



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 329 980**

⑯ Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/76** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02250119 .1**

⑯ Fecha de presentación : **09.01.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1327884**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

⑯ Título: **Tira de prueba de reactivo que comprende medios de control y medios de temporizador.**

⑰ Titular/es: **Inverness Medical Switzerland GmbH**  
**Bahnhofstrasse 28**  
**6300 Zug, CH**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.12.2009**

⑰ Inventor/es: **Beesley, Natalie Elizabeth;**  
**Brewster, Barry Sinclair;**  
**Day, Susan Catrin y**  
**Walker, Adrian Leslie**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.12.2009**

⑰ Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Tira de prueba de reactivo que comprende medios de control y medios de temporizador.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo de ensayo, a un método para realizar un ensayo y a un método para hacer un dispositivo de ensayo.

10 **Antecedentes de la invención**

Los dispositivos de ensayo que emplean principios inmunocromatográficos son bien conocidos. Los dispositivos de ensayo “de flujo lateral” son particularmente comunes. En los dispositivos del tipo de flujo lateral, un reactivo de unión específico marcado se inmoviliza de manera liberable sobre una tira de material poroso. Se aplica una muestra líquida a un extremo de la tira porosa y las propiedades capilares de la tira transportan la muestra líquida a lo largo de la tira, liberando el reactivo de unión específico marcado, que se une específicamente al analito de interés (en un primer sitio de unión del mismo), si está presente, en la muestra. El reactivo de unión marcado se captura entonces generalmente en una zona de prueba mediante un segundo reactivo que tiene una unión específica para un segundo sitio de unión del analito de interés. El exceso de reactivo de unión marcado se captura entonces normalmente en una zona de control, aguas abajo de la zona de prueba mediante un reactivo control que se une específicamente al reactivo marcado. Los dispositivos de ensayo de este tipo se describen con más detalle en, por ejemplo, el documento EP 0291194.

En un dispositivo de ensayo de flujo lateral conocido (del tipo dado a conocer en los documentos EP 0291194 y EP 0560411), tal como el kit de prueba de embarazo Clearblue® (disponible de Unipath Ltd, Bedford, Reino Unido), que funciona detectando la presencia de hCG en una muestra de orina aplicada al dispositivo de prueba, pueden generarse dos señales visibles. Una señal es una señal “de control” y se forma por la localización de perlas de látex azules derivatizadas: las perlas de látex se recubren con una molécula de inmunoglobulina y se capturan mediante un anticuerpo de captura, depositado en una línea sobre la varilla de prueba generalmente perpendicular a la dirección del flujo de muestra, teniendo el anticuerpo de captura una actividad de unión específica para la inmunoglobulina transportada sobre las perlas. La generación de esta señal informa a la usuaria de que:

(i) ni la inmunoglobulina sobre la perla de látex ni el anticuerpo de captura sobre la varilla de prueba se han desnaturalizado o degradado de otro modo suficientemente durante la fabricación o el almacenamiento del kit como para interferir de manera significativa en la unión específica entre las dos moléculas; y

(ii) se ha aplicado suficiente muestra líquida para movilizar las perlas de látex inmovilizadas de manera liberable y para transportarlas a lo largo de la varilla de prueba al menos hasta la zona “de control”, en la que está ubicado el anticuerpo de captura.

40 La importancia de (i) es que la inmunoglobulina sobre la varilla de prueba es una que se une específicamente al analito de interés. La señal de control indica que el anticuerpo de captura y el anticuerpo unido por látex todavía pueden asociarse, lo que implica que otros reactivos a base de inmunoglobulina (tales como un reactivo de inmunoglobulina específica de analito) en el kit de prueba deberá igualmente haber retenido su actividad de unión específica. La importancia de (ii) es que la zona “de control” está ubicada aguas abajo de la “zona de prueba”, en la que el analito está unido (junto con cualquier inmunoglobulina marcada con látex asociada específicamente) mediante una inmunoglobulina específica de analito adicional, depositada en una línea sobre la varilla de prueba, generalmente perpendicular a la dirección de flujo de la muestra. La línea de inmunoglobulina específica de analito inmovilizada en la zona de prueba es sustancialmente paralela a, pero aguas arriba de, la línea de anticuerpo inmovilizado en la zona de control.

50 De este modo, una muestra de orina que contiene hCG en contacto con la varilla de prueba en un ensayo realizado correctamente provocará la deposición de perlas de látex tanto en la zona de control como en la zona de prueba, dando como resultado la formación de dos líneas azules visibles para la usuaria: una línea en la zona de control y una línea en la zona de prueba.

55 Las instrucciones proporcionadas con el kit indican a la usuaria que lea el resultado del ensayo 1 minuto tras retirar la varilla de prueba del contacto con la muestra. En consecuencia, es necesario que la usuaria tenga acceso a un reloj externo con el fin de leer el resultado del ensayo después de que haya transcurrido el intervalo de tiempo correcto.

60 La marca es generalmente una marca directa, que es fácilmente visible a simple vista, para que se genere una señal visual siempre que el reactivo marcado se acumule en una cantidad suficiente.

Un problema con este tipo de dispositivo de ensayo es que la señal de prueba tarda un poco de tiempo en aparecer tras retirar el dispositivo de ensayo del contacto con la muestra líquida. Obviamente a la usuaria le gustaría leer el resultado del ensayo lo antes posible pero, igualmente, la usuaria requiere la confianza de que haya transcurrido el suficiente tiempo como para que se haya obtenido el resultado del ensayo correcto y que la prueba no esté leyéndose demasiado pronto, sin tener que esperar un periodo excesivamente largo.

Con el fin de tratar este problema, se conoce la incorporación de un “temporizador” en un dispositivo de ensayo, tal como se describe en los documentos EP 0826777 y WO-A-0186302. En particular, el documento EP 0826777 da a conocer un dispositivo de ensayo que comprende, además de los reactivos de ensayo habituales, una variedad de componentes que interaccionan en un intervalo de tiempo predeterminado tras la aplicación de la muestra al dispositivo de prueba, para crear un cambio de color detectable. Estos reactivos “de temporizador” adicionales se depositan en una sección “de temporizador” de la tira de prueba y, tras la hidratación por la muestra, interaccionan para producir un cambio de color.

Además, también se dice que los reactivos “de temporizador” realizan una función de control de calidad. Generalmente es indeseable que los dispositivos de ensayo estén expuestos a la humedad. Sin embargo, como el reactivo de temporizador cuando se hidrata produce un producto coloreado, el temporizador revelará si el dispositivo ha estado expuesto a humedad. La función de “control de calidad” es sin embargo muy limitada, ya que solamente indica que el dispositivo ha estado expuesto a una cantidad no cuantificada de humedad. La disposición dada a conocer en el documento EP 0826777 no puede indicar, por ejemplo, si los reactivos de prueba han retenido sus propiedades de unión específica, que pueden deteriorarse con el tiempo, especialmente si el dispositivo de ensayo se ha almacenado, por ejemplo, en condiciones de temperatura que son subóptimas.

### Sumario de la invención

En un primer aspecto la invención proporciona un dispositivo de ensayo para determinar la presencia de al menos un analito de interés en una muestra líquida, comprendiendo el dispositivo medios para generar una primera señal (la señal “de prueba”) que indica la presencia y/o cantidad de analito de interés en la muestra; y medios para generar una segunda señal, cuya generación indica:

(a) tanto que la prueba se ha realizado de manera satisfactoria,

(b) como que ha transcurrido el suficiente tiempo tras el contacto del dispositivo de ensayo con la muestra líquida como para leer la prueba y como para que la primera señal se haya generado correctamente.

El dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral.

El analito de interés puede ser cualquier molécula adecuada tal como un polipéptido o péptido, ácido nucleico, esteroide o similares. De manera conveniente, el analito es una hormona. En una realización particular, el analito es una hormona sexual tal como hormona luteinizante (LH) o una hormona asociada al embarazo, tal como la gonadotropina coriónica humana (hCG). En otras realizaciones, el analito de interés puede ser una droga, tal como un opiáceo, anfetamina o cocaína.

La muestra líquida puede ser un líquido ambiental (por ejemplo, agua de una fuente tal como un río, lago u océano, o una disolución acuosa), pero más preferiblemente es una muestra de un fluido corporal que comprende, por ejemplo, sangre, plasma, suero, saliva, orina, sudor, fluido lacrimal, fluido vaginal y similares. De los anteriores, la orina es la muestra preferida, ya que puede obtenerse fácilmente sin técnicas de muestreo invasivas y es una muestra relevante para el analito preferido, hCG.

Las señales primera y/o segunda pueden, por ejemplo, ser señales visibles. Generalmente se prefiere que las señales tanto primera como segunda sean señales visibles. Los medios para generar las respectivas señales primera y segunda serán generalmente de tipo convencional. La primera señal o señal “de prueba” y la segunda señal se forman ambas mediante la captura o localización de perlas de látex coloreadas u otro reactivo de unión específico marcado directamente, generalmente como se da a conocer en los documentos EP 0291194 y EP 0560411. Resultará evidente para los expertos en la técnica que el dispositivo de prueba puede usarse para someter a prueba la presencia de más de un analito de interés en una muestra. Por ejemplo, pueden proporcionarse dos reactivos de unión específicos de analito diferentes en el dispositivo, cada uno específico para un respectivo analito de interés. La “primera” señal de prueba puede por tanto comprender, en algunas realizaciones, una pluralidad de señales diferentes, correspondiendo cada señal a la presencia o ausencia de un analito respectivo. Por tanto, la expresión “primera señal” no deberá interpretarse como limitada a la generación de una única señal de prueba.

Además, es al menos posible que la “segunda” señal pueda comprender ella misma una pluralidad de señales. Por ejemplo, aunque se prefiere que la segunda señal se genere en una única ubicación, también es posible que la segunda señal se genere en dos ubicaciones diferentes sobre el dispositivo de ensayo, por ejemplo una zona “de control” que indica la señal de control, y una zona “de temporizador” que indica la señal “de temporizador”. En las realizaciones de este tipo, en las que los dos componentes de la segunda señal se generan en ubicaciones diferentes, se prefiere que la señal de control y la señal de temporizador se generen (a) sustancialmente de manera simultánea (es decir, a 1-5 segundos entre sí) y/o (b) por el mismo reactivo que genera señal. Un medio, por ejemplo, para obtener la generación sustancialmente simultánea de una señal de control/de temporizador de dos componentes es proporcionar la zona de control y la zona de temporizador en puntos en el dispositivo de ensayo a los que llegan sustancialmente de manera simultánea los respectivos reactivos que generan señal de control y de temporizador. Cuando los reactivos que generan señal de control y de temporizador tienen sustancialmente la misma velocidad de avance a lo largo de la varilla de prueba, las zonas de control y de temporizador pueden proporcionarse en una relación colateral.

Los dispositivos de ensayo de la técnica anterior, tales como el dispositivo de ensayo proporcionado en el kit de prueba Clearblue®, incluyen medios para generar una primera señal “de prueba” y una segunda señal “de control”, indicando la segunda señal que la prueba se ha realizado de manera satisfactoria. Sin embargo, en el dispositivo de ensayo proporcionado en el kit de prueba Clearblue® no hay ningún medio de asegurarse de que la señal de control aparece solamente después de un intervalo predeterminado específico tras el contacto del dispositivo de ensayo con la muestra, y que coincide con el punto de tiempo deseado en el que se pretende leer el resultado del ensayo. En contraposición, es un requisito esencial de la presente invención que la señal que actúa como señal de control (es decir, que indica que los reactivos de prueba retienen suficiente funcionalidad y propiedad de unión específica para que se obtenga un resultado significativo de la prueba) para indicar que la prueba se ha realizado de manera satisfactoria, solamente se genere un tiempo predeterminado específico tras haber puesto en contacto el dispositivo con la muestra, tiempo que también coincide con el punto de tiempo en el que se pretende leer el resultado del ensayo.

De este modo, la segunda señal no sólo actúa como señal de control sino también como “temporizador” integral de ensayo. Por tanto, en uso, el dispositivo de ensayo da lugar a una señal que tiene al menos dos fines distintos.

En particular, es necesario que el dispositivo de ensayo de la invención esté dispuesto de modo que la segunda señal (la señal de control/temporizador de doble fin) solamente se forme en un tiempo en el que la primera señal (la señal de prueba) se habrá formado correctamente, es decir una señal de prueba positiva si el analito de interés está presente en la muestra, y una señal de prueba negativa (de la que puede fijarse con seguridad) si el analito no está presente o está presente a una concentración por debajo de la sensibilidad mínima reivindicada para el dispositivo de ensayo. En la práctica, un resultado negativo se indica normalmente mediante la no aparición de una señal visible en la zona de prueba.

Un dispositivo de ensayo típico, tal como el kit de prueba de embarazo Clearblue®, está listo para usarse aproximadamente 1 minuto tras retirar el dispositivo del contacto con la muestra, manteniéndose habitualmente el dispositivo en una corriente de orina durante aproximadamente 5 segundos. Por tanto, en realizaciones preferidas, un dispositivo de ensayo según la presente invención dará lugar a la segunda señal aproximadamente 1 minuto tras retirar el dispositivo del contacto con la muestra. Sin embargo, otros dispositivos de ensayo pueden leerse normalmente tras otros intervalos de tiempo (por ejemplo cualquiera desde 30 segundos hasta 5 minutos) y por tanto en otras realizaciones la segunda señal puede formarse en un tiempo superior o inferior a 1 minuto tras el contacto con la muestra.

Pueden emplearse una gran variedad de métodos para controlar el tiempo que transcurre entre poner en contacto el dispositivo de ensayo con la muestra y la formación de la segunda señal. Estos incluyen, pero no se limitan a: métodos que modulan el tiempo que se tarda en transportar la muestra hasta la zona de control y/o métodos que modulan el tiempo que tarda la perla de látex u otro reactivo que genera señal en alcanzar la zona de control.

En el dispositivo de ensayo Clearblue®, la segunda señal (es decir la señal “de control”) generalmente aparece aproximadamente 20 segundos tras retirar el dispositivo de ensayo del contacto con la muestra. En consecuencia, con el fin de modificar un dispositivo de ensayo Clearblue® convencional para ajustarse a los requisitos de la presente invención, sería necesario retardar la aparición de la segunda señal en aproximadamente 40 segundos, con el fin de indicar a la usuaria cuándo ha transcurrido 1 minuto y que el resultado de la prueba está listo para la lectura.

Los métodos para conseguir un retardo de este tipo en la aparición de la segunda señal incluyen una o más maneras de reducir el caudal de la muestra y/o el o los reactivos que generan señal dentro del dispositivo, tal como:

(i) aumentando el tamaño de la perla de látex u otro resto unido al reactivo que genera señal;

(ii) alterando las propiedades reológicas de la muestra, por ejemplo incorporando un inhibidor de caudal en el dispositivo de ensayo - esto podría comprender, por ejemplo, incorporar una cantidad eficaz de un compuesto polihidroxilado, tal como un azúcar (por ejemplo sacarosa) u otro viscosificante en la mecha u otra parte del dispositivo, resuspendiéndose el compuesto tras el contacto con la muestra y alterando las propiedades reológicas del mismo, específicamente la viscosidad de la muestra;

(iii) alterando las propiedades de flujo del dispositivo de ensayo, por ejemplo seleccionando una membrana con diferentes propiedades de flujo (por ejemplo diferente porosidad y/o de diferente material) o estratificando una o ambas superficies de la membrana (normalmente estratificación sólo de la superficie superior, es decir la superficie que está más alejada de la persona que lo observa cuando se lee el resultado del ensayo). Puede ser deseable usar un dispositivo de ensayo que comprenda una tira de prueba compuesta de dos partes: una parte aguas arriba con una membrana de caudal relativamente alto, y una parte aguas abajo entre la zona de prueba y la zona de control, con una membrana de caudal relativamente bajo.

Alternativamente, un retardo en la aparición de la segunda señal podría obtenerse aumentando la distancia que se requiere que la muestra (junto con el reactivo que genera señal resuspendido) migre dentro del dispositivo de ensayo antes de llegar a la zona de control. Esto puede efectuarse moviendo simplemente la zona de control más aguas abajo, lejos de la mecha. Otro enfoque es hacer que la segunda señal aparezca sustancialmente al mismo tiempo que en el dispositivo Clearblue® convencional pero reducir el tiempo que tarda la reacción de la prueba en producir la primera señal en la zona de prueba. Esto puede efectuarse moviendo la zona de prueba más aguas arriba, hacia la

mecha. En cualquier enfoque, el resultado neto es el aumento de la separación espacial (y por tanto temporal) entre las zonas de prueba y de control, de modo que las señales de prueba y de control están listas simultáneamente para la lectura.

5       Otro tipo de enfoque no afecta a la generación de la señal, sino que más bien pretende imponer un retardo tras su detección o percepción por una usuaria. Por tanto, por ejemplo, cuando la segunda señal es la aparición de una línea, mancha u otra marca coloreada o señal visible, el efecto deseado puede obtenerse aumentando el retardo antes de que la usuaria vea la señal visible generada. Por ejemplo puede aplicarse una cubierta translúcida a la zona de control ocultando así de manera incompleta la zona de control a la usuaria. Esto puede realizarse, por ejemplo, aplicando una 10 capa translúcida de material estratificado de plástico u otro material a la superficie inferior de la zona de control (es decir el lado de la varilla de prueba que se examina por una usuaria para leer el resultado del ensayo). Los materiales adecuados incluyen ARcare® 7823 (disponible de Adhesives Research Europe Ltd, Great Dunmow, Essex, Reino Unido) y material estratificado “de plata escarchada” S/S (disponible de Davies Industrial Supplies, Letchworth, Herts, Reino Unido).

15     Resultará evidente para los expertos en la técnica que ninguno de los métodos tratados anteriormente son excluyentes entre sí y cualquiera de los métodos puede usarse aisladamente o junto con uno o más métodos adicionales cualquiera. Además no se pretende que la lista sea de ningún modo exhaustiva, y otros métodos para conseguir el objetivo deseado pueden ser evidentes para los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente descripción.

20     También resultará evidente que, en aquellas realizaciones en las que puede desearse reducir el tiempo que se tarda en generar la segunda señal, entonces hacer generalmente lo opuesto a los métodos explicados de manera resumida anteriormente conseguirá el efecto deseado.

25     Una característica preferida significativa adicional de la invención es reducir lo que puede denominarse como el tiempo “de desarrollo de señal”. Éste es el periodo de tiempo que tarda en desarrollarse la segunda señal, desde su aparición inicial, perceptible por algunos observadores (digamos, menos del 20%), hasta una señal clara no ambigua perceptible por más del 95% de los observadores (seleccionados al azar de la población humana). Así, por ejemplo, la señal de control del dispositivo convencional de ensayo Clearblue® tiene un tiempo de desarrollo de señal relativamente largo, tardando aproximadamente 15 segundos en desarrollarse desde el primer matiz azul apenas visible en la zona de control hasta una fuerte marca azul definida que es fácilmente evidente. Aunque esto es aceptable cuando la señal realiza solamente la única función de actuar como indicador de control, un tiempo de desarrollo de señal largo es indeseable cuando también se pretende que la señal actúe como temporizador, dado que introduce incertidumbre en la mente de la usuaria en lo que respecta a cuándo debe leerse el resultado de la prueba de ensayo (por ejemplo ¿tras la percepción inicial de la segunda señal o tras percibir la finalización del desarrollo o en algún punto intermedio durante los 15 segundos intermedios de tiempo de desarrollo?).

30     En consecuencia, es una característica preferida de la presente invención que el tiempo de desarrollo de señal de la segunda señal sea inferior a 15 segundos, preferiblemente inferior a 12 segundos, más preferiblemente inferior a 10 segundos y lo más preferiblemente inferior a 8 segundos. En general, cuanto menor sea el tiempo de desarrollo de señal, mejor, de modo que se da una indicación casi instantánea a la usuaria de cuándo leer el resultado del ensayo.

35     Los inventores han ideado varios métodos para reducir el tiempo de desarrollo de señal. Una técnica es aplicar un depósito separado de anticuerpo marcado con látex de control (u otro reactivo marcado que genera señal de control en otras realizaciones) más próximo a la zona de control y/o en una zona más exactamente definida. Se encuentra que esto es eficaz, porque el látex de control, cuando se resuspende mediante la captación de muestra, tiende a pasar a estar bastante disperso durante su migración a lo largo del dispositivo de ensayo, de modo que el látex de control llega a la zona de control a lo largo de un periodo prolongado. Esta dispersión puede reducirse reduciendo la distancia que el látex de control tiene que desplazarse antes de llegar a la zona de control. Así, por ejemplo, en una realización el tiempo que tarda en formarse la segunda señal puede aumentarse desplazando la zona de control aguas abajo, mientras que, al mismo tiempo, el tiempo de desarrollo de señal puede reducirse depositando el látex de control más próximo a la zona de control.

40     Otro método, más preferido, de reducción del tiempo de generación de señal es aumentar la cantidad de látex de control aplicado al dispositivo de ensayo. Esto se consigue convenientemente aumentando la concentración de la suspensión de látex de control aplicada al dispositivo de ensayo.

45     Aproximadamente un 2% p/v de látex es particularmente adecuado, lo que, para una realización típica, daría como resultado la deposición de aproximadamente 22 µg de látex de control por dispositivo de ensayo.

50     En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para realizar un ensayo, que comprende el uso de un dispositivo de ensayo según el primer aspecto de la invención definido anteriormente.

55     Las diversas características de la invención se describirán ahora adicionalmente a modo de ejemplo ilustrativo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

las figuras 1 y 2 son diagramas de barras que comparan la intensidad de la señal de control generada tras 40 ó 60 segundos usando dispositivos de ensayo que comprenden diversas membranas de nitrocelulosa; y

5 la figura 3 es un gráfico de la intensidad de la señal de control (unidades “Quasar” arbitrarias) frente al tiempo (segundos).

## Ejemplos

### 10 Ejemplo 1

#### *Modular el tiempo para la formación de la segunda señal (ajustar el “temporizador”)*

15 Se realizaron un cierto número de experimentos para demostrar la viabilidad de alterar el retardo entre poner en contacto un dispositivo de ensayo con la muestra y la formación de la segunda señal en la zona de control. Como modelo, los inventores usaron el kit de prueba de embarazo Clearblue®, disponible comercialmente de Unipath Ltd (Bedford, Reino Unido).

20 En el contexto del dispositivo Clearblue®, sería necesario que la señal de control se formara en 60 segundos tras poner en contacto el dispositivo de ensayo con una muestra de orina, con el fin de que la señal indicara adicionalmente a una usuaria que ha transcurrido la cantidad de tiempo deseada y que el resultado del ensayo está listo para la lectura. Pruebas preliminares mostraron que, con el dispositivo Clearblue® existente, la señal de control generalmente aparecía 20-25 segundos tras una incubación inicial (de 20 segundos) con una muestra de orina. En consecuencia, con el fin de modificar el dispositivo existente sería necesario retardar la aparición de la segunda señal en 35-40 segundos.

25 Se investigaron diversos enfoques con vistas a obtener el retardo deseado en la aparición de la segunda señal.

#### *1.1 El primer enfoque fue el movimiento de la zona de control aguas abajo, más lejos de la mecha*

30 Se llevaron a cabo pruebas para determinar la posición en el dispositivo que el frente de la muestra alcanzaba en 1 minuto. El valor obtenido fue de 25,0 mm medidos desde la parte inferior de la nitrocelulosa.

35 Con la línea de control a 16,5 mm medidos desde el extremo inferior agua abajo de la tira de nitrocelulosa (la posición de la línea de control en el dispositivo Clearblue® actual) usando látex al 0,75% p/v en sólidos y un tiempo de incubación de 20 segundos para el contacto con una muestra de orina, entonces tras 10 segundos la señal de la línea de control ya era visible con una intensidad de 5 unidades (arbitrarias) Quasar y tras 60 segundos la intensidad estaba a 12-13 unidades Quasar. (A modo de explicación el aparato Quasar® es un dispositivo usado por los inventores para cuantificar la intensidad de las señales visibles generadas por varillas de prueba de flujo lateral: se ilumina la varilla de prueba con una luz y se mide la intensidad de la luz mediante un detector al otro lado de la varilla de prueba: la 40 proporción de luz absorbida [y por tanto la intensidad de las señales de prueba] se evalúa comparando la cantidad de luz transmitida a través del dispositivo en presencia y ausencia de la señal en la varilla). Con la línea de control a 25,0 mm, la intensidad a los 10 segundos fue de aproximadamente 1 unidad Quasar y fue de entre 6 y 8 unidades Quasar a los 60 segundos, y tardó 40 segundos en alcanzar una intensidad de 3-5 unidades, es decir la menor intensidad a la que las personas inexpertas que realizan la lectura percibían una línea de control. Por tanto, mover la posición de la línea 45 de control desde 16,5 mm hasta 25,0 mm retardó significativamente la formación de la línea de control.

#### *1.2 Nitrocelulosa que avanza más lentamente*

50 Se propuso que usar una membrana de nitrocelulosa que fluyera más lentamente que la usada actualmente para el dispositivo Clearblue® podría retardar la formación de la señal de control. Se controla el caudal de la nitrocelulosa mediante el tamaño de poro y esto, a su vez, se controla o bien mediante la cantidad de agua en la mezcla de nitrocelulosa (para controlar las velocidades de flujo dentro de un intervalo pequeño) o bien cambiando toda la mezcla de la nitrocelulosa (es decir incorporando cantidades variables de detergentes, tensioactivos, agua y nitrocelulosa), para provocar una alteración importante del caudal. Se sometieron a prueba varias membranas tanto de Schleicher and 55 Schuell GmbH (“S&S” Dassel, Alemania) como de Millipore: 170/100 de S&S y la gama de membranas HiFlow de Millipore: HF75, HF90, HF120, HF135, HF180, HF240.

60 Se usó la membrana 170/100 de S&S en un experimento con partículas de látex de 100 nm de diámetro. Se encontró que el látex de 100 nm podía fluir hasta la posición de la línea de control (16,5 mm) de la membrana de nitrocelulosa 170/100 en el plazo de 1 minuto, pero que las partículas de látex de 380 nm (el tamaño usado en el dispositivo Clearblue® convencional) tardaron más de 5 minutos en alcanzar la zona de control. En consecuencia, el uso de la membrana 170/100 de S&S puede ser adecuado junto con partículas de látex de menor tamaño.

65 También se realizó un experimento sobre la generación de la línea de control usando cada velocidad de nitrocelulosa de la gama HiFlow (HF75, HF90, HF120, HF135, HF180 y HF240) de las membranas de nitrocelulosa disponibles de la empresa Millipore (Bedford, MA, EE.UU.). Los números se refieren al tiempo en segundos que tarda el líquido en fluir 4 cm hacia arriba de la tira cuando se sometió a prueba en los laboratorios de Millipore.

Las características deseadas para la membrana de nitrocelulosa eran que la línea de control no podía verse a los 40 segundos (es decir <5 unidades Quasar) tras la incubación con la muestra pero podía verse a los 60 segundos (es decir >5 unidades Quasar). Una intensidad de 5 unidades Quasar se tomó como la intensidad de señal mínima discernible por una persona inexperta que realiza la lectura. Se sometieron a prueba las diversas membranas con una muestra de orina sin hCG y con una muestra de orina que contenía hCG a una concentración de 400 mUI/ml. Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2 respectivamente.

Las figuras 1 y 2 son diagramas de barras que muestran la intensidad de la señal de zona de control (medida en unidades "Quasar" arbitrarias) tras 40 ó 60 segundos, tras la incubación con una muestra de orina desprovista de hCG (figura 1) o que contenía hCG a 400 mUI/ml (figura 2), para el dispositivo Clearblue® actual y para cada dispositivo equivalente preparado usando una membrana de nitrocelulosa de Millipore con un caudal diferente.

Las figuras muestran que la membrana que mejor se ajusta a los criterios deseables era HF180, que proporcionó una señal de zona de control con un intensidad inferior a 5 unidades tras 40 segundos, pero una señal de aproximadamente 10 unidades tras 60 segundos, independientemente de si la muestra a prueba contenía hCG.

### 1.3 Ocultación parcial de la zona de control

Si se permitiera que la línea de control se formara de manera normal pero su percepción por parte de la usuaria pudiera retardarse suficientemente, entonces sería posible retardar la aparición efectiva de la señal de control. La percepción de la línea de control por parte de la usuaria podría retardarse estratificando un material translúcido por encima del área de la zona de control. Esto significaría que la usuaria sólo podría ver una línea de control suficientemente intensa en la zona de control.

Se fijó un material estratificado de refuerzo (ARcare® 7823, de Adhesives Research Europe Ltd) en posición (usando cinta adhesiva) de modo que no se cubriera la zona de prueba (por tanto la aparición de la propia línea de prueba no se alteró), pero cubriendo la zona de control. El material estratificado usado era translúcido, con un aspecto lechoso y se colocó sobre el lado visto a través de la ventana de control. Este material estratificado ralentizó la percepción de la generación de la línea de control bloqueando una intensidad de señal de aproximadamente 5 unidades Quasar y por tanto retardando la línea de control para el Clearblue® existente desde 20 segundos hasta 30 segundos. Muestras de otros materiales estratificados están actualmente en investigación.

### Ejemplo 2

#### 35 Reducir el tiempo de desarrollo de señal

Tal como se explicó anteriormente, cuando la señal de control realiza también una función de temporizador, como en la presente invención, es deseable que se minimice el tiempo de desarrollo de señal. Los inventores realizaron 40 algunos experimentos para investigar la reducción del tiempo de desarrollo de señal, en el contexto del dispositivo convencional de ensayo Clearblue®.

El producto convencional Clearblue® contiene aproximadamente 7,6 µg de látex de control, aplicado al dispositivo a partir de una suspensión de látex al 0,5% p/v. El látex de prueba también se unirá a la línea de control. Los inventores pretendían determinar si el aumento de la cantidad de látex de control depositado en el dispositivo reduciría el tiempo de desarrollo de la señal de control. Se realizó un experimento en el que se depositó látex de control sobre un dispositivo de ensayo a partir de una suspensión al 0,75, 1,50 y 2,0% (p/v) de látex, y se comparó el tiempo de desarrollo de señal. Los resultados se muestran en la figura 3, que es un gráfico de la intensidad de señal (unidades "Quasar") frente al tiempo.

50 La figura 3 muestra que la línea de control tardó 15 segundos en desarrollar una intensidad que pudiera verse por personas inexpertas que realizan la lectura (es decir 5 unidades) con látex de control a partir de una suspensión al 0,75%. La línea de control tardó menos de 10 segundos en desarrollar la misma intensidad cuando se depositó látex al 2,0% p/p en sólidos. Los resultados también mostraron que la intensidad de la línea de control a los 60 segundos aumentaba enormemente desde la intensidad de 11 unidades Quasar obtenidas usando látex al 0,75% en sólidos hasta 42 unidades Quasar obtenidas usando látex al 2,0% en sólidos.

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Un dispositivo de ensayo inmuno Cromatográfico de flujo lateral para determinar la presencia de al menos un analito de interés en una muestra líquida, comprendiendo el dispositivo: medios para generar una primera señal, o señal “de prueba”, que indica la presencia y/o cantidad de analito de interés en la muestra; y medios para generar una segunda señal, cuya generación indica tanto:
- 10        (a) que la prueba se ha realizado de manera satisfactoria, como
- (b) que ha transcurrido el suficiente tiempo tras el contacto del dispositivo de ensayo con la muestra líquida como para leer la prueba y como para que la primera señal se haya generado correctamente;
- 15        en el que las señales primera y segunda están simultáneamente listas para la lectura, y ambas señales se forman mediante la captura o localización de un reactivo de unión específico marcado con una perla de látex coloreada o con otra marca directa.
- 20        2. Un dispositivo según la reivindicación 1, en el que el analito es hCG.
3. Un dispositivo según una cualquiera de la reivindicación 1 ó 2, en el que tanto los medios para generar la primera señal como los medios para generar la segunda señal comprenden un reactivo de unión específico marcado con látex.
- 25        4. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda señal se genera aproximadamente 1 minuto después de poner en contacto el dispositivo con la muestra.
5. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda señal tiene un tiempo de desarrollo de señal inferior a 10 segundos.
- 30        6. Un dispositivo según la reivindicación 5, en el que la segunda señal tiene un tiempo de desarrollo de señal inferior a 8 segundos.
7. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo comprende un depósito de reactivo de unión específico de analito, marcado, y, aguas abajo del mismo, un depósito de reactivo de unión específico de control, marcado.
- 35        8. Un método para realizar un ensayo para determinar la presencia de un analito de interés en una muestra, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto cualquier dispositivo de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con la muestra; observar la aparición de la segunda señal; y observar la aparición de la primera señal cuando haya aparecido la segunda señal.
- 40        9. Un método según la reivindicación 8, en el que la muestra es una muestra de fluido corporal.
10. Un método según la reivindicación 9, en el que la muestra es orina.
- 45        11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 ó 10, en el que el analito de interés es hCG.

50

55

60

65

# ES 2 329 980 T3

Figura 1 – Comparación de la señal de la línea de control a 40 y 60 s para nitrocelulosa de diferentes caudales usando un patrón de orina con 0 mU/ml de hCG

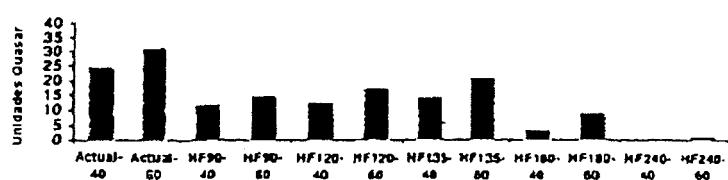


Figura 2 – Comparación de la señal de la línea de control a 40 y 60 s para nitrocelulosa de diferentes caudales usando un patrón de orina con 400 mU/ml de hCG

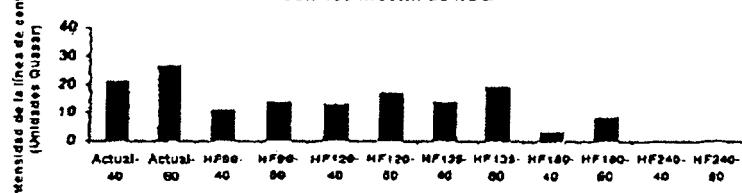


Figura 3

