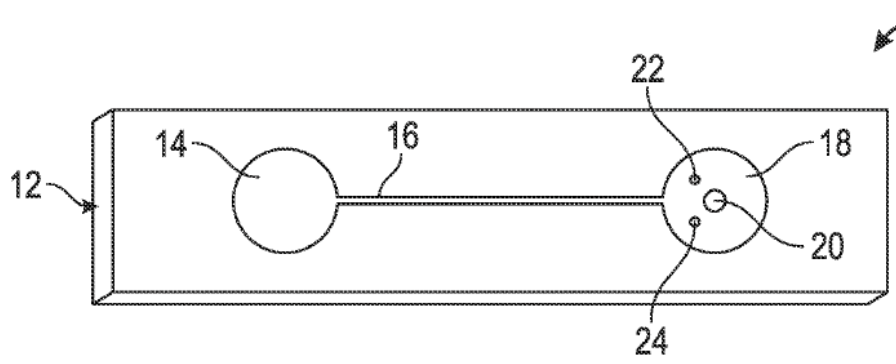

FIG. 1

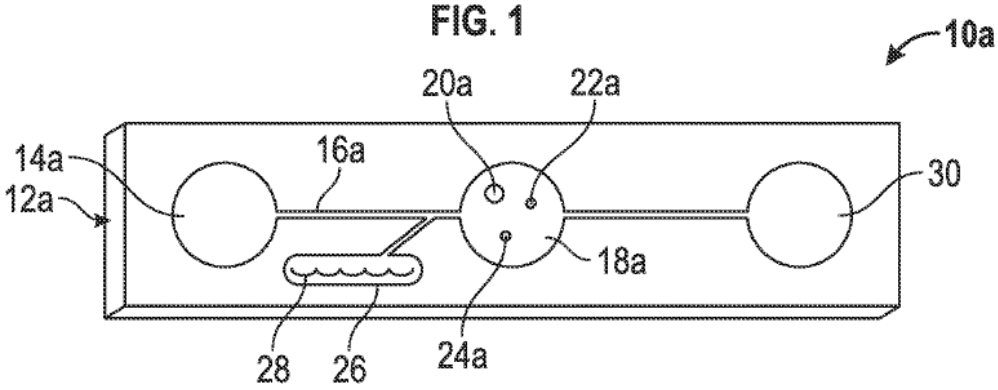

FIG. 2

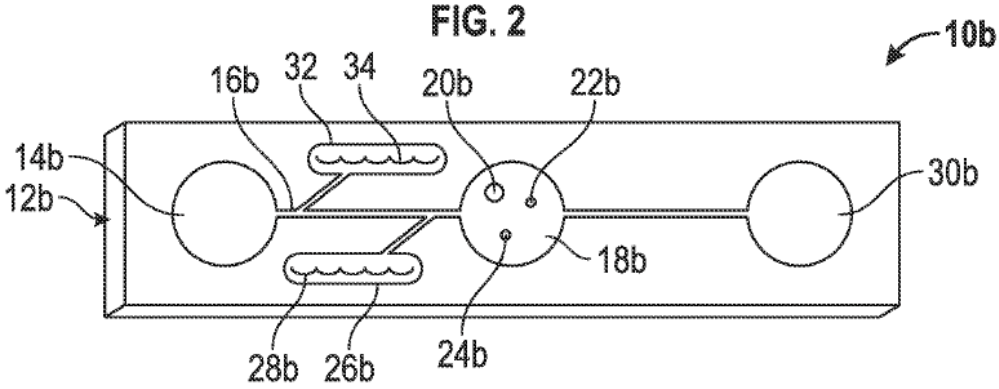

FIG. 3

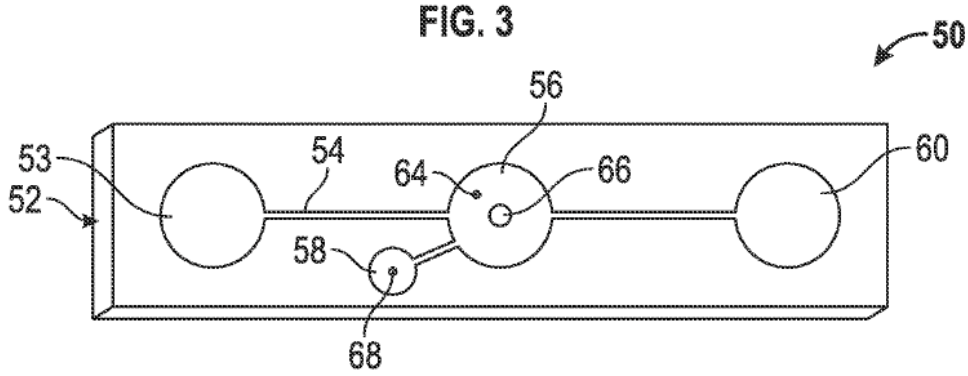

FIG. 4

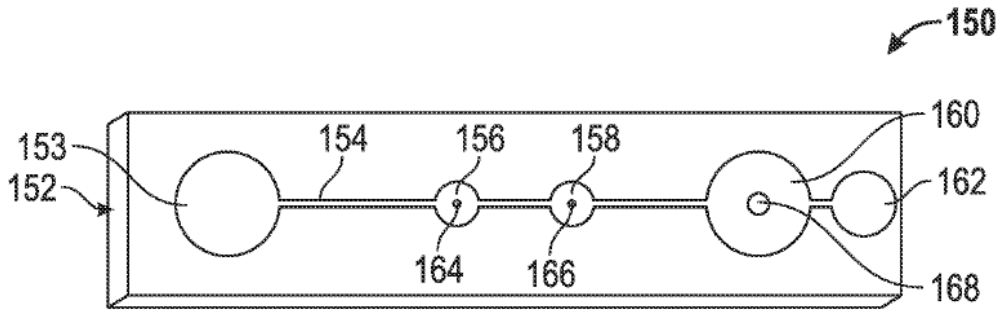

FIG. 5

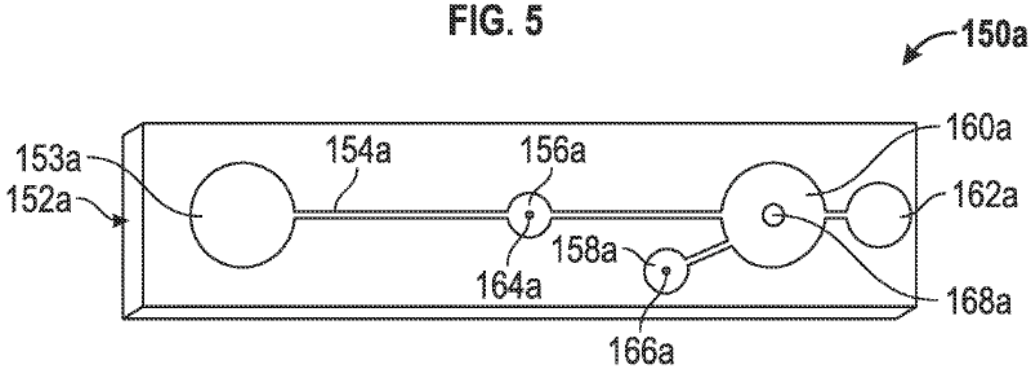

FIG. 6

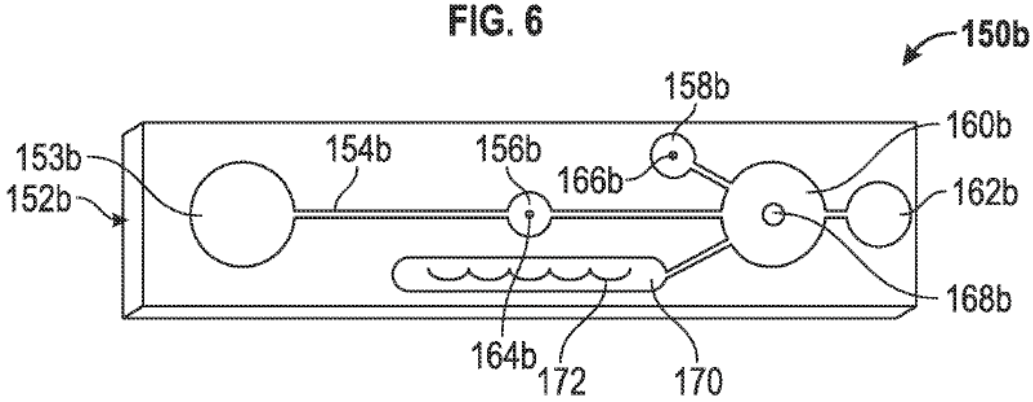

FIG. 7

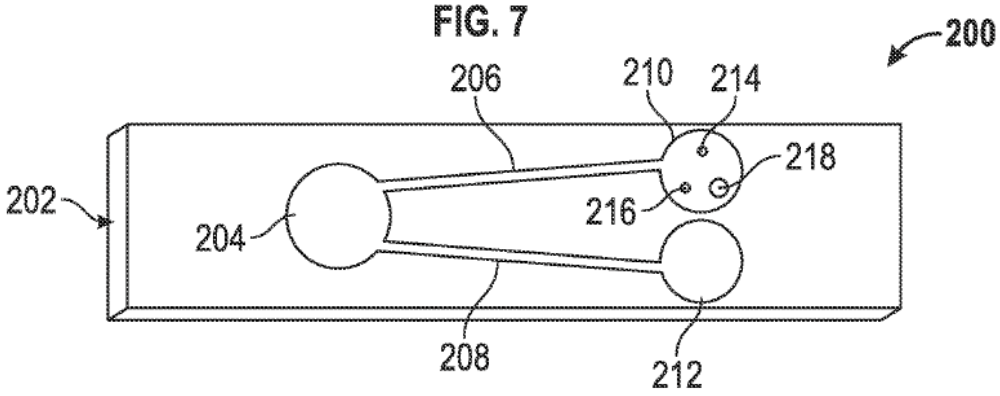

FIG. 8