



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 290 524**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/558 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **03781542 .0**

⑧6 Fecha de presentación : **29.10.2003**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1573330**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

⑤4 Título: **Dispositivos de ensayo de flujo continuo, autocalibrados.**

③0 Prioridad: **19.12.2002 US 325429**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

⑦3 Titular/es: **KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, Inc.**
401 North Lake Street
Neenah, Wisconsin 54956, US

⑦2 Inventor/es: **Wei, Ning;**
Huang, Yanbin;
Song, Xuedong y
Kaylor, Rosann

⑦4 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 290 524 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivos de ensayo de flujo continuo, autocalibrados.

5 **Antecedentes de la invención**

Habitualmente se emplean varios procedimientos y dispositivos analíticos en los ensayos de flujo continuo para determinar la presencia y/o la concentración de analitos que pueden encontrarse presentes en una muestra a analizar. Por ejemplo, los inmunoensayos utilizan mecanismos de los sistemas inmunitarios, en los que se producen anticuerpos en respuesta a la presencia de antígenos que son patógenos o extraños a los organismos. Estos anticuerpos y antígenos, es decir, inmunorreactivos, son capaces de unirse uno con otro, lo que causa un mecanismo de reacción muy específico que se puede utilizar para determinar la presencia o la concentración de ese antígeno particular en una muestra biológica.

Hay varios métodos de inmunoensayo bien conocidos que utilizan inmunorreactivos marcados con un componente detectable de tal forma que el analito se puede detectar analíticamente. Por ejemplo, los ensayos de tipo “sandwich” normalmente implican mezclar la muestra a analizar con sondas detectables, tales como un látex coloreado o un radioisótopo, que están conjugados con un miembro de unión específico para el analito. Las sondas conjugadas forman complejos con el analito. A continuación, estos complejos alcanzan una zona de anticuerpos inmovilizados donde se produce la unión entre los anticuerpos y el analito para formar “complejos sandwich” ternarios. Los complejos sandwich están localizados en la zona para la detección del analito. Se puede utilizar esta técnica para obtener resultados cuantitativos o semicuantitativos. Algunos ejemplos de tales ensayos de tipo sandwich se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 4.168.146 de Grubb y otros y n.º 4.366.241 de Tom y otros.

Además, la solicitud de patente internacional WO 97/09620 se refiere a un método para la determinación de analitos en una muestra a analizar y describe el uso de una o más zonas de análisis para detectar el analito y una o más zonas de calibración que reciben los agentes de calibración marcados. Las señales asociadas en las diferentes zonas de análisis y zonas de calibración se comparan para determinar la presencia del analito.

Una técnica alternativa es el ensayo “de tipo competitivo”. En un ensayo de “tipo competitivo”, la marcación normalmente es un analito marcado o un análogo de analito que compite por la unión de un anticuerpo con cualquier analito sin marcar presente en la muestra. Normalmente, los análisis competitivos se utilizan para detectar analitos tales como los haptenos, siendo cada hapteno monovalente y siendo capaz de unir sólo una molécula de anticuerpo. Ejemplos de dispositivos de inmunoensayos competitivos se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 4.235.601 de Deutsch y otros, 4.442.204 de Liotta y 5.208.535 de Buecher y otros.

Muchos de estos ensayos dependen de la calibración para proporcionar resultados válidos y significativos, particularmente para las detecciones cuantitativas y semicuantitativas. Específicamente, por lo general se pueden emplear sistemas de calibración externos o internos. En un sistema de calibración externo, se puede obtener una curva estándar a partir de muestras estándares que contienen una serie de cantidades conocidas de un analito y a continuación se comparan los resultados obtenidos a partir de las muestras con la curva estándar para extraer la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. El método de calibración externa es relativamente fácil de diseñar y fácil de aplicar. Sin embargo, a menudo está sometido a la interferencia de variaciones medioambientales y entre lotes y, por lo tanto, es poco fiable.

Los sistemas de calibración interna convencionales, por otra parte, utilizan típicamente una membrana que tiene una zona de calibración y una zona de detección en las que está inmovilizado el reactivo de captura específico para el analito. Desgraciadamente, la capacidad de la zona de calibración para proporcionar una comparación fiable y precisa para la zona de detección es a menudo limitada. Además, las zonas de calibración más internas son relativamente caras, lo que las convierten en impracticables para determinadas aplicaciones.

Así pues, actualmente existe la necesidad de un sistema de calibración preciso para los ensayos de flujo continuo que sea preciso y barato.

55 **Características de la invención**

El dispositivo de ensayo de flujo continuo de la presente invención es el dispositivo de ensayo de flujo continuo de la reivindicación 1. De acuerdo con una realización de la presente invención, se describe un dispositivo de ensayo de flujo continuo (por ejemplo, sandwich, competitivo, etc.) que es capaz de detectar la presencia o la cantidad de un analito que reside en una muestra a analizar. El dispositivo de ensayo comprende una membrana porosa que está en comunicación con sondas de detección y sondas de calibración que son capaces de generar una señal de detección y una señal de calibración, respectivamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las sondas se seleccionan entre el grupo que consiste en cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos fosforescentes, compuestos radiactivos, marcadores visuales directos, liposomas y combinaciones de los mismos. En una realización particular, las sondas contienen una micropartícula de látex.

La membrana porosa define una zona de calibración/detección dentro de la cual está inmovilizado un reactivo de captura polielectrolítico que se configura para unirse directa o indirectamente a una combinación de sondas de

detección y sondas de calibración. Se puede utilizar un segundo reactivo de captura que es un miembro de unión específico para el analito. La zona de detección/calibración es capaz de generar una señal de detección y calibración de tal forma que la cantidad del analito se puede determinar a partir de la señal de detección calibrada por la señal de calibración.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, en la reivindicación 13 se describe un método para detectar la presencia o cantidad de un analito que reside en una muestra a analizar. El método comprende proporcionar un dispositivo de ensayo de flujo continuo. Una muestra a analizar que contiene el analito se pone en contacto con las sondas de detección y las sondas de calibración presentes en el dispositivo. En una zona de detección/calibración se mide la intensidad de la señal de detección y de la señal de calibración. La cantidad del analito dentro de la muestra a analizar es proporcional a la intensidad de la señal de detección calibrada por la intensidad de la señal de calibración.

Otras características y aspectos de la presente invención se discuten con más detalle posteriormente.

Breve descripción de los dibujos

Una descripción completa y de apoyo de la presente invención, incluido el mejor modo de la misma, dirigida a un experto en la técnica, se expone más particularmente en el resto de la memoria, que hace referencia a las figuras anexas, en las que:

la figura 1 es una vista en perspectiva de una realización de un dispositivo de ensayo de flujo continuo de la presente invención;

la figura 2 es una ilustración gráfica de una realización para conjugar covalentemente un anticuerpo a nanopartículas carboxiladas;

la figura 3 es una ilustración esquemática de una realización de un dispositivo de ensayo de flujo continuo de la presente invención;

la figura 4 es una ilustración esquemática de otra realización de un dispositivo de ensayo de flujo continuo de la presente invención;

la figura 5 es una ilustración esquemática de otra realización más de un dispositivo de ensayo de flujo continuo de la presente invención; y

La figura 6 es una ilustración esquemática de otra realización de un dispositivo de ensayo de flujo continuo de la presente invención.

El uso repetido de caracteres de referencia en la presente memoria y dibujos pretende representar las mismas o análogas características o elementos de la invención.

Descripción detallada de realizaciones representativas

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, la terminología “analito” generalmente se refiere a una sustancia que hay que detectar. Por ejemplo, los analitos pueden incluir sustancias antigénicas, haptenos, anticuerpos y combinaciones de los mismos. Los analitos incluyen, pero sin limitarse a ellos, toxinas, compuestos orgánicos, proteínas, péptidos, microorganismos, aminoácidos, ácidos nucleicos, hormonas, esteroides, vitaminas, fármacos (incluidos los administrados para propósitos terapéuticos, así como los administrados para propósitos ilícitos), fármacos intermediarios o subproductos de fármacos, bacterias, partículas víricas y metabolitos de cualquiera de las sustancias anteriores o anticuerpos contra las mismas. Ejemplos específicos de algunos analitos incluyen ferritina; creatinina cinasa MIB (CK-MIB); digoxina; fenitoína; fenobarbital; carbamazepina; vancomicina; gentamicina; teofilina; ácido valproico; quinidina; lutropina (LH); folitropina (FSH); estradiol, progesterona; proteína C reactiva; lipocalinas; anticuerpos de IgE; microglobulina de vitamina B2; hemoglobina glicada (Gly. Hb); cortisol; digitoxina; N-acetilprocainamida (NAPA); procainamida; anticuerpos contra la rubéola, tales como rubéola-IgE y rubéola-IgM; anticuerpos contra la toxoplasmosis, tales como IgG contra la toxoplasmosis (Toxo-IgG) e IgM contra la toxoplasmosis (Toxo-IgM); testosterona; salicilatos; acetaminofeno; antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); anticuerpos contra el antígeno central de la hepatitis B, tales como IgG e IgM contra el antígeno central de la hepatitis B (Anti-HBC); virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH 1 y 2); virus de la leucemia de los linfocitos T humanos 1 y 2 (HTLV); antígeno e de la hepatitis B (HBeAg); anticuerpos contra el antígeno e de la hepatitis B (Anti-HBe); tirotropina (TSH); tiroxina (T4); triyodotironina total (Total T3); triyodotironina libre (Free T3); antígeno carcinoembrionario (CEA); y proteína fetal α (AFP). Entre los medicamentos de posible abuso y sustancias contraindicadas se incluyen, pero sin pretender limitarse a ellos, anfetamina; metanfetamina; barbituratos, tales como amobarbital, secobarbital, pentobarbital, fenobarbital y barbital; benzodiacepinas, tales como librium y valium; cannabinoides, tales como hachís y marihuana; cocaína; fentanilo; LSD; metacualona; opiatos, tales como heroína; morfina, codeína, hidromorfona, hidrocodona, metadona, oxicodona, oximorfona y opio; fenciclidina; y propoxiheno. Otros posibles analitos pueden estar descritos en las patentes de los EE.UU. n.º 6.436.651 de Evehart y otros, y n.º 4.366.241 de Tom y otros.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la terminología “muestra a analizar” generalmente se refiere a un material que se sospecha que contiene el analito. La muestra a analizar se puede utilizar directamente tal y como se obtiene de la fuente o después de un pretratamiento para modificar la naturaleza de la muestra. La muestra a analizar se puede obtener de cualquier fuente biológica, tal como un líquido fisiológico, que incluye sangre, saliva, humor vítreo, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, flemas, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico o similares. A la muestra a analizar se le puede dar un tratamiento previo antes de usarla, tal como preparar plasma a partir de sangre, diluir fluidos viscosos y similares. Los métodos de tratamiento pueden implicar la filtración, destilación, concentración, inactivación de componentes interferentes y la adición de reactivos. Además de los líquidos fisiológicos, se pueden utilizar otras muestras líquidas tal como agua, productos alimenticios y similares para la realización de ensayos medioambientales o de producción de alimentos. Adicionalmente, se puede utilizar como muestra a analizar un material sólido que se sospeche que contiene el analito. En algunos casos, puede ser beneficioso modificar una muestra a analizar sólida para formar un medio líquido o para liberar el analito.

Descripción detallada

A continuación se hará referencia en detalle a varias realizaciones de la invención, uno o más ejemplos de las cuales se presentan más abajo. Cada ejemplo se proporciona a modo de explicación de la invención, y no como una limitación de la misma. De hecho, para los expertos en la técnica será evidente que se pueden realizar varias modificaciones y variaciones en la presente invención sin alejarse del alcance de la invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización se pueden usar en otra realización para producir otra realización más. Así, se pretende que la presente invención cubra tales variaciones y modificaciones tal y como vienen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

En general, la presente invención se refiere a un sistema interno autocalibrado para dispositivos de ensayos de flujo continuo. En particular, la presente invención emplea el uso de una sola zona de detección/calibración definida por una membrana porosa del ensayo. Transmitir una detección de la señal y una calibración interna al mismo tiempo puede aumentar enormemente la fiabilidad y reproducibilidad de la detección al eliminar las influencias de los factores medioambientales, como la temperatura, el pH y la inestabilidad instrumental de la señal de detección.

En relación con la figura 1, por ejemplo, una realización de un dispositivo de ensayo de flujo continuo (20) que se puede realizar de acuerdo con la presente invención se describirá a continuación con más detalle. Tal como se muestra, el dispositivo (20) contiene una membrana porosa (23) soportada opcionalmente por un material rígido (21). En general, la membrana porosa (23) se puede fabricar de cualquiera de una serie de materiales que la muestra a analizar es capaz de atravesar. Por ejemplo, los materiales utilizados para formar la membrana porosa (23) pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, materiales naturales, sintéticos o que se producen de forma natural, que se modifican sintéticamente, tales como polisacáridos (por ejemplo, materiales de celulosa tales como papel y derivados de celulosa, tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa); sílice; materiales inorgánicos, tales como aluminio desactivado, tierra de diatomeas, $MgSO_4$ u otro material inorgánico desintegrado finamente y dispersado uniformemente en una matriz polimérica porosa, con polímeros tales como cloruro de vinilo, copolímero de cloruro de vinilo-propileno y copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo; tela, que se produce de forma natural (por ejemplo, algodón) y sintética (por ejemplo, nilón o rayón); geles porosos, tales como gel de sílice, agarosa, dextrano y gelatina; películas poliméricas, tales como poliácridamida, y similares. En una realización particular, la membrana porosa (23) está formada a partir de materiales de nitrocelulosa y/o sulfona de poliéster. Se debe entender que la terminología “nitrocelulosa” se refiere a ésteres de ácido nítrico con celulosa, que puede ser nitrocelulosa solo o un éster mixto de ácido nítrico y otros ácidos, tales como ácidos carboxílicos alifáticos que tienen de 1 a 7 átomos de carbono.

El dispositivo (20) también puede contener una almohadilla de mecha (28). La almohadilla de mecha (28) recibe generalmente líquido que ha migrado a través de toda la membrana porosa (23). Como se conoce bien en la técnica, la almohadilla de mecha (28) puede ayudar a promover la acción capilar y el flujo de líquido a través de la membrana (23).

Para iniciar la detección de un analito dentro de la muestra a analizar, un usuario puede aplicar directamente la muestra a analizar a una parte de la membrana porosa (23) a través de la cual se puede desplazar hasta alcanzar una zona de detección/calibración (31) (descrita más abajo). Alternativamente, se puede aplicar primero la muestra a analizar a una almohadilla de muestra (no mostrada) que se encuentra en comunicación mediante líquido con la membrana porosa (23). Algunos de los materiales adecuados que se pueden utilizar para formar la almohadilla de muestreo incluyen, pero sin limitarse a ellos, nitrocelulosa, celulosa, almohadillas de polietileno poroso y papel de filtro de fibra de vidrio. Si se desea, la almohadilla de muestreo también puede contener uno o más reactivos de pretratamiento del ensayo, unidos difusivamente o no difusivamente a ella.

En la realización ilustrada, la muestra a analizar se desplaza de la almohadilla de muestreo (no mostrada) hasta una almohadilla de conjugado (22) que está colocada en comunicación con un extremo de la almohadilla de muestreo. La almohadilla de conjugado (22) está formada por un material que la muestra a analizar es capaz de atravesar. Por ejemplo, en una realización, la almohadilla de conjugado (22) está formada de fibras de vidrio. Aunque solo se muestra una almohadilla de conjugado (22), se debe entender que también se pueden utilizar otras almohadillas de conjugado en la presente invención.

Para facilitar la detección exacta de la presencia o la ausencia de un analito dentro de la muestra a analizar, se aplican sondas en diferentes localizaciones del dispositivo (20). Como se describirá con más detalle más adelante, se utilizan sondas tanto para la detección del analito como para la calibración. Cualquier sustancia que sea generalmente capaz de generar una señal que sea detectable visualmente o mediante un dispositivo instrumental se puede utilizar como sonda. Diferentes sustancias adecuadas pueden incluir cromógenos; catalizadores; compuestos fluorescentes; compuestos quimioluminiscentes; compuestos fosforescentes; compuestos radiactivos; marcadores visuales directos, que incluyen partículas coloidales metálicas (por ejemplo, oro) y no metálicas, partículas, enzimas o sustratos colorantes, o partículas de látex de polímero orgánico; liposomas u otras vesículas que contienen sustancias productoras de señales; y similares. Por ejemplo, algunas enzimas adecuadas para utilizarse como sondas se describen en la patente de los EE.UU. n.º 4.275.149 de Litman y otros.

Un ejemplo de un sistema de enzima/sustrato es la enzima fosfatasa alcalina y el sustrato azul de nitrotetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato, o un derivado o análogo del mismo, o el sustrato 4-metilumbeliferilfosfato. Otras sondas adecuadas pueden estar descritas en las patentes de los EE.UU n.º 5.670.381 de Jou y otros y n.º 5.252.459 de Tarcha y otros.

En algunas realizaciones, las sondas pueden contener un compuesto fluorescente que produce una señal detectable. Los compuestos fluorescentes pueden ser moléculas fluorescentes, polímeros, dendrímeros, partículas y similares. Algunos ejemplos de moléculas fluorescentes adecuadas, por ejemplo, incluyen, pero sin limitarse a ellas, fluoresceína, quelatos de europio, ficobiliproteína, rodamina y sus derivados y análogos. También se puede utilizar como una sonda un compuesto coloreado visualmente detectable, por medio de lo cual se proporciona una lectura coloreada directa de la presencia o la concentración del analito en la muestra sin necesidad de otros reactivos productores de señales.

Las sondas, tales como las descritas anteriormente, se puede utilizar solas o junto con una micropartícula (algunas veces citadas como “perlas” o “micropelotas”). Por ejemplo, se pueden utilizar micropartículas que se producen de forma natural, tales como núcleos, micoplasmas, plásmidos, plastidios, células de mamíferos (por ejemplo, fantasmas de eritrocitos), microorganismos unicelulares (por ejemplo, bacterias), polisacáridos (por ejemplo, agarosa) y similares. Además, también se pueden utilizar micropartículas sintéticas. Por ejemplo, en una realización, se utilizan micropartículas de látex que están marcadas con un colorante fluorescente o coloreado. Aunque se puede utilizar cualquier micropartícula de látex en la presente invención, las micropartículas de látex normalmente están formadas de poliestireno, estirenos de butadieno, terpolímero de estireno acrílico-vinilo, polimetilmetacrilato, polietilmetacrilato, copolímero de estireno-anhídrido maleico, acetato de polivinilo, polivinilpiridina, polidivinilbenceno, polibutilenotereftalato, acrilonitrilo, vinilcloruro-acrilatos y similares, o un derivado aldehído, carboxilo, amino, hidroxilo o hidrazida de los mismos. Otras micropartículas adecuadas pueden estar descritas en las patentes de los EE.UU n.º 5.670.381 de Jou y otros, y n.º 5.252.459 de Tarcha y otros.

Algunos ejemplos comercialmente disponibles de partículas fluorescentes adecuadas incluyen las microesferas carboxiladas fluorescentes vendidas por Molecular Probes, Inc. con los nombres comerciales “FluoSphere” (Red 580/605) y “TransFluoSphere” (543/620), así como “Texas Red” y 5- y 6-carboxitetrametilrodamina, también vendidos por Molecular Probes, Inc. Ejemplos disponibles comercialmente de micropartículas de látex coloreadas adecuadas incluyen perlas de látex carboxilado vendidas por Bang’s Laboratory, Inc.

Cuando las sondas son partículas, tales como las descritas anteriormente, el diámetro medio de las partículas puede variar generalmente como se desee según factores tales como el tipo de la partícula elegida, el tamaño de los poros de la membrana y la composición de la membrana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el diámetro medio de los marcadores particulados puede oscilar de unas 0,01 micras a unas 1000 micras, en algunas realizaciones de unas 0,01 micras a unas 100 micras y en algunas realizaciones de unas 0,01 micras a unas 10 micras. En una realización particular, las partículas tienen un diámetro medio de unas 0,1 a unas 2 micras. Generalmente, las partículas tienen una forma sustancialmente esférica, aunque otras formas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, láminas, bastoncillos, barras, formas irregulares, etc., son adecuadas para su utilización en la presente invención. Como apreciarán los expertos en la técnica, la composición, forma, tamaño, y/o densidad de las partículas puede variar ampliamente.

Se desea modificar las sondas de algún modo de manera que se puedan unir más fácilmente al analito. Las sondas se modifican con ciertos miembros de unión específicos que se adhieren a éstas para formar conjugados de sondas. Los miembros de unión específicos generalmente se refieren a un miembro de un par de unión específico, es decir, dos moléculas diferentes donde una de las moléculas se une química y/o físicamente a la segunda molécula. Por ejemplo, los miembros de unión específicos inmunorreactivos pueden incluir antígenos, haptenos, aptámeros, anticuerpos y complejos de los mismos, incluidos los formados por métodos de ADN recombinante o síntesis de péptidos. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína recombinante o una(s) mezcla(s) o fragmento(s) de la misma, así como una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión específicos. Los detalles de la preparación de tales anticuerpos y su adecuación para ser utilizados como miembros de unión específicos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Otros pares de unión específicos habituales incluyen, pero sin limitarse a ellos, biotina y avidina, glúcidos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias (incluidas secuencias de ácidos nucleicos de sonda y de captura utilizadas en los ensayos de hibridación de ADN para detectar una secuencia de ácidos nucleicos deseada), secuencias peptídicas complementarias incluidas las formadas por métodos recombinantes, moléculas efectora y receptora, hormona y la proteína de unión a la hormona, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, y similares. Además, los pares de unión específicos pueden incluir miembros que son análogos

del miembro de unión específico original. Por ejemplo, un derivado o fragmento del analito, es decir, un análogo del analito, se puede utilizar a condición de que tenga al menos un epítipo en común con el analito.

Los miembros de unión específicos se pueden unir generalmente a las sondas utilizando cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas. Por ejemplo, la unión covalente de los miembros de unión específicos a las sondas (por ejemplo, micropartículas) se puede realizar utilizando grupos carboxílico, amino, aldehído, bromoacetilo, yodoacetilo, tiol, epoxi y otros grupos funcionales reactivos o de unión, así como radicales libres residuales y cationes radicales, a través de los cuales se puede realizar una reacción de acoplamiento a la proteína. También se puede incorporar un grupo funcional de superficie como un comonomero funcionalizado porque la superficie de la micropartícula puede contener una concentración de grupos polares de superficie relativamente elevada. Además, aunque las sondas de micropartículas se funcionalizan a menudo después de la síntesis, en algunos casos, tales como el poli(tiofenol), las micropartículas son capaces de unirse covalentemente de manera directa con una proteína sin que se necesite ninguna modificación más. Por ejemplo, en relación con la figura 2, se ilustra una realización de la presente invención para conjugar covalentemente una sonda. Tal y como se muestra, la primera etapa de la conjugación es la activación de los grupos carboxílicos sobre la superficie de la sonda utilizando carbodiimida. En la segunda etapa, los grupos de ácido carboxílico activados se hacen reaccionar con un grupo amino de un anticuerpo para formar un enlace amida. La activación y/o el acoplamiento del anticuerpo se puede producir en un tampón, tal como una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (por ejemplo, pH de 7,2) o ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfónico (MES) (por ejemplo, pH de 5,3). Tal y como se muestra, las sondas resultantes se pueden bloquear a continuación con etanolamina, por ejemplo, para formar el conjugado de la sonda. Además de la unión covalente, también se pueden utilizar en la presente invención otras técnicas de acoplamiento, tales como la absorción física.

En relación de nuevo con la figura 1, el dispositivo (20) también contiene la zona de detección/calibración (31). La zona de detección/calibración (31) generalmente proporciona una única región de detección/calibración diferenciada (por ejemplo, línea, punto, etc.) de tal forma que un usuario puede determinar con exactitud la concentración de un analito particular dentro de una muestra a analizar en una localización a lo largo del dispositivo. Por ejemplo, en la realización ilustrada, se utiliza una única línea.

Además, la línea se puede disponer en una dirección que es sustancialmente perpendicular al flujo de la muestra a analizar a través del dispositivo (20). Asimismo, en algunas realizaciones, la línea se puede disponer en una dirección que es sustancialmente paralela al flujo de la muestra a analizar a través del dispositivo (20).

La zona de detección/calibración (31) contiene uno o más reactivos de captura polielectrolíticos inmovilizados que son capaces de unirse a las sondas, tanto directa como indirectamente (es decir, a un miembro de unión específico conjugado con la sonda, a un analito que ha formado complejo con la sonda, etc.). En algunas realizaciones, un primer reactivo de captura inmovilizado se configura para que se una a las sondas de detección, mientras que un segundo reactivo de captura se configura para que se una a las sondas de calibración. El primer y el segundo reactivos de captura inmovilizados pueden ser iguales o diferentes.

Hablando en términos generales, se pueden inmovilizar varios tipos de reactivos de captura dentro de la zona de detección/calibración (31). Por ejemplo, en una realización, el reactivo de captura puede ser idéntico a, o formarse a partir de, la misma clase o categoría de materiales (por ejemplo, anticuerpos, antígenos, análogos de los mismos y similares) como los miembros de unión específicos utilizados para formar los conjugados de las sondas. Así, en esta realización, el reactivo de captura puede actuar como un sitio de unión estático para las sondas cuando se unen a un analito. Específicamente, el analito, tal como un anticuerpo, antígeno, etc., puede tener dos sitios de unión. Al alcanzar la zona de detección/calibración (31) y pasar a través de la almohadilla de conjugado (22), uno de estos sitios de unión es ocupado por el miembro de unión específico conjugado a la sonda. Sin embargo, el sitio de unión libre del analito se puede unir al reactivo de captura inmovilizado.

En otra realización, el reactivo de captura polielectrolítico inmovilizado puede ser un polielectrolito que se une a las sondas, directa o indirectamente, mediante una interacción iónica. Por ejemplo, el polielectrolito puede tener una carga positiva o negativa neta, así como una carga neta que generalmente es neutra. Algunos ejemplos adecuados de polielectrolitos que tienen una carga positiva neta incluyen, pero sin limitarse a ellos, polilisina (disponible comercialmente de Sigma-Aldrich Chemical Co., Inc. de St. Louis, Missouri), polietilenimina; poliaminas y/o poliamidoaminas funcionalizadas con epíclorohidrina, tales como poli(dimetilamina-co-epíclorohidrina); cloruro de polidialildimetilamonio; derivados catiónicos de la celulosa, tales como los copolímeros de celulosa o los derivados de celulosa injertados con un monómero hidrosoluble de amonio cuaternario; y similares. En una realización particular, se pueden utilizar CelQuat® SC-230M o H-100 (disponibles de National Starch & Chemical, Inc.), que son derivados celulósicos que contienen un monómero hidrosoluble de amonio cuaternario. Aún más, algunos ejemplos adecuados de polielectrolitos que tienen una carga negativa neta incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácidos poliacrílicos, tales como el poli(sal sódica del ácido etileno-co-metacrílico) y similares. También se debe comprender que se pueden utilizar también otros polielectrolitos en la presente invención, tales como polielectrolitos anfipáticos (es decir, que tienen partes polares y apolares). Por ejemplo, algunos ejemplos de polielectrolitos anfipáticos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, poli(yoduro de estiril-b-N-metil-2-vinil-piridinio) y poli(ácido estiril-b-acrílico), ambos disponibles de Polymer Source, Inc. de Dorval, Canadá.

Aunque en general se puede utilizar cualquier polielectrolito, el polielectrolito seleccionado para una aplicación particular puede variar según la naturaleza de las sondas, los miembros de unión específicos, el analito de interés,

el tipo de membrana porosa y similares. En particular, la carga distribuida de un polielectrólito le permite unirse a sustancias que tienen una carga opuesta. Así, por ejemplo, los polielectrólitos que tienen una carga positiva neta a menudo están mejor equipados para unirse con las sondas que están cargadas negativamente, mientras que los polielectrólitos que tienen una carga negativa neta a menudo están mejor equipados para unirse a las sondas que están cargadas positivamente. Así, en tales casos, la interacción iónica entre estas moléculas permite que se produzca la unión requerida dentro de la zona de detección/calibración (31). No obstante, aunque la interacción iónica se utiliza principalmente para lograr la unión deseada, los polielectrólitos también se pueden unir con las sondas que tienen una carga similar.

Ya que el polielectrólito está diseñado para unirse a las sondas, normalmente se desea que el polielectrólito esté inmovilizado sustancialmente de forma no difusiva por la superficie de la membrana porosa (23). Así, los polielectrólitos se pueden aplicar a la membrana porosa (23) de tal forma que los polielectrólitos no difundan sustancialmente a la matriz de la membrana porosa (23). En particular, los polielectrólitos forman típicamente un enlace iónico y/o covalente con los grupos funcionales presentes en la superficie de la membrana porosa (23) de tal forma que permanecen inmovilizados en ella. Aunque no es necesaria, la formación de enlaces covalentes entre el polielectrólito y la membrana porosa (23) puede ser deseable para inmovilizar de forma más permanente el polielectrólito en ella.

Por ejemplo, en una realización, los monómeros utilizados para formar el polielectrólito se forman primero en una disolución y a continuación se aplican directamente a la membrana porosa (23). Se pueden utilizar varios disolventes (por ejemplo, disolventes orgánicos, agua, etc.) para formar la disolución. Una vez aplicados, se inicia la polimerización de los monómeros utilizando calor, radiación de haces de electrones, polimerización de radicales libres y similares. En algunos casos, a medida que se polimerizan los monómeros, éstos forman enlaces covalentes con algunos grupos funcionales de la membrana porosa (23), por lo que se inmoviliza en ella el polielectrólito resultante. Por ejemplo, en una realización, un monómero de etilenoimina puede formar un enlace covalente con un grupo carboxilo presente en la superficie de algunas membranas porosas (por ejemplo, nitrocelulosa).

En otra realización, el polielectrólito se puede formar antes de la aplicación a la membrana porosa (23). Si se desea, el polielectrólito se puede formar primero en una disolución utilizando disolventes orgánicos, agua y similares. Después, se aplica la disolución polielectrolítica directamente a la membrana porosa (23) y, luego, se seca. Una vez seca, el polielectrólito puede, como se describió anteriormente, formar un enlace iónico con algunos grupos funcionales presentes en la superficie de la membrana porosa (23) que tienen una carga contraria al polielectrólito. Por ejemplo, en una realización, la polietilenoimina cargada positivamente puede formar un enlace iónico con grupos carboxilo cargados negativamente en la superficie de algunas membranas porosas (por ejemplo, nitrocelulosa).

Además, el polielectrólito también se puede entrecruzar con la membrana porosa (23) utilizando varias técnicas bien conocidas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las poliaminas y/o poliamidoaminas funcionalizadas con epíclorohidrina se pueden utilizar como un polielectrólito cargado positivamente entrecruzable. Ejemplos de estas sustancias se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 3.700.623 de Keim; n.º 3.772.076 de Keim; y n.º 4.537.657 de Keim, y se cree que son vendidos por Hercules, Inc., Wilmington, Del. bajo la marca KymeneTM. Por ejemplo, KymeneTM 450 y 2064 son compuestos de poliamina y/o de poliamidoamina funcionalizada con epíclorohidrina que contienen algunos anillos de epóxido y grupos de amonio cuaternarios que pueden formar enlaces covalentes con los grupos carboxilo presentes en algunos tipos de membranas porosas (por ejemplo, nitrocelulosa) y entrecruzarse con el esqueleto de polímeros de la membrana porosa cuando se tratan. En algunas realizaciones, la temperatura de entrecruzamiento puede oscilar de unos 50°C a unos 120°C y el tiempo de entrecruzamiento puede oscilar de unos 10 a unos 600 segundos.

Aunque se han descrito anteriormente diferentes técnicas para inmovilizar polielectrólitos de manera que no difundan por la membrana porosa (23), se debe entender que se puede utilizar en la presente invención cualquier otra técnica para inmovilizar compuestos polielectrolíticos, de manera que no difundan. De hecho, los métodos antes mencionados sólo pretenden ser ejemplos de las técnicas que se pueden utilizar en la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden añadir algunos compuestos a la disolución de polielectrólitos que pueden inhibir sustancialmente la difusión de tales polielectrólitos en la matriz de la membrana porosa (23).

En general, se pueden construir diferentes dispositivos de ensayos de flujo continuo de acuerdo con la presente invención. En este sentido, a continuación se describirán varias realizaciones de la presente invención con más detalle. Sin embargo, se debe entender que las realizaciones explicadas a continuación son sólo ejemplares, y que la presente invención también contempla otras realizaciones. Por ejemplo, en relación con la figura 3, se muestra una realización particular en la que se utilizan sondas (41) para la detección y sondas (43) para la calibración. En esta realización, se aplican las sondas de detección (41) a la almohadilla de conjugado (22) y, así, son capaces de fluir a través del dispositivo (20) (tal como se indica mediante la flecha direccional -L-) cuando se colocan en comunicación con la muestra a analizar. Las sondas de detección (41) se conjugan con un miembro de unión específico (90) para un analito (A) de forma que, al entrar en contacto con el analito (A), las sondas (41) se unen a éste para formar los complejos analito/sonda (49). A continuación, los complejos analito/sonda (49) pueden fluir a través del dispositivo (20) hasta que alcanzan la zona de detección/calibración (31).

Dentro de la zona de detección/calibración (31) está inmovilizado un reactivo de captura polielectrolítico (no mostrado) para que se una a las sondas de calibración (43) mediante una interacción iónica. En esta realización, las

sondas de calibración (43) se inmovilizan sobre el polielectrólito antes de aplicar la muestra a analizar. Las sondas de calibración (43) pueden incluir, por ejemplo, micropartículas de látex conjugadas con un miembro de unión específico (91) (por ejemplo, anticuerpo, antígeno, etc.). En la zona de detección/calibración (31), los complejos analito/sonda (49) se pueden unir al miembro de unión específico (91) de las sondas de calibración (43) para formar un complejo sandwich (50). Cualquier sonda sin unir (41) fluirá a través de la zona de detección/calibración (31). Si se desea, se puede predeterminar la cantidad del reactivo de captura polielectrolítico, de forma que la señal de calibración dentro de la zona de detección/calibración (31) alcance todo su potencial predeterminado para la intensidad de señal. Es decir, se predetermina la cantidad de las sondas (43) que se depositan porque la cantidad de polielectrólito empleado se ajusta a un nivel predeterminado y conocido.

Una vez que se deja desarrollar completamente, se puede utilizar el nivel de intensidad de las sondas (43) para calibrar el nivel de intensidad de las sondas (41) en la zona de detección/calibración (31) para determinar la cantidad del analito presente en la muestra a analizar. Esta etapa de calibración se puede producir visualmente, con ayuda de un dispositivo de lectura, o utilizando otras técnicas. Por ejemplo, en una realización, se pueden marcar las sondas (41) y (43) con compuestos fluorescentes de tal forma que la intensidad de señal de las sondas (41) y (43) se puede medir utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, en una realización, las sondas (41) y (43) se pueden excitar con la misma fuente externa. En esta realización, la fuente suministra radiación a una longitud de onda de excitación, lo que provoca que las sondas (41) emitan luz a una longitud de onda que es diferente de la longitud de onda emitida por las sondas (43). Esto permite que se pueda medir por separado la presencia de las sondas (41) y (43). Alternativamente, las sondas (41) y (43) también se pueden medir por separado utilizando fuentes externas distintas.

Hablando en términos generales, la fluorescencia es el resultado de un procedimiento de tres etapas que se produce en ciertos compuestos fluorescentes. En la primera etapa, se suministra energía mediante una fuente externa, tal como una lámpara incandescente o un láser, y es absorbida por el compuesto fluorescente, lo que crea un estado excitado de singlete electrónico. En la segunda etapa, el estado excitado perdura durante un tiempo finito a lo largo del cual el compuesto fluorescente sufre cambios conformacionales y también una multitud de interacciones posibles con su entorno molecular. A lo largo de este tiempo, la energía del estado excitado se disipa parcialmente, lo que produce un estado relajado desde el que se origina la emisión de la fluorescencia. La tercera etapa es la etapa de emisión de fluorescencia, en la que se emite energía, lo que devuelve el compuesto fluorescente a su estado basal. La energía emitida es menor que su energía de excitación (luz o láser) y, por lo tanto, de una longitud de onda mayor. Este cambio o diferencia en la energía o longitud de onda permite que se detecte la energía de emisión y que se aisle de la energía de excitación.

La detección de la fluorescencia generalmente utiliza la filtración de la longitud de onda para aislar los fotones de emisión de los fotones de excitación, y un detector que registra los fotones de emisión y produce una lectura registrable, normalmente como una señal eléctrica o una imagen fotográfica. En general, hay cuatro tipos de detectores reconocidos: espectrofluorímetros y lectores de microplacas; microscopios de fluorescencia; escáneres de fluorescencia; y citómetros de flujo. Un detector de fluorescencia adecuado para utilizarse con la presente invención es un espectrofluorímetro FluoroLog III, que vende SPEX Industries, Inc., de Edison, New Jersey.

Aunque no son necesarios, los criterios de selección de pares de sondas de detección y calibración particularmente deseados incluyen: 1) poco o ningún solapamiento espectral de los espectros de absorción o los espectros de fluorescencia, por lo que se pueden medir por separado las intensidades de emisión; 2) ninguna transferencia de energía fluorescente significativa entre las sondas de detección y de calibración cuando se acercan mucho, de tal forma que emitan de forma independiente, y 3) una longitud de onda de emisión relativamente larga (por ejemplo, mayor de unos 600 nm) de tal forma que la autofluorescencia de los líquidos biológicos tenga un efecto mínimo sobre la medición de la fluorescencia.

Además, si se desea, también se puede utilizar en la presente invención una técnica conocida como “detección de la fluorescencia resuelta en el tiempo”. La detección de la fluorescencia resuelta en el tiempo se diseña para reducir las señales de fondo desde la fuente de emisión o desde procedimientos de dispersión (que son el resultado de dispersar la radiación de la excitación) aprovechando las características de fluorescencia de ciertas sustancias fluorescentes, tales como quelatos lantánidos de europio [Eu(III)] y terbio [Tb(III)]. Tales quelatos pueden mostrar una emisión de larga vida, de banda estrecha y virada al rojo después de la excitación del quelato a longitudes de ondas sustancialmente más cortas. Normalmente, el quelato posee una banda de absorción ultravioleta fuerte debido a un cromóforo localizado cerca del lantánido de la molécula.

Después de la absorción de luz por el cromóforo, se puede transferir la energía de excitación desde el cromóforo excitado al lantánido. A esto le sigue una emisión fluorescente característica del lantánido. El uso de una excitación pulsada y una detección puntual, combinadas con filtros de emisión de banda estrecha, permite la detección específica de la fluorescencia sólo del quelato de lantánido, rechazando la emisión de otras especies presentes en la muestra que normalmente son de vida más corta o que tienen una longitud de onda de emisión más corta. Otras técnicas resueltas en el tiempo para medir la fluorescencia se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 5.585.279 de Davidson y n.º 5.637.509 de Hemmila y otros.

Con independencia de la técnica utilizada para medir la intensidad de señal de las sondas (41) y (43), se ha descubierto que el uso de una sola zona de detección/calibración (31) puede permitir que se midan las sondas de detección y de calibración (41) y (43) en la misma localización del dispositivo (20). Este método de “una sola localización para

la medición” proporciona un enfoque sencillo y atractivo para los usuarios del dispositivo de ensayos, particularmente los destinados a aplicaciones ambulatorias o de laboratorio.

En la zona de detección/calibración (31) se puede averiguar la cantidad del analito a partir de la intensidad de la señal de las sondas de detección (41) que es calibrada por la intensidad de la señal de las sondas de calibración (43). Específicamente, se predetermina y se conoce la cantidad total de las sondas (43) y, por lo tanto, se puede utilizar para propósitos de calibración. Así, la cantidad del analito en la muestra a analizar es directamente proporcional a I_s (intensidad de la señal de las sondas -41-), mientras que la intensidad de la señal de las sondas (43), I_c , debe permanecer relativamente constante con independencia de la presencia del analito. Basándose en el intervalo de intensidad en el que cae este valor calibrado, se puede determinar el intervalo de concentración general para el analito. Como resultado, se puede realizar la calibración y el ensayo de la muestra en aproximadamente las mismas condiciones y al mismo tiempo, lo que proporciona unos resultados cuantitativos y semicuantitativos fiables, con un aumento de la sensibilidad.

Si se desea, la proporción de I_s respecto a I_c se puede representar en una gráfica frente a la concentración del analito para un intervalo de concentraciones de analito conocidas para generar una curva de calibración. Para determinar la cantidad de analito en una muestra a analizar desconocida, la proporción de la señal se puede convertir entonces en la concentración del analito de acuerdo con la curva de calibración. Se debe señalar que se pueden representar gráficamente relaciones matemáticas alternativas entre I_s e I_c frente a la concentración del analito para generar la curva de calibración. Por ejemplo, en una realización, se puede representar gráficamente el valor de $I_s/(I_s+I_c)$ frente a la concentración de analito para generar la curva de calibración.

En relación con la figura 4, se muestra otra realización en la que se utilizan sondas (41) para la detección y sondas (43) para la calibración. Se aplican las sondas de detección (41) a la almohadilla de conjugado (22) y son capaces de fluir a través del dispositivo (20) (como se indica mediante la flecha direccional -L-) cuando se colocan en comunicación con la muestra a analizar. Las sondas de detección (41) se conjugan con un miembro de unión específico (90) para un analito (A) de forma que, una vez en contacto con el analito (A), las sondas (41) se unen a éste para formar los complejos analito/sonda (49). A continuación, los complejos analito/sonda (49) pueden fluir a través del dispositivo (20) hasta que alcanzan la zona de detección/calibración (31). Las sondas de calibración (43) están inmovilizadas dentro de la zona de detección (31) mediante un reactivo de captura polielectrolítico. Por ejemplo, las sondas de calibración (43) pueden incluir micropartículas marcadas, polímeros o moléculas que se unen al polielectrolito mediante una interacción iónica. Además, un miembro de unión específico (91) (por ejemplo, anticuerpo, antígeno, etc.) también se inmoviliza por separado dentro de la zona de detección/calibración (31). Basándose en la naturaleza de las sondas de detección (41), ni los complejos (49) ni las sondas sin unir (41) se unen al reactivo de captura polielectrolítico. En cambio, los complejos analito/sonda (49) se unen al miembro de unión específico (91) para formar los complejos (50) y cualquier sonda que no se une (41) fluye a través de la zona de detección/calibración (31). Una vez que se deja desarrollar completamente, la señal de intensidad I_s de las sondas (41) en la zona de detección/calibración (31) se pueden determinar para calcular la cantidad de analito presente en la muestra a analizar. En esta realización, la cantidad del analito en la muestra a analizar es directamente proporcional a I_s . Además, la señal de intensidad I_c de las sondas de calibración (43) también se puede utilizar para calibrar I_s . Por ejemplo, se puede representar gráficamente la proporción de I_s respecto a I_c frente a la concentración de analito para un intervalo de concentraciones de analito conocidas para generar una curva de calibración.

En relación con la figura 5, se muestra otra realización más en la que se utilizan las sondas (41) para la detección y las sondas (43) para la calibración. Se aplican las sondas de detección (41) y las sondas de calibración (43) a la almohadilla de conjugado (22) y, así, son capaces de fluir a través del dispositivo (20) (como se indica mediante una flecha direccional -L-) cuando se ponen en comunicación con la muestra a analizar. Las sondas de detección (41) se conjugan con un miembro de unión específico (90) para un analito (A) de forma que, al entrar en contacto con el analito (A), las sondas (41) se unen a éste para formar los complejos analito/sonda (49). A continuación, los complejos analito/sonda (49) pueden fluir a través del dispositivo (20) hasta que alcanzan la zona de detección/calibración (31). Se inmoviliza un polielectrolito dentro de la zona de detección/calibración (31) para la unión selectiva con las sondas de calibración (43) (por ejemplo, micropartículas, polímeros o moléculas marcadas) mediante una interacción iónica. Específicamente, las sondas (43) pueden tener un tamaño más pequeño que las sondas (41) de forma que llegan a la zona de detección/calibración (31) antes que las sondas (41) y ocupan todos los sitios de unión proporcionados por el polielectrolito.

Alternativamente, las cargas de las sondas (41) y (43) pueden ser tales que sólo las sondas (43) se unan al polielectrolito. En cualquier caso, un miembro de unión específico (91) (por ejemplo, anticuerpo, antígeno, etc.) también está inmovilizado por separado dentro de la zona de detección/calibración (31). En la zona de detección/calibración (31), los complejos analito/sonda (49) se pueden unir al miembro de unión específico (91) para formar los complejos (50). Cualquier sonda sin unir (41) fluirá a través de la zona de detección/calibración (31). Una vez que se deja desarrollar totalmente, se puede determinar la señal de intensidad I_s de las sondas (41) en la zona de detección/calibración (31) para calcular la cantidad de analito presente en la muestra a analizar. En esta realización, la cantidad del analito en la muestra a analizar es directamente proporcional a I_s . Además, la señal de intensidad I_c de las sondas de calibración (43) también se puede utilizar para calibrar I_s . Por ejemplo, se puede representar gráficamente la proporción de I_s respecto a I_c frente a la concentración de analito para un intervalo de concentraciones de analito conocidas para generar una curva de calibración.

En algunas realizaciones, el dispositivo (20) puede contener zonas adicionales que facilitan la detección del analito de interés. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 6, el dispositivo (20) puede contener una zona de captura (33) que está colocada antes de la zona de detección/calibración (31). La zona de captura (33) contiene un primer reactivo de captura que es específico para las sondas de detección o de calibración. Por ejemplo, en la realización
 5 ilustrada, las sondas de detección (41) se aplican a la almohadilla de conjugado (22) y, así, son capaces de fluir a través del dispositivo (20) cuando se pone en comunicación con la muestra a analizar. Las sondas de detección (41) se pueden conjugar con un miembro de unión específico (90) para un analito (A) de forma que, durante el contacto con el analito (A), las sondas (41) se unen a éste para formar complejos analito/sonda (49). A continuación, los complejos analito/sonda (49) pueden fluir a través del dispositivo (20) hasta que alcanzan la zona de captura (33). Miembros de
 10 unión específicos (91), tales como un anticuerpo o un antígeno que corresponde al analito (A), están inmovilizados dentro de la zona de captura (33). Así, en la zona de captura (33), los complejos analito/sonda (49) pueden unirse a miembros de unión específicos (91) inmovilizados en éstos para formar los complejos (50).

Cualquier sonda sin unir (41) fluirá entonces hasta la zona de detección/calibración (31). En esta realización, también está inmovilizado un segundo reactivo de captura (por ejemplo, polielectrólito) dentro de la zona de detección/calibración (31) que es capaz de unirse a cualquier sonda sin unir (41) mediante una interacción iónica. Además, también se pueden inmovilizar las sondas de calibración (43) en el segundo reactivo de captura dentro de la zona de detección/calibración (31). Por ejemplo, las sondas de calibración (43) pueden incluir micropartículas de látex que también se unen al polielectrólito mediante interacciones iónicas.

Una vez que se deja desarrollar completamente, se puede determinar la señal de intensidad I_s de las sondas (41) en la zona de detección/calibración (31) para calcular la cantidad de analito presente en la muestra a analizar. En esta realización, la cantidad de analito en la muestra a analizar es inversamente proporcional a I_s . Además, la señal de intensidad I_c de las sondas de calibración (43) también se puede utilizar para calibrar I_s . Por ejemplo, se puede
 25 representar gráficamente la proporción de I_s respecto a I_c frente a la concentración de analito para un intervalo de concentraciones de analito conocidas para generar una curva de calibración. Para determinar la cantidad de analito en una muestra a analizar desconocida, se puede convertir entonces la proporción de la señal en una concentración de analito de acuerdo con la curva de calibración. Se debe señalar que se pueden representar gráficamente relaciones matemáticas alternativas entre I_c e I_s frente a la concentración de analito para generar la curva de calibración.

Aunque se han descrito anteriormente diferentes realizaciones de configuraciones de ensayos, se debe entender que un ensayo de la presente invención puede tener en general cualquier configuración deseada, y que no necesita contener todos los componentes descritos anteriormente. Además, también se pueden utilizar en la presente invención otros componentes de ensayo bien conocidos a los que no se hace referencia específicamente en la presente memoria. Por
 35 ejemplo, se describen varias configuraciones de ensayo en las patentes de EE.UU. n.º 5.395.754 de Lambotte y otros, n.º 5.670.381 de Jou y otros, y n.º 6.194.220 de Malick y otros. Además, también se debe entender que se pueden formar también ensayos competitivos de acuerdo con la presente invención. Las técnicas y las configuraciones de los ensayos competitivos son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Como ejemplo, el dispositivo de flujo continuo (20) descrito más anteriormente e ilustrado en la figura 3 se puede modificar fácilmente para formar un ensayo competitivo. En esta realización, las sondas de detección (41) pueden ser un analito o análogo de analito, mientras que las sondas de calibración (43) pueden incluir, por ejemplo, micro-
 40 partículas de látex conjugadas con un miembro de unión específico para el analito de interés. Cuando se aplica la muestra a analizar, las sondas de detección (41) atraviesan la membrana porosa (23) hasta que alcanzan la zona de detección/calibración (31). En la zona (31), las sondas de detección (41) y cualquier analito (A) dentro de la muestra a analizar compiten por los miembros de unión específicos (91) (por ejemplo, anticuerpo, antígeno, etc.). Cualquier sonda sin unir (41) fluirá a través de la zona de detección/calibración (31). En esta realización, la cantidad de analito en la muestra a analizar es inversamente proporcional a I_s (intensidad de la señal de las sondas -41-). Si se desea, la proporción de I_s respecto a I_c (intensidad de la señal de las sondas -43-) se puede representar gráficamente frente a la concentración de analito en un intervalo de concentraciones de analito conocidas para generar una curva de
 50 calibración.

La presente invención se comprenderá mejor con referencia a los ejemplos siguientes.

55 Ejemplo 1

Se demostró la capacidad que tiene una zona de detección/calibración interna de la presente invención para calibrar un ensayo en sandwich. Inicialmente, las muestras de membrana porosa HF120 se laminaron sobre las correspondientes tarjetas de soporte que tienen una longitud de aproximadamente 30 cm. Las perlas fluorescentes (sondas de calibración) se obtuvieron de Molecular Probes, Inc. y tenían un tamaño de partícula de $0,2 \mu\text{m}$ y unas longitudes de onda de excitación/emisión de 505/515 nm. Se lavaron las perlas y se guardaron en tampón de almacenamiento a un porcentaje en peso del 0,28%. Se mezclaron $40 \mu\text{l}$ de la disolución de perlas fluorescentes con $10 \mu\text{l}$ de una disolución de polilisina y se depositaron en forma de tiras sobre la membrana para formar una línea de detección/calibración. El anticuerpo monoclonal CRP Mab 5804 que tenía una concentración de 2,36 mg/ml (obtenido de Biogenesis, Inc.) se
 65 inmovilizó sobre las muestras de membrana porosa para formar una línea de captura. A continuación, se secaron las muestras de la membrana durante 1 hora a una temperatura de 37°C . Se acopló una almohadilla de mechas de fibra celulósica (Millipore Co.) a un extremo de la membrana y se cortó en tiras de 4 mm.

Las muestras de medias tiras se colocaron en diferentes micropocillos que contenían mezclas de perlas fluorescentes (sondas de detección) y diferentes concentraciones del antígeno CRP. La cantidad de las perlas fluorescentes era la misma para cada mezcla, es decir, 4 μg . Se formaron las perlas fluorescentes de detección como se explica a continuación. Inicialmente, se proporcionaron perlas de poliestireno que tienen grupos funcionales carboxilo (obtenidos de Molecular Probes, Inc.). Las perlas tenían un tamaño de partícula de 0,5 μm y unas longitudes de onda de excitación/emisión de 580/605 nm. Se lavaron dos veces 100 μl de las perlas de poliestireno (concentración al 2%) con tampón MES y se separaron con una centrifugadora. Las perlas sedimentadas se volvieron a suspender en 100 μl de tampón MES y se mezclaron con 50 μl de tampón MES que tienen 4 mg de carbodiimida (de Polysciences, Inc.). Se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos en un agitador. A continuación, se lavaron las perlas activadas dos veces con un tampón de borato. Se volvieron a suspender las perlas activadas en 200 μl de tampón de borato y se mezclaron con 15 μl de un anticuerpo monoclonal de la proteína C reactiva (CRP Mab 5811 de Biogenesis, Inc.) que tiene una concentración de 6,4 mg/ml. Se dejó transcurrir la reacción durante una noche en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción resultante se mezcló con 100 μl de etanolamina durante 15 minutos con un agitador. Se desechó la disolución sobrenadante y se lavaron las perlas dos veces con un tampón PBS y se guardaron a 4°C en un tampón de almacenamiento que contenía PBS a 0,1 M, NaCl a 0,15 M, BSA al 1%, glicerol al 5% y NaN_3 al 0,1% para dar lugar a perlas conjugadas de una concentración de 4 mg/ml.

A continuación, se midió la intensidad fluorescente en la línea de detección/calibración utilizando un espectrofluorímetro Fluorolog III (SPEX Industries, Inc., Edison, NJ) con un modo de ángulo recto. Los resultados se muestran en la tabla 1, donde I_s representa la intensidad de señal de las sondas de detección en la línea de detección/calibración, e I_c representa la intensidad de señal de las sondas de calibración en la línea de detección/calibración.

TABLA 1

Resultados de la intensidad de señal

Analito (ng/ml)	I_c	I_s/I_c
0	400	1258
33	426	1068
66	450	971
189	470	860
378	450	822
756	470	564

Tal y como se pone de manifiesto a partir de los resultados anteriores, cuando no había ningún analito presente en la muestra, las sondas de detección en movimiento pasaron la línea de captura y fueron capturadas sobre la línea de detección/calibración. Cuando el analito estaba presente en la muestra, las sondas de detección se acomplejaron con el analito y se capturaron sobre la línea de captura, sin que ninguna sonda de detección restante se capturara en la línea de detección/calibración. Por lo tanto, la intensidad de las sondas de detección (I_s) sobre la línea de detección/calibración fue inversamente proporcional a la concentración de analito, mientras que la intensidad (I_c) de las sondas de calibración en la línea de detección/calibración permaneció relativamente constante para las diferentes concentraciones de analitos, es decir, aproximadamente 444 ± 27 . Se cree que las variaciones de la I_c se deben a las distintas condiciones medioambientales del ensayo y a la inestabilidad instrumental. Sin embargo, se espera que la variación haya tenido un efecto similar sobre I_s . Por lo tanto, se cree que I_s/I_c proporcionará un resultado más exacto en este ejemplo.

Ejemplo 2

Se demostró la capacidad de que una zona de detección/calibración interna de la presente invención calibre un ensayo de sandwich. Inicialmente, las muestras de membrana porosa HF 120 se extendieron sobre las correspondientes tarjetas de soporte que tienen una longitud de aproximadamente 30 cm. A continuación, se formaron polímeros fluorescentes (sondas de calibración) de la siguiente forma. Inicialmente, se disolvieron 0,5 g de ácido poliacrílico (MW = 450.000, D.P. = 6250) en 20 ml de metanol. A la disolución, se le añadieron 3,8 mg de dicitohexilcarbodiimida (DCC) en 1 ml de metanol para activar el polímero de ácido poliacrílico. Se agitó la disolución resultante durante 30 minutos. Se fabricó una disolución de colorante fluorescente disolviendo 10 mg de 5-(y 6)-((N-(5-aminopentil)amino)-carbonil)tetrametilrodamina (longitudes de onda de excitación/emisión de 544/590 nm, Molecular Probes, Inc.) en 1 ml de una disolución de metanol. Se añadió la disolución del colorante a la disolución del ácido poliacrílico activado

ES 2 290 524 T3

y se agitó. Se continuó la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente con la disolución envuelta en papel de aluminio. Después de parar la reacción, se añadió dietiléter para formar un precipitado. Se centrifugó el precipitado y se embebió en etanol para retirar cualquier colorante fluorescente sin reaccionar. Después de retirar la disolución de etanol, se secó al aire el gel rojo residual.

Después, los polímeros fluorescentes (sondas de calibración) descritos anteriormente se disolvieron en agua y se mezclaron con CelQuat® 100-H (un derivado polielectrolítico celulósico disponible de National Starch & Chemical, Inc.). Esta mezcla se depositó en tiras sobre la membrana para formar una línea de detección/calibración. El anticuerpo monoclonal CRP Mab 5811 que tiene una concentración de 6,4 mg/ml (obtenido de Biogenesis, Inc.) se inmovilizó sobre las muestras de la membrana porosa para formar una línea de captura. A continuación, se secaron las muestras de la membrana durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Se acopló una almohadilla de mechas de fibra celulósica (Millipore Co.) a un extremo de la membrana y se cortó en tiras de 4 mm.

Las muestras de medias tiras se colocaron sobre distintos micropocillos que contenían mezclas de perlas fluorescentes (sondas de detección) y diferentes concentraciones del antígeno CRP. La cantidad de las perlas fluorescentes (sondas de detección) era la misma para cada mezcla, es decir, 4 µg. Se formaron las perlas fluorescentes (sondas de detección) como se describe a continuación. Inicialmente, se proporcionaron perlas de poliestireno que tenían grupos funcionales carboxilo (obtenidos de Molecular Probes, Inc.). Las perlas tenían un tamaño de partícula de 0,2 µm y unas longitudes de onda de excitación/emisión de 505/515 nm. Cien microlitros de las perlas de poliestireno (concentración del 2%) se lavaron dos veces con tampón MES y se separaron con una microcentrifugadora. Se volvieron a suspender las perlas sedimentadas en 200 µl de tampón MES y se mezclaron con 20 µl de tampón MES que contenía 4,8 mg de carbodiimida (de Polysciences, Inc.). Se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos en un agitador. A continuación, se lavaron las perlas activadas dos veces con un tampón de borato. Se resuspendieron las perlas activadas en 200 µl de tampón borato y se mezclaron con 90 µl de un anticuerpo monoclonal contra la proteína C reactiva (CRP Mab 5804 de Biogenesis, Inc.) que tiene una concentración de 2,36 mg/ml. Se dejó reaccionar la mezcla durante una noche sobre un agitador a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción resultante se mezcló con 100 µl de etanolamina durante 15 minutos con un agitador. Se desechó la disolución del sobrenadante y se lavaron las perlas dos veces con tampón PBS y se guardó a 4°C en un tampón de almacenamiento que contenía PBS a 0,1 M, NaCl a 0,15 M, BSA al 1%, glicerol al 5% y NaN₃ al 0,1% para dar lugar a perlas conjugadas de una concentración de 4 mg/ml.

Después se midió la intensidad de la fluorescencia en la línea de detección/calibración utilizando un espectrofluorímetro Fluorolog III (SPEX Industries, Inc., Edison, NJ) con un modo de ángulo recto. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 2, donde I_s representa la intensidad de señal de las sondas de detección en la línea de detección/calibración, e I_c representa la intensidad de señal de las sondas de calibración en la línea de detección/calibración.

TABLA 2

Resultados de la intensidad de señal

Analito (ng/ml)	I _c	I _s /I _c
0	37	16622
5	42	13714
25	36	15111
50	34	14971
250	34	9529
500	33	7152
2500	34	1765

Como se pone de manifiesto a partir de los resultados anteriores, cuando no había ningún analito en la muestra, las sondas de detección en movimiento pasaron la línea de captura y fueron capturadas sobre la línea de detección/calibración. Cuando el analito estaba presente en la muestra, las sondas de detección se acomplejaron con el analito y fueron capturadas sobre la línea de captura, sin que ninguna de las sondas de detección restantes se capturara en la línea de detección/calibración. Por lo tanto, la intensidad de las sondas de detección (I_s) sobre la línea de detección/calibración fue inversamente proporcional a la concentración de analito, mientras que la intensidad (I_c)

ES 2 290 524 T3

de las sondas de calibración en la línea de detección/calibración permaneció relativamente constante para diferentes concentraciones de analito, es decir, aproximadamente 36 ± 6 . Se cree que las variaciones de la I_C se deben a las distintas condiciones medioambientales del ensayo y a la inestabilidad instrumental. Sin embargo, se espera que la variación tenga un efecto similar sobre I_S . Por lo tanto, se cree que I_S/I_C ha proporcionado un resultado más exacto en este ejemplo.

Aunque se ha descrito la invención en detalle con respecto a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica se darán cuenta de que, después de comprender lo anterior, se pueden concebir fácilmente alteraciones, variaciones y equivalentes de estas realizaciones. Por consiguiente, el alcance de la presente invención se debe evaluar como el de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, capaz de detectar la presencia o la cantidad de un analito que reside en una muestra a analizar, comprendiendo dicho dispositivo de ensayo de flujo continuo una membrana porosa, estando dicha membrana porosa en comunicación con sondas de detección capaces de generar una señal de detección y sondas de calibración capaces de generar una señal de calibración, en el que se puede determinar la cantidad del analito a partir de dicha señal de detección que está calibrada por dicha señal de calibración, en el que dichas sondas de detección, dichas sondas de calibración, o combinaciones de las mismas están conjugadas a un miembro de unión específico para el analito,

caracterizado el ensayo de flujo continuo porque

dicha membrana porosa define una única zona de detección/calibración dentro de la cual está inmovilizado un reactivo de captura polielectrolítico que está configurado para unirse directa o indirectamente a combinaciones de las sondas de detección y las sondas de calibración, en el que dichas sondas de detección son capaces de generar una señal de detección y dichas sondas de calibración son capaces de generar una señal de calibración mientras permanecen dentro de dicha zona de detección/calibración, y en el que dicho polielectrolito tiene una carga positiva neta y se selecciona entre el grupo que consiste en polilisina, polietilenimina, poliaminas o poliamidoaminas funcionalizadas con epíclorohidrina, cloruro de polidialildimetilamonio, derivados catiónicos de la celulosa, y combinaciones de los mismos, o dicho polielectrolito tiene una carga negativa neta y es un ácido poliacrílico, o dicho polielectrolito es anfipático.

2. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que dichas sondas de detección y dichas sondas de calibración se seleccionan entre el grupo que consiste en cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos fosforescentes, compuestos radiactivos, marcadores visuales directos, liposomas y combinaciones de los mismos.

3. Dispositivo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 2, en el que dichas sondas de detección y sondas de calibración son compuestos fluorescentes.

4. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que dichas sondas de detección, dichas sondas de calibración, o combinaciones de las mismas contienen micropartículas.

5. Dispositivo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que un segundo reactivo de captura está inmovilizado en dicha membrana porosa dentro de dicha zona de detección/calibración que es un miembro de unión específico para el analito.

6. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 5, en el que dicho segundo reactivo de captura está configurado para unirse directa o indirectamente a dichas sondas de detección cuando se ponen en contacto con éste.

7. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que dicha membrana porosa define además una zona de captura ubicada delante de dicha zona de detección/calibración dentro de la cual uno o más reactivos de captura están inmovilizados, que están configurados para unirse directa o indirectamente a dichas sondas de detección.

8. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 7, en el que dicho reactivo de captura de dicha zona de captura es un miembro de unión específico para el analito.

9. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que el dispositivo es un dispositivo de ensayo de tipo sandwich.

10. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que el dispositivo es un dispositivo de ensayo de tipo competitivo.

11. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en las reivindicaciones 1 a 10, en el que el reactivo de captura polielectrolítico está inmovilizado de manera que no puede difundir.

12. Dispositivo de ensayo de flujo continuo, tal como se define en la reivindicación 1, en el que la cantidad del analito dentro de la muestra a analizar es proporcional a la intensidad de la señal de detección dividida por la intensidad de la señal de calibración.

13. Método para detectar la presencia o la cantidad de un analito que reside en una muestra a analizar, comprendiendo dicho método:

- i) proporcionar el dispositivo de ensayo de flujo continuo de acuerdo con la reivindicación 1;

ES 2 290 524 T3

ii) poner en contacto una muestra a analizar que contiene el analito con dichas sondas de detección y dichas sondas de calibración;

iii) medir la intensidad de la señal de detección y la intensidad de la señal de calibración generada dentro de dicha zona de detección/calibración; y

iv) calibrar la intensidad de la señal de detección con la señal de calibración, en la que la cantidad del analito dentro de la muestra a analizar se determina a partir de dicha señal de detección que está calibrada mediante dicha señal de calibración.

14. Método, tal como se define en la reivindicación 13, en el que dichas sondas de detección y dichas sondas de calibración se seleccionan entre el grupo que consiste en cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos fosforescentes, compuestos radiactivos, marcadores visuales directos, liposomas y combinaciones de los mismos.

15. Método, tal como se define en la reivindicación 14, en el que dichas sondas de detección y dichas sondas de calibración son compuestos fluorescentes.

16. Método, tal como se define en la reivindicación 15, que comprende además excitar dichas sondas de detección y dichas sondas de calibración dentro de dicha zona de detección/calibración, en el que la excitación causa que dichas sondas de detección emitan la señal de detección y dichas sondas de calibración emitan la señal de calibración.

17. Método, tal como se define en la reivindicación 13, en el que se inmoviliza un segundo reactivo de captura dentro de dicha zona de detección/calibración que es un miembro de unión específico para el analito.

18. Método, tal como se define en la reivindicación 17, en el que dicho segundo reactivo de captura está configurado para unirse directa o indirectamente a dichas sondas de detección cuando se ponen en contacto con éste.

19. Método, tal como se define en la reivindicación 13, en el que dicha membrana porosa define además una zona de captura ubicada delante de dicha zona de detección/calibración dentro de la cual uno o más reactivos de captura están inmovilizados y están configurados para unirse directa o indirectamente a dichas sondas de detección.

20. Método, tal como se define en la reivindicación 13, que comprende además la generación de una curva de calibración al representar en una gráfica la intensidad de la señal de detección calibrada por la intensidad de la señal de calibración para numerosas concentraciones de analito predeterminadas.

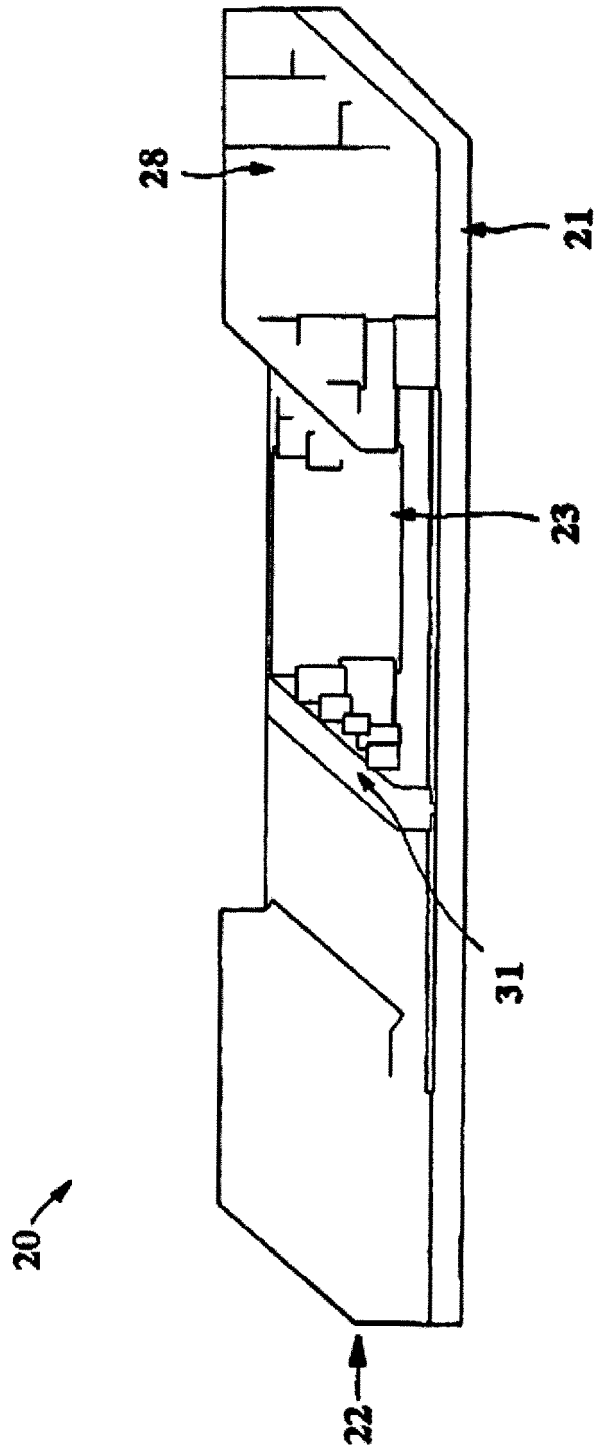


Figura 1

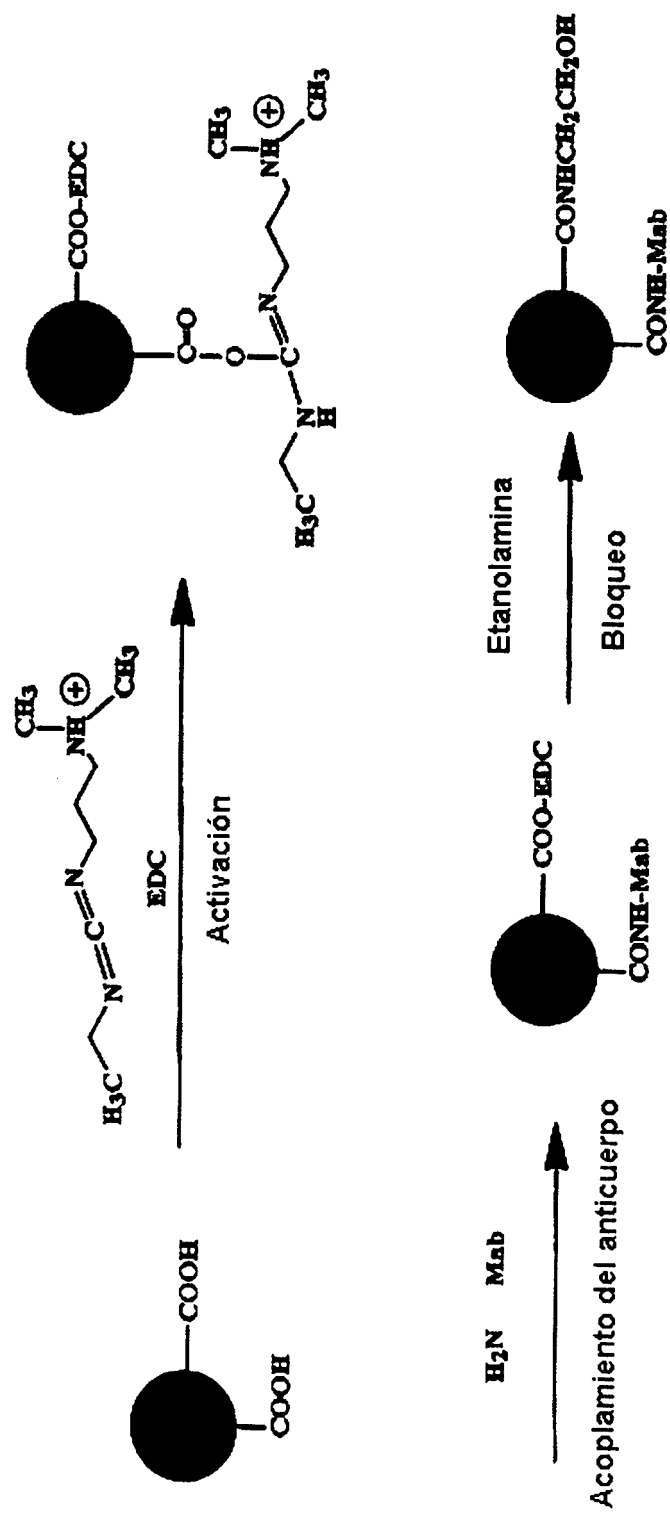


Figura 2

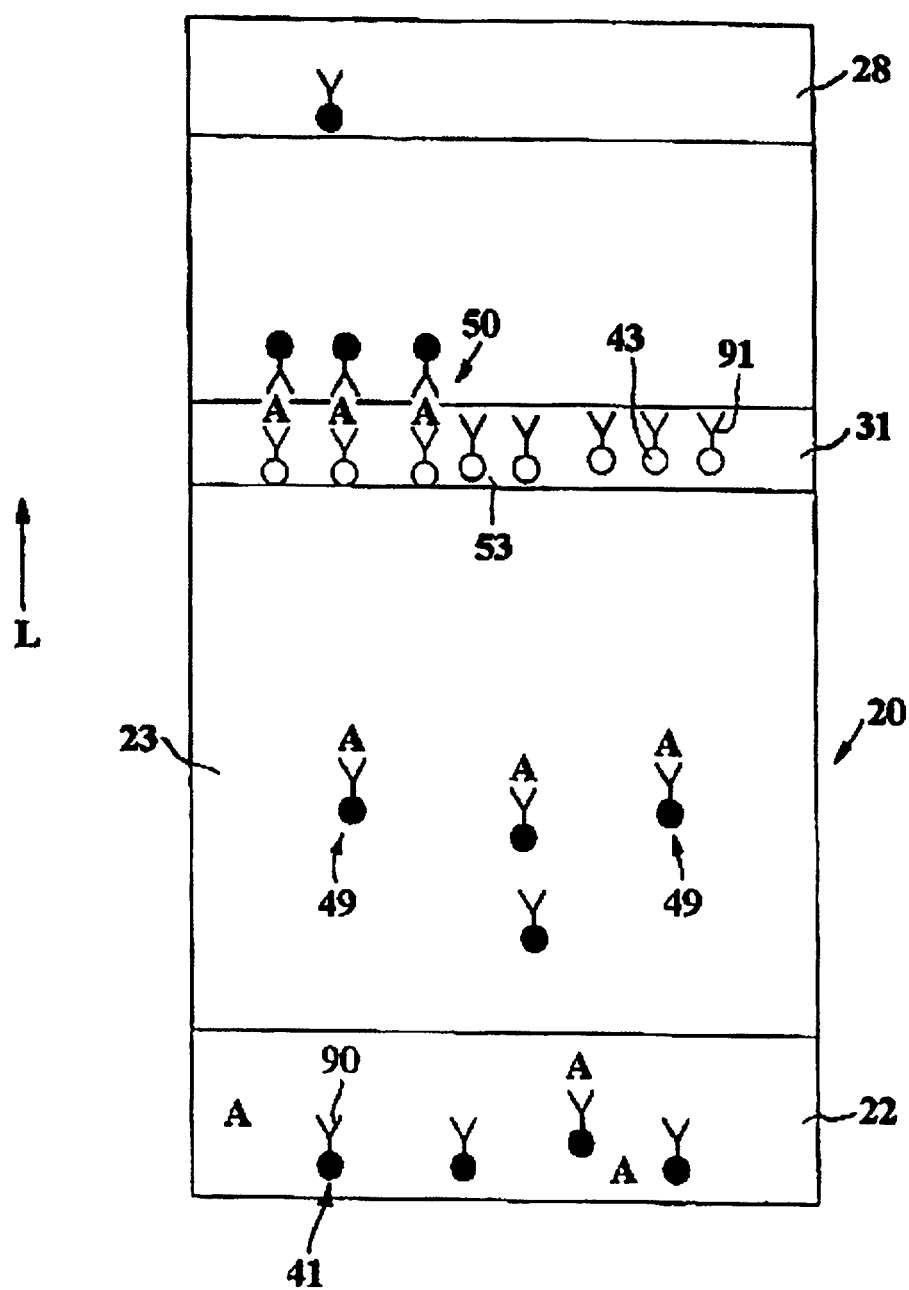


Figura 3

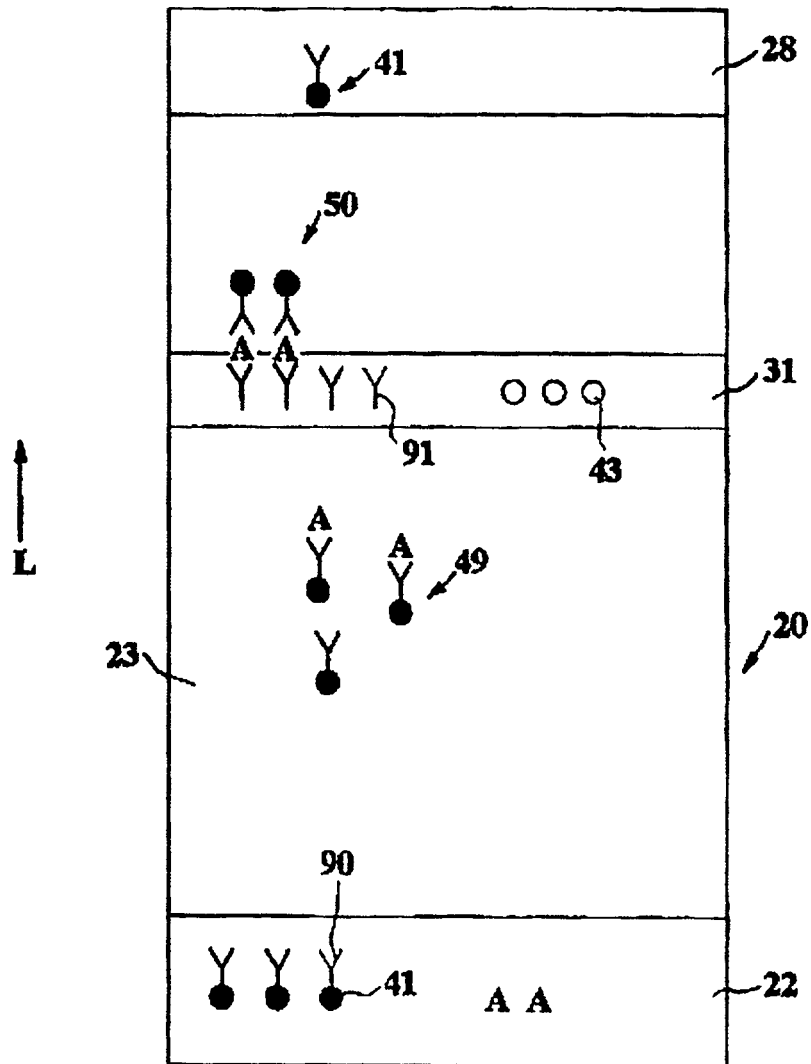


Figura 4

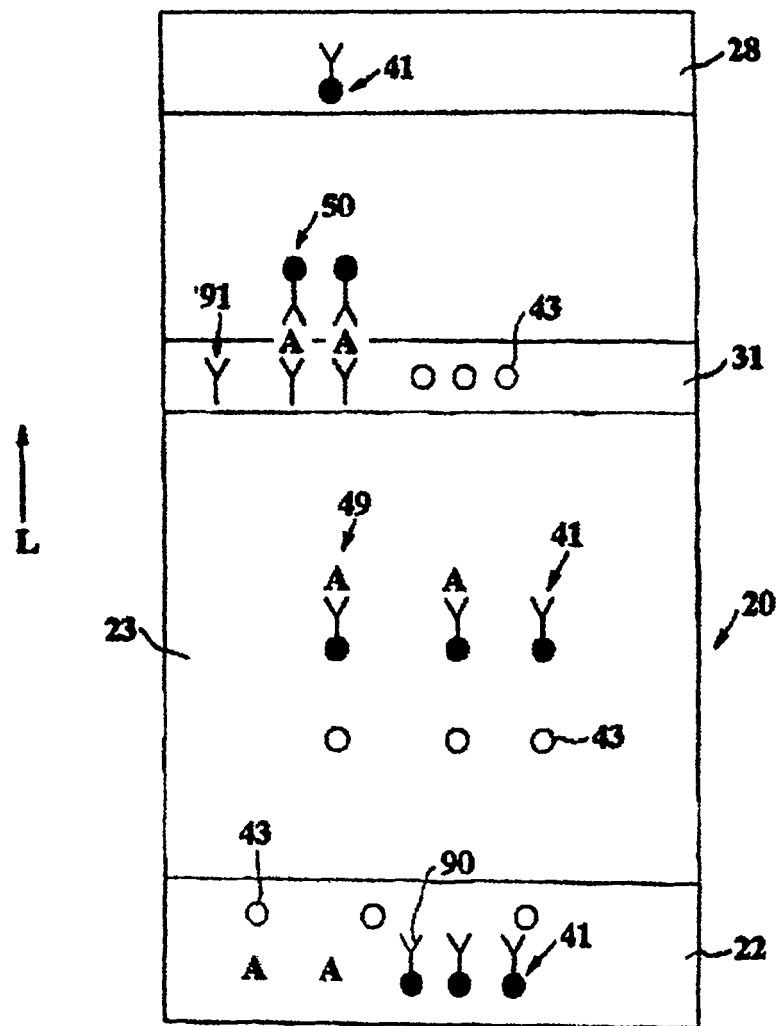


Figura 5

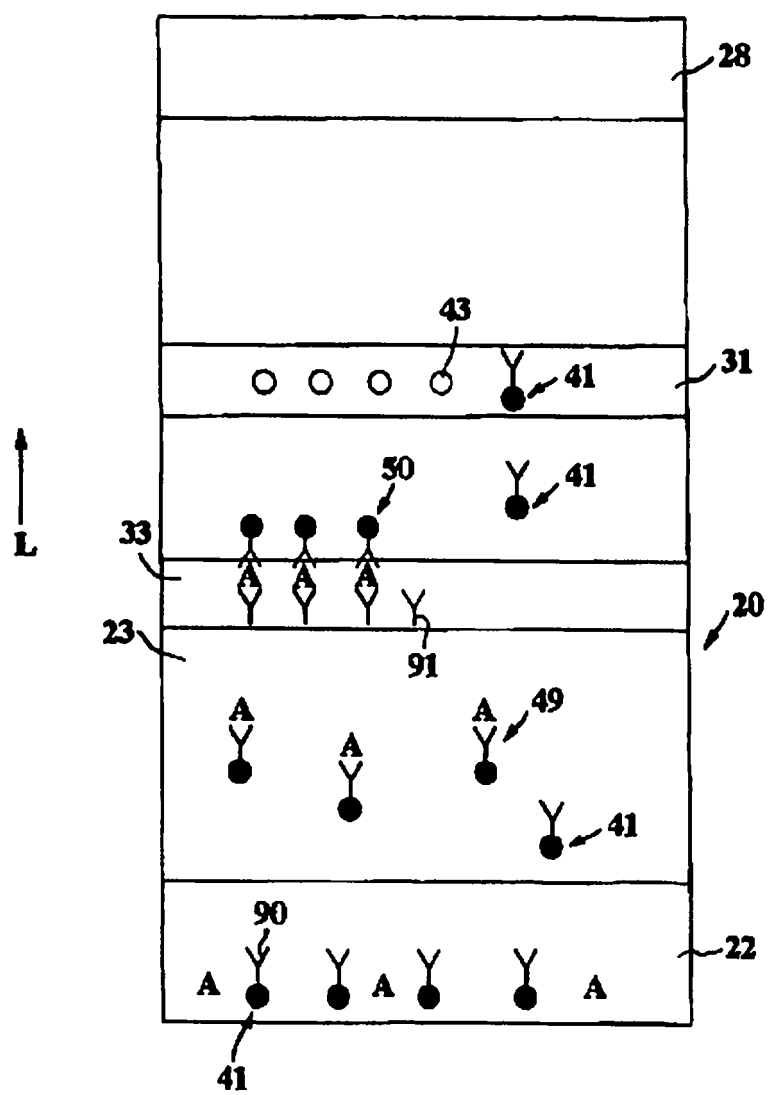


Figura 6