

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 663**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**F21K 2/06** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027208**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14768031 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2972245**

54 Título: **Inmunoensayos de canalización de oxígeno luminiscentes heterogéneos**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361788194 P**

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

**04.05.2021**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.  
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue  
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**LED DEN, DAVID J.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 822 663 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Inmunoensayos de canalización de oxígeno luminiscentes heterogéneos

### Antecedentes

5 Las tecnologías de inmunoensayo se usan ampliamente en el campo de los diagnósticos médicos. Un ejemplo de un inmunoensayo usado comercialmente es la tecnología de inmunoensayo de luminiscencia inducida (LOCI®). El inmunoensayo de luminiscencia inducida se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.340.716 (Ullman). La tecnología LOCI® actualmente disponible implica un ensayo homogéneo (es decir, sin etapas de lavado involucradas) que tiene alta sensibilidad, y el ensayo usa varios reactivos y requiere que dos de estos reactivos (conocidos como "sensibead" y "chemibead") contenidos por otros reactivos de inmunoensayo estén cerca para lograr una señal. Al exponerse a la luz a determinada longitud de onda, el sensibilizador libera oxígeno singlete, y si las dos perlas están muy cerca, el oxígeno singlete se transfiere al chemibead; esto provoca una reacción química que da como resultado que el chemibead emita luz que se puede medir a una longitud de onda diferente.

15 Sin embargo, existen obstáculos para esta tecnología. Existen múltiples factores que pueden contribuir a la señal de fondo, tales como, pero sin limitarse a, (1) la unión inespecífica de dos perlas entre sí y (2) la presencia de dos perlas sin unir que simplemente están muy próximas entre sí. Por estos motivos, la mezcla de reacción final se diluye antes de la exposición a la luz para disociar las perlas unidas de forma no específica y para aumentar la distancia media de las partículas entre las perlas no unidas. Además, como el ensayo es homogéneo, se requiere la separación de plasma y, por lo tanto, no se puede utilizar directamente sangre completa en esta plataforma de diagnóstico.

20 El documento WO 2011/143606 A1 desvela un kit de ensayo de quimioluminiscencia homogéneo para la detección de un analito en una muestra. El kit crea una mezcla de reacción que comprende una reacción de activación de oxígeno singlete mediada por analito con un compuesto quimioluminiscente. Además, en la mezcla de reacción está presente un agente de modulación del ruido, que inactiva el oxígeno singlete.

El documento US 2013/041236 A1 desvela un dispositivo microfluídico para fluidos de muestra, en el que los analitos se detectan usando quimioluminiscencia.

25 El o los conceptos inventivos actualmente desvelados y reivindicados se refieren a composiciones, ensayos y métodos de producción y uso nuevos y mejorados; esta tecnología proporciona un formato de ensayo heterogéneo en el que se reduce la señal de fondo y no se requiere separación de plasma.

### Descripción de las diversas vistas de los dibujos

La figura 1 ilustra una realización de un dispositivo microfluídico.

30 La figura 2 ilustra una segunda realización de un dispositivo microfluídico.

La figura 3 ilustra una tercera realización de un dispositivo microfluídico

La figura 4 ilustra otra realización de un dispositivo microfluídico

La figura 5 ilustra otro ejemplo de un dispositivo microfluídico

La figura 6 ilustra otra realización más de un dispositivo microfluídico.

### 35 Descripción detallada

La presente invención se define en las reivindicaciones 1, 6 y 11. Antes de explicar al menos una realización de la presente invención en detalle por medio de dibujos ejemplares, parte experimental, resultados y procedimientos de laboratorio, se debe entender que la presente invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a las disposiciones de los componentes establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, parte experimental y/o resultados.

45 A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con el concepto o los conceptos inventivos actualmente desvelados y reivindicados tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan

5 generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica.

Todas las patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones que no son patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la que pertenece esta invención actualmente desvelada y reivindicada.

10 Todas las composiciones y/o métodos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden elaborarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de esta invención actualmente desvelada y reivindicada se han descrito en términos de realizaciones particulares, será evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse de la invención como se reivindica. Se considera que todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la materia están dentro del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas.

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

15 El uso del artículo "un" o "una", cuando se utiliza junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar "uno", pero también cuadra con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno". El uso de la conjunción "o" en las reivindicaciones se usa para decir "y/o", a no ser que se indique explícitamente que hace referencia solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere únicamente a las alternativas y a "y/o". A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente del error del dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cuando se utiliza el término "aproximadamente", el valor designado puede variar en más o menos el doce por ciento, el once por ciento, el diez por ciento, el nueve por ciento, el ocho por ciento o el siete por ciento, o el seis por ciento, o el cinco por ciento, o el cuatro por ciento, o el tres por ciento, o el dos por ciento, o el uno por ciento. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye uno, así como cualquier cantidad más de uno, incluyendo pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1000 o más, dependiendo del término al que se adjunta; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitantes, ya que límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término "al menos uno de X, Y y Z" incluye X solo, Y solo y Z solo, así como cualquier combinación de X, Y y Z. El uso de terminología numérica ordinal (es decir, "primero", "segundo", "tercero", "cuarto", etc.) tiene como único objetivo diferenciar entre dos o más elementos y no implica ninguna secuencia, orden o importancia para un artículo sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.

20 Tal y como se usan en esta memoria descriptiva y en las o las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de este verbo, como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de este verbo, como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de este verbo, como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de este verbo, como "contiene" y "contienen") son inclusivos y abiertos y no excluyen elementos o etapas de método adicionales no enumerados.

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

30 Como se usa en el presente documento, la frase "asociado con" incluye unión covalente de un resto a otro resto, ya sea mediante un enlace directo o mediante un grupo espaciador, unión no covalente de un resto a otro resto, ya sea directamente o por medio de miembros de pares de unión específicos unidos a los restos, incorporación de un resto en otro resto tal como disolviendo un resto en otro resto o mediante síntesis, y revestimiento con un resto de otro resto, por ejemplo.

35 El término "purificado" como se usa en el presente documento significa que se logra al menos un orden de magnitud de purificación en comparación con el material de partida o con el material natural, por ejemplo, pero no a modo de limitación, dos, tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud de purificación del material de partida o del material natural. De este modo, el término "purificado" tal como se utiliza en el presente documento no significa necesariamente que el

material esté purificado al 100 % y, por lo tanto, dicho término no excluye la presencia de otros materiales presentes en la composición purificada.

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

Los términos "análogo" y "derivado" se usan en el presente documento indistintamente y se refieren a una sustancia que comprende el mismo esqueleto de carbono básico y funcionalidad de carbono en su estructura que un compuesto dado, pero que también puede contener una o más sustituciones del mismo. Se entenderá que el término "sustitución", como se usa en el presente documento, se refiere al reemplazo de al menos un sustituyente en un compuesto con un residuo R. En determinadas realizaciones no limitantes, R puede incluir H, hidroxilo, tiol, un halógeno seleccionado de fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro, un compuesto de C1-C4 seleccionado entre los siguientes: alquilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, y alqueno lineal ramificado o cíclico, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan entre uno o más de alquenalquilo, alquinalquilo, cicloalquilo, cicloalquenalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan entre uno o más de alquenalquilo, alquinalquilo, cicloalquilo, cicloalquenalquilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, fenilo, ciano, hidroxilo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH(cicloalquilo)<sub>2</sub>, carboxi y -C(O)-alquilo.

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

Se entenderá que el término "muestra", como se usa en el presente documento, incluye cualquier tipo de muestra biológica que pueda utilizarse de acuerdo con el o los conceptos inventivos actualmente desvelados y reivindicados. Ejemplos de muestras biológicas que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, sangre completa o cualquier parte de la misma, plasma, suero, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), piel, piel, líquidos intersticiales, lágrimas, moco, orina, hisopos, y similares.

Se entenderá que el término "socio de unión" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula capaz de asociarse con otra molécula. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el socio de unión puede ser un anticuerpo (incluyendo anticuerpos policlonales o monoclonales), fragmentos de anticuerpos (tales como, pero sin limitarse a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios y otros fragmentos de anticuerpos que conservan al menos una parte de la región variable de un anticuerpo intacto), un receptor, un ligando, aptámeros, proteínas o péptidos sustitutos de anticuerpos (es decir, proteínas/péptidos de unión modificados genéticamente), polímeros de impresión molecular (es decir, matrices inorgánicas), combinaciones o derivados de los mismos, así como cualquier otra molécula capaz de unirse específicamente al analito.

Pasando ahora a realizaciones particulares, se desvelan composiciones de ensayo así como kits que las contienen y métodos de uso de las mismas. En algunas realizaciones de ensayo, los miembros del sistema productor de señales (sps) comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente donde la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. Un miembro del sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro de sps unido y/o no unido, es decir, la cantidad de miembro de sps unido o no unido al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad del analito a detectar. Una realización ejemplar de una plataforma de ensayo en la que se basan el o los conceptos inventivos actualmente desvelados y reivindicados es el inmunoensayo de luminiscencia inducida (LOCI®). El inmunoensayo de luminiscencia inducida se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.340.716 (Ullman).

La presente invención se refiere a una composición, que incluye al menos dos componentes: (a) una composición capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana y que incluye tanto un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete como un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado; y (b)

una composición que comprende un inactivador de oxígeno singlete capaz de unirse específicamente al sensibilizador no unido, en el que la composición se une al sensibilizador no unido. De acuerdo con la presente invención, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y el sensibilizador se disponen juntos en una única composición; esta composición puede estar en forma de formulación de una sola perla o similar.

5 En otros ejemplos, la composición contiene un sistema de detección quimioluminiscente competitivo. En estos ejemplos, el analito diana o un análogo del mismo se une al sensibilizador o a la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. El otro reactivo es capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana o análogo del mismo unido al sensibilizador/composición quimioluminiscente o al analito diana presente en una muestra.

10 Cualquiera de las composiciones descritas anteriormente en el presente documento o contempladas de otro modo en el presente documento puede incluir además una solución de lavado. Además, cualquiera de las composiciones descritas anteriormente en el presente documento o contempladas de otro modo en el presente documento también puede incluir un dispositivo microfluídico en el que están dispuestos los componentes enumerados anteriormente (y/o la solución de lavado).

15 Debe entenderse que el sensibilizador puede estar provisto de múltiples sitios de unión en el mismo, con lo que la composición que comprende el inactivador de oxígeno singlete es capaz de unirse específicamente (ya sea directa o indirectamente) a cualquier sitio de unión no unido en el sensibilizador (incluyendo los sitios de unión no unidos presentes en sensibilizadores complejados y no complejados).

20 Un sensibilizador es una molécula, normalmente un compuesto, para la generación de un intermedio reactivo tal como, por ejemplo, oxígeno singlete, para la activación de un compuesto quimioluminiscente. En algunas realizaciones, el sensibilizador es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores que pueden activarse químicamente (mediante, por ejemplo, enzimas y sales metálicas) incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o sin activación por una fuente de luz externa. Por ejemplo, se ha demostrado que determinados compuestos catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno singlete y agua. Los ejemplos no limitantes de otras sustancias y composiciones sensibilizadoras incluyen óxidos de los metales alcalinotérreos Ca, Sr y Ba; derivados de elementos de los grupos 3A, 4A, 5A y 6A en configuración  $d^n$ ; óxidos de actínidos y lantánidos; y oxidantes  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{BrO}^-$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{IO}_3^-$  y  $\text{IO}_4^-$ ; y en particular, iones molibdato, peroxomolibdato, tungstato y peroxotungstato y acetonitrilo. Las siguientes referencias proporcionan una divulgación adicional con respecto a sustancias y composiciones sensibilizadoras que también están dentro del alcance de la presente invención: Aubry, J. Am. Chem. Soc., 107: 5844-5849 (1985); Aubry, J. Org. Chem., 54: 726-728 (1989); Böhme y Brauer, Inorg. Chem., 31: 3468-3471 (1992); Niu y Foote, Inorg. Chem., 31: 3472-3476 (1992); Nardello *et al.*, Inorg. Chem., 34: 4950-4957 (1995); Aubry y Bouttemy, J. Am. Chem. Soc., 119: 5286-5294 (1997); y Almeida *et al.*, Anal. Chim. Acta, 482: 99-104 (2003).

35 También se incluyen dentro del alcance de los fotosensibilizadores los compuestos que no son verdaderos sensibilizadores pero que al ser excitados por calor, luz, radiación ionizante o activación química liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros de esta clase de compuestos incluyen, por ejemplo, los endoperóxidos tales como endoperóxido de 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno, 9,10-difenilantraceno-9,10-endoperóxido y 5,12-endoperóxido de 5,6,11,12-tetrafenilnaftaleno. El calentamiento o la absorción directa de luz por estos compuestos libera oxígeno singlete.

40 Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la activación de un compuesto fotoactivo, por ejemplo, mediante la generación de oxígeno singlete por excitación con luz. Los fotosensibilizadores son fotoactivables e incluyen, por ejemplo, tintes y compuestos aromáticos, y habitualmente son compuestos formados por átomos unidos covalentemente, habitualmente con múltiples dobles o triples enlaces conjugados. Los compuestos deben absorber luz en el intervalo de longitud de onda de 200 a 1100 nm, o de 300 a 1000 nm, o de 450 a 950 nm, con un coeficiente de extinción en su máximo de absorbancia superior a  $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  o más de  $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  o superior a  $50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores deben ser relativamente fotoestables y pueden no reaccionar eficazmente con el oxígeno singlete. Ejemplos de fotosensibilizadores, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metaloporfirinas, tales como hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala y buckminsterfullereno, por ejemplo, y derivados de estos compuestos.

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

emisión de luz.

5 En determinadas realizaciones, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete puede ser una sustancia que experimenta una reacción química con oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión de luz simultánea o posterior. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete puede asociarse con el analito diana mediante cualquier método conocido en la técnica; por ejemplo, pero no a modo de limitación, la composición puede tener un segundo socio de unión específico de analito asociado con la misma que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente al analito diana. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente puede excitarse directamente mediante el compuesto quimioluminiscente activado; como alternativa, la composición puede comprender además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado.

Ejemplos particulares, no limitantes de compuestos quimioluminiscentes y fotosensibilizadores que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, se exponen en la patente de Estados Unidos N° 5.340.716 (Ullman, *et al.*).

15 Los sensibilizadores utilizados de acuerdo con la presente invención pueden ser capaces de unirse indirectamente al analito diana mediante una asociación con estreptavidina. De esta manera, la biotina se asocia con un primer socio de unión específico de analito, y la unión de estreptavidina y biotina, en combinación con la unión del primer socio de unión específico de analito al analito diana, da como resultado la asociación indirecta del sensibilizador al analito diana. En un ejemplo no limitante, el sensibilizador puede ser un fotosensibilizador, de modo que el sensibilizador se active mediante irradiación con luz.

20 Un inactivador de oxígeno singlete es un compuesto que elimina la energía de excitación de las especies de oxígeno singlete. Hay dos tipos de inactivadores de oxígeno singlete - inactivadores físicos e inactivadores químicos. Los inactivadores físicos provocan la eliminación de la energía de excitación de  $^1\text{O}_2$  sin ningún cambio químico. La eliminación de esta energía devolverá la molécula de oxígeno a su estado fundamental de energía, lo que provocará la reaparición del dióxígeno. La energía se convierte en calor, pero la cantidad es tan pequeña que, en la mayoría de las circunstancias, no se observará ningún cambio detectable de temperatura. En la inactivación química, se produce una reacción química real (tal como, pero sin limitarse a, una reacción "eno", una adición de tipo Diels-Alder, una adición a un doble enlace activado, transferencia de electrones, etc.).

30 En las composiciones/kits/métodos reivindicados se puede utilizar cualquier inactivador de oxígeno singlete conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento. El inactivador de oxígeno singlete puede poseer cualquier estructura, forma y grupos reactivos que permitan que el inactivador de oxígeno singlete funcione de acuerdo con el o los conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados; además, los inactivadores de oxígeno singlete utilizados de acuerdo con la presente invención pueden inactivar mediante un mecanismo químico y/o físico. Los ejemplos no limitantes de inactivadores de oxígeno singlete incluyen azidas; aminas impedidas, tales como, pero sin limitarse a, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO); carotenoides, tales como, pero sin limitarse a,  $\beta$ -caroteno y licopeno; los aminoácidos cisteína, histidina, metionina, triptófano y tirosina, así como péptidos/proteínas que los contienen; guanina/guanosina, así como secuencias de nucleótidos que las contienen; ácidos grasos/lípidos insaturados, tales como, pero sin limitarse a, ácido graso poliinsaturado (PUFA), colesterol, ácido linoleico y linoleato de metilo; 2,2,6,6-tetrametil-4-piperadona (TMP); hematorporfinas; Rosa de Bengala; vitamina B6; tioredoxina; ascorbato; glutatión; NADH; NADPH; y combinaciones y derivados de los mismos. La tabla 1 enumera inactivadores de oxígeno singlete ejemplares.

45 La composición que comprende el inactivador de oxígeno singlete se puede proporcionar en forma de una composición de alto peso molecular. El propio inactivador de oxígeno singlete puede poseer un alto peso molecular; como alternativa, un inactivador de oxígeno singlete que posee un peso molecular más pequeño se puede combinar con otra u otras moléculas y/o partículas para proporcionar la composición de alto peso molecular. El uso de una composición de alto peso molecular evita la interacción del inactivador de oxígeno singlete con el complejo en sándwich y, por tanto, evita la inactivación de la señal tanto específica como no específica; es decir, el uso de una composición de alto peso molecular evita que la interacción sensibilizador específico/compuesto quimioluminiscente sea inactivada por impedimento estérico. Los ejemplos no limitantes de moléculas/partículas que pueden combinarse con un inactivador de oxígeno singlete para proporcionar la composición de alto peso molecular incluyen homopolipéptidos que contienen metionina, histidina o cisteína; heteropolipéptidos que contienen metionina, histidina y cisteína; proteínas de origen natural que tienen un alto contenido de metionina, histidina y/o cisteína; un homopolímero o heteropolímero que contiene guanidina; partículas solubles en gas (por ejemplo, TEFLON®, DuPont, Wilmington, DE) y liposomas que contienen cualquiera de las formas monoméricas de las moléculas mencionadas en la tabla 1 (a continuación) y formas poliméricas de  $\beta$ -caroteno y licopeno; y combinaciones y derivados de los mismos.

55 Cuando se utiliza una composición de alto peso molecular que contiene un inactivador de oxígeno singlete, dicha composición se puede proporcionar con un peso molecular de al menos 100 Da. Dicha composición se puede proporcionar con un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 10.000.000 Da; ejemplos particulares no limitantes de intervalos de peso molecular para la composición incluyen un intervalo de

aproximadamente 200 Da a aproximadamente 5.000.000 Da; un intervalo de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 2.000.000 Da; un intervalo de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 1.000.000 Da; un intervalo de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 500.000 Da.

TABLA 1. Inactivadores de oxígeno singlete		
Inactivador	Tipo	$k/M^{-1}s^{-1}$
Azida, $N_3^-$	Físico	$2 \times 10^9$ (agua) $5,8 \times 10^8$ (agua) $5,1 \times 10^8$ ( $D_2O$ )
1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO)	Físico	$1,2 \times 10^7$ (agua)
$\beta$ -caroteno	Físico	$1,4 \times 10^{10}$ (solución) $2 \times 10^7$ (liposomas)
Licopeno	Físico	$3,1 \times 10^{10}$
Cisteína	Químico	$\sim 10^7$
Histidina	Químico + físico	$5 \times 10^7$ $\sim 75$ % de inactivación química
PUFA	Químico	$\sim 2 \times 10^5$
Ascorbato	Químico	$3,2 \times 10^8$
Metionina	Químico	$2 \times 10^7$
Guanina	Químico	$\sim 10^8$

- 5 La composición que contiene el inactivador de oxígeno singlete puede ser capaz de unirse directa o indirectamente al sensibilizador. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la composición puede biotinilarse de modo que se pueda unir al sensibilizador que tenga estreptavidina asociada al mismo.

10 Los reactivos de las composiciones/kits/métodos pueden proporcionarse en cualquier forma que les permita funcionar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los reactivos pueden disponerse en forma de reactivos liofilizados en alícuotas individuales. El uso de reactivos secos en dispositivos microfluídicos se describe en detalle en la solicitud en tramitación de Estados Unidos N.º de serie 61/562.677

15 La presente invención incluye kits útiles para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito; el kit puede contener cualquier combinación de los componentes/reactivos descritos anteriormente; además, el kit puede contener además otro u otros reactivos para realizar cualquiera de los ensayos particulares descritos o contemplados de otro modo en el presente documento. La naturaleza de este o estos reactivos adicionales dependerá del formato de ensayo particular, y la identificación de los mismos está dentro de los conocimientos de un experto en la materia.

20 Cada uno de los componentes/reactivos puede estar en recipientes/compartimentos separados, o se pueden combinar diversos componentes/reactivos en uno o más recipientes/compartimentos, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los componentes/reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos envasados por separado para realizar un ensayo, tales como miembros de sbp adicionales, miembros de sps y reactivos auxiliares, por ejemplo. Además, el kit puede incluir un dispositivo microfluídico en el que están dispuestos los componentes/reactivos.

25 Las cantidades relativas de los diversos componentes/reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los componentes/reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben producirse durante los métodos de ensayo y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los componentes/reactivos del kit se pueden proporcionar como un polvo seco, tal como un polvo liofilizado, y el kit puede incluir además uno o más excipientes para la disolución de los reactivos secos; de esta manera, se puede obtener a partir de estos componentes una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con la presente invención. Se pueden incluir controles positivos y/o negativos con el kit. El kit puede incluir además un conjunto de instrucciones escritas que expliquen cómo usarlo. Un kit de esta naturaleza se puede usar en cualquiera de los métodos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento.

35 La presente invención se refiere, además, a un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 6 que incluye una cámara de aplicación de muestras en la que se puede aplicar una muestra y un canal de entrada en comunicación fluidica con ella que también está en comunicación fluidica con uno o más compartimentos que contienen los tres componentes descritos anteriormente en el presente documento. El dispositivo puede estar provisto de cualquier disposición de los compartimentos y distribución de los tres componentes entre ellos que permita que el dispositivo funcione de acuerdo con la presente invención; en las figuras se proporcionan ejemplos no limitantes de la estructura del dispositivo con fines ilustrativos únicamente.

Cualquiera de los compartimentos del dispositivo microfluídico puede sellarse para mantener el o los reactivos dispuestos en su interior en un entorno sustancialmente hermético hasta su uso; por ejemplo, los compartimentos que contienen el o los reactivos liofilizados pueden sellarse para evitar cualquier reconstitución no intencionada del reactivo. El canal de entrada y un compartimento, así como dos compartimentos, pueden describirse como "capaces de estar en comunicación fluidica" entre sí; esta frase indica que el o los compartimentos aún pueden estar sellados, pero los dos compartimentos pueden tener un flujo de fluido entre ellos al perforar una junta formada en su interior o entre ellos.

Los dispositivos microfluídicos de la presente invención pueden proporcionarse con cualquier otra característica deseada conocida en la técnica o contemplada de otro modo en el presente documento. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los dispositivos microfluídicos de la presente invención pueden incluir además una cámara de lectura; la cámara de lectura puede ser cualquiera de los compartimentos que contienen los reactivos descritos anteriormente en el presente documento, o la cámara de lectura puede estar en comunicación fluidica con dicho compartimento. El dispositivo microfluídico puede tener además uno o más compartimentos adicionales que contienen otras soluciones, tal como, pero sin limitarse a, soluciones de lavado, soluciones de dilución, excipientes, soluciones de interferencia, controles positivos, controles negativos, controles de calidad y similares. Este o estos compartimentos adicionales pueden estar en comunicación fluidica con uno o más de los otros compartimentos (tales como, pero sin limitarse a, el compartimento que contiene la composición de inactivador de oxígeno singlete). Por ejemplo, el dispositivo microfluídico puede incluir además uno o más compartimentos que contienen una solución de lavado, y este o estos compartimentos pueden ser capaces de estar en comunicación fluidica con cualquier otro u otros compartimentos del dispositivo. En otro ejemplo, el dispositivo microfluídico puede incluir además uno o más compartimentos que contienen un excipiente para la disolución de uno o más reactivos secos, y el o los compartimentos pueden estar en comunicación fluidica con cualquier otro u otros compartimentos del dispositivo. En un ejemplo adicional más, el dispositivo microfluídico puede incluir uno o más compartimentos que contienen una solución de dilución, y el o los compartimentos pueden estar en comunicación fluidica con cualquier otro u otros compartimentos del dispositivo.

Además, cualquiera de los kits/dispositivos microfluídicos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento puede incluir múltiples ensayos multiplexados en un solo kit/dispositivo. Cuando están presentes múltiples ensayos, ambos ensayos pueden construirse y funcionar como se describe en el presente documento. Como alternativa, un ensayo como se describe en el presente documento se puede multiplexar con cualquier otro ensayo conocido en la técnica que pueda estar contenido dentro de los kits/dispositivos microfluídicos del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Ejemplos no limitantes de otros ensayos que pueden multiplexarse con los ensayos divulgados y reivindicados en el presente documento incluyen BNP, NT-proBNP, dímero D, CKMB, Mioglobina, Mieloperoxidasa, ST2, PCT, hCG, LH, FSH, iPTH, TSH, fT<sub>4</sub>, T<sub>4</sub>, PSA, fPSA y cPSA, y combinaciones de los mismos.

Cuando hay múltiples ensayos presentes en un solo dispositivo microfluídico, se pueden conectar múltiples canales de entrada a la cámara de aplicación de muestras. En determinadas realizaciones, una parte de la muestra se puede hacer pasar desde la cámara de aplicación de muestras a los múltiples canales de entrada sin tener en cuenta el contenido de la misma. Como alternativa, pueden estar presentes una o más estructuras en la cámara de aplicación de muestras, los canales de entrada y/o la conexión entre ellos que permiten la separación de determinados componentes de la muestra completa y el suministro de dichos componentes a los diferentes ensayos. Un ejemplo no limitante de un dispositivo de distribución de muestras que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención se describe en detalle en la Solicitud Provisional No. 61/790.580, presentada el viernes, 15 de marzo de 2013, titulada "Microfluidic Distributing Device". "

La presente invención se refiere, además, a un método para detectar la presencia y/o concentración de un analito diana en una muestra (tal como, por ejemplo, sangre completa, células de sangre completa lisadas o glóbulos rojos) de acuerdo con la reivindicación 11. En una realización, el método incluye las etapas de combinar, ya sea simultáneamente o total o parcialmente secuencialmente: una muestra que se sospecha que contiene el analito diana con la composición que comprende tanto el sensibilizador como el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, y la composición que contiene un inactivador de oxígeno singlete como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se permite que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente y el sensibilizador se una al analito diana presente en la muestra, con lo que se forma un complejo en sándwich, y el sensibilizador se acerca estrechamente al compuesto quimioluminiscente. La composición que comprende el inactivador de oxígeno singlete se une posteriormente al sensibilizador que no está unido en el complejo en sándwich. A continuación, el sensibilizador se activa para generar oxígeno singlete, en el que la activación del sensibilizador presente en el complejo en sándwich provoca la activación del compuesto quimioluminiscente presente en el complejo en sándwich. A continuación, se determina la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado, y las etapas de unión, activación y determinación pueden repetirse opcionalmente el número deseado de veces. La presencia y/o concentración del analito diana se detecta analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en la que la cantidad de quimioluminiscencia es directa o inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

En otros ejemplos, la composición que comprende el inactivador de oxígeno singlete se añade a la mezcla de reacción

después de la etapa de incubación en la que se permite que se forme el complejo en sándwich (es decir, el sensibilizador, el analito diana y la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete).

5 De acuerdo con la presente invención, la muestra que se sospecha que contiene el analito diana se combina como se describió anteriormente con una composición única que incluye tanto el sensibilizador como el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. Se permite que esta composición única se una al analito diana presente en la muestra. El inactivador de oxígeno singlete se puede añadir al mismo tiempo que se combinan la muestra y la composición única, o el inactivador de oxígeno singlete se puede añadir después de que se permita que la composición única se una a cualquier analito diana presente en la muestra, con lo que el inactivador de oxígeno  
10 singlete se une a cualquier composición única no unida. Las etapas restantes del método se realizan como se describió anteriormente para las otras realizaciones.

En otros ejemplos, se proporciona un formato de ensayo competitivo. El analito diana o un análogo del mismo se une al sensibilizador o a la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, en el que cualquier analito diana presente en la muestra compite con el sensibilizador/analito unido a la composición quimioluminiscente o análogo del mismo por unirse al otro componente. En estos ejemplos, la muestra, el sensibilizador y la composición quimioluminiscente se combinan como se describió anteriormente y se permite que se una al analito diana o análogo del mismo unido a uno de los dos componentes o al analito diana presente en la muestra). La unión del componente que contiene el analito diana o un análogo del mismo al otro componente forma un complejo en sándwich en el que el sensibilizador se acerca estrechamente al compuesto quimioluminiscente. En  
15 cambio, la unión del analito diana presente en la muestra evita la formación de un complejo en sándwich que incluye sensibilizador y compuesto quimioluminiscente. El inactivador de oxígeno singlete se puede añadir al mismo tiempo que se combinan la muestra y dos reactivos, o se puede añadir el inactivador de oxígeno singlete después de que se permite que los reactivos se unan a cualquier analito diana presente en la muestra, con lo que el inactivador de oxígeno singlete se une a cualquier sensibilizador no unido. Las etapas restantes del método se llevan a cabo como se describe en los ejemplos anteriores, con la excepción de que la cantidad de quimioluminiscencia es inversamente proporcional a la cantidad de analito diana presente en la muestra.  
20  
25

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

30 Como se ha mencionado anteriormente, los diversos componentes del método se proporcionan en combinación (ya sea de forma simultánea o secuencial). Cuando los diversos componentes del método se añaden secuencialmente, el orden de adición de los componentes se puede variar; un experto en la materia puede determinar el orden particular deseado de adición de los diferentes componentes al ensayo. El orden más simple de adición, por supuesto, es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar la señal producida a partir de ellos. Como alternativa, cada uno de los componentes, o grupos de componentes, puede combinarse secuencialmente. En determinadas realizaciones, puede estar involucrada una etapa de incubación posterior a cada adición como se analizó anteriormente.  
35

Los métodos de la presente invención pueden proporcionar un ensayo heterogéneo; es decir, determinadas realizaciones del método pueden incluir además una o más etapas de lavado empleadas después de una o más etapas de incubación. Cuando los reactivos se añaden al ensayo en un formato secuencial, el método puede incluir múltiples etapas de lavado (es decir, después de cada adición de reactivo e incubación con la reacción). Las etapas de lavado funcionan para reducir la señal de fondo y potencialmente aumentar la sensibilidad analítica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, una realización del método puede incluir además la etapa de eliminar sustancialmente por lavado la muestra no unida o no unida específicamente, el sensibilizador, la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y la composición que comprende el inactivador de oxígeno singlete de la cámara de lectura, antes de la activación del sensibilizador.  
40  
45

Con referencia, ahora, a los dibujos, la figura 1 representa una realización de un dispositivo microfluídico construido de acuerdo con la presente invención. El dispositivo microfluídico se indica con el número de referencia general 10 e incluye una carcasa 12 que incluye una cámara 14 de aplicación de muestras, un canal de entrada 16 y un primer compartimento 18. Una muestra (tal como, pero sin limitarse a, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 14 de aplicación de muestras, que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el canal de entrada 16. El canal de entrada 16 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el primer compartimento 18. El primer compartimento 18 contiene una cantidad predeterminada de sensibilizador 20, una cantidad predeterminada de una composición 22 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, y una cantidad predeterminada de una composición 24 (tal como, pero sin limitarse a, una composición de alto peso molecular) que incluye un inactivador de oxígeno singlete. El primer compartimento 18 puede definirse además como una cámara de lectura. Aunque el sensibilizador 20 y la composición 22 que incluye el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete se representan en la figura 1 como dos componentes separados, se entenderá que puede estar presente una única composición en el primer compartimento 18 que contiene tanto el sensibilizador 20 como el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete 22. Además, cuando el dispositivo microfluídico 10 se  
50  
55

utiliza en un formato de ensayo competitivo, se entenderá que el analito diana o un análogo del mismo puede unirse a uno del sensibilizador 20 y al compuesto quimioluminiscente 22 activable por oxígeno singlete.

5 El canal de entrada 16 puede simplemente transferir una parte de la muestra al primer compartimento 18, o el canal de entrada 16 puede contener una o más estructuras que permitan la separación de determinados componentes de la muestra completa (es decir, filtros de separación que posibilitan la separación de plasma o glóbulos rojos de una muestra de sangre completa aplicada a la cámara 14 de aplicación de muestras) y/o detección de degradación (tal como, pero sin limitarse a, hemólisis) en la muestra.

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

20 La figura 3 contiene otro ejemplo de un dispositivo microfluídico que está provisto de compartimentos adicionales que contienen otros reactivos/soluciones. Cuando los reactivos dispuestos en el o los compartimentos (es decir, el sensibilizador, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y/o la composición de fase sólida-socio de unión) están en forma de reactivo o reactivos secos, la muestra/plasma se puede utilizar para reconstitución de los mismos; como alternativa, el dispositivo microfluídico puede estar provisto de uno o más compartimentos que contienen excipientes que pueden estar en (o pueden ser capaces de estar en) comunicación fluidica con uno o más de los compartimentos que contienen dichos reactivos. En la figura 3, se muestra un dispositivo microfluídico 10b que es similar a los dispositivos microfluídicos 10 y 10a de las figuras 1-2, excepto que el dispositivo microfluídico 10b incluye además un tercer compartimento 32 que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el canal de entrada 16b y/o el primer compartimento 18b y contiene una cantidad predeterminada de excipiente 34 para la reconstitución de al menos uno de los reactivos 20b, 22b y 24b. Debe entenderse que el dispositivo microfluídico 10b se ilustra con el segundo y tercer compartimentos 26b y 32 sólo con fines de ejemplo. Cualquiera de los dispositivos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento puede proporcionarse con el compartimento que contiene la solución de lavado solo o el compartimento que contiene el excipiente solo. Como alternativa, cualquiera de los dispositivos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento puede estar provisto de uno o más compartimentos que contienen solución de lavado en combinación con uno o más compartimentos que contienen excipiente.

40 Cualquiera de los compartimentos de cualquiera de los dispositivos microfluídicos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento puede sellarse para mantener el o los reactivos dispuestos en el mismo en un entorno sustancialmente hermético al aire y/o sustancialmente hermético a la luz hasta su uso; por ejemplo, los compartimentos que contienen el o los reactivos liofilizados pueden sellarse para evitar cualquier reconstitución no intencionada del reactivo y/o exposición de cualquiera de los reactivos a la luz. El canal de entrada y un primer compartimento, así como dos compartimentos, pueden describirse como "capaces de comunicación fluidica" entre sí; esta frase indica que el o los compartimentos aún pueden estar sellados, pero pueden tener flujo de fluido entre ellos al perforar una junta formada en su interior.

45 Además, debe entenderse que cualquiera de los dispositivos microfluídicos descritos o contemplados de otro modo en el presente documento puede además estar provisto de cámaras adicionales y/u otros circuitos fluidicos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cualquiera de los dispositivos microfluídicos puede contener adicionalmente una o más cámaras de mezcla y/o uno o más circuitos fluidicos que estén dispuestos entre dos cámaras de reactivo.

50 La figura 4 representa otra realización de un dispositivo microfluídico construido de acuerdo con la presente invención. El dispositivo microfluídico se indica con el número de referencia general 50 y es similar a los dispositivos microfluídicos 10, 10a y 10b de las figuras 1-3, excepto que el dispositivo microfluídico 50 contiene dos compartimentos.

55 El dispositivo microfluídico 50 incluye una carcasa 52 que incluye una cámara 53 de aplicación de muestras, un canal de entrada 54, un primer compartimento 56, un segundo compartimento 58 y un compartimento 60 de residuos. Una muestra (tal como, pero sin limitarse a, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 53 de aplicación de muestras, que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el canal de entrada 54. El canal de entrada 54 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el primer compartimento 56. En ejemplos que no forman parte de la presente invención, el primer compartimento 56 contiene una cantidad predeterminada de una composición 62 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. El segundo compartimento 58 está

- en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el primer compartimento 56; el segundo compartimento 58 contiene una cantidad predeterminada de una composición 64 que incluye un inactivador de oxígeno singlete y una cantidad predeterminada de sensibilizador 66. El segundo compartimento 58 puede definirse además como una cámara de lectura y está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el compartimento 60 de residuos.
- 5 Además, cuando el dispositivo microfluídico 50 se utiliza en un formato de ensayo competitivo, se entenderá que el analito diana o un análogo del mismo puede unirse a uno del sensibilizador 66 y al compuesto quimioluminiscente 62 activable por oxígeno singlete.
- El orden de distribución de los reactivos 62, 64 y 66 en los compartimentos 56 y 58 es sólo a modo de ejemplo y no debe interpretarse como limitante. Los reactivos 62, 64 y 66 pueden distribuirse en los compartimentos 56 y 58 en cualquier orden deseado. De acuerdo con la presente invención, el sensibilizador 66 se puede disponer en el primer compartimento 56 junto con la composición 62. También de esta manera, puede disponerse una única composición en el primer compartimento 56 que contiene tanto el sensibilizador 66 como la composición 62. De este modo, otras distribuciones de los reactivos 62, 64 y 66 en los compartimentos 56 y 58, así como la combinación de los reactivos 62 y 66 en un solo reactivo, también están dentro del alcance de la presente invención.
- 10
- 15 Además, el dispositivo microfluídico 50 puede estar provisto adicionalmente de uno o más compartimentos adicionales que contienen una o más soluciones de lavado y/o uno o más excipientes (como se describió anteriormente con respecto a las figuras 2-3). Cuando se proporcionan uno o más compartimentos adicionales, los compartimentos pueden estar en (o pueden ser capaces de estar en) comunicación fluidica con el canal de entrada 54, el primer compartimento 56 y/o el segundo compartimento 58.
- 20 La figura 5 representa otro ejemplo de un dispositivo microfluídico que no forma parte de la presente invención. El dispositivo microfluídico se indica con el número de referencia general 150 y es similar a los dispositivos microfluídicos 10, 10a, 10b y 50 de las figuras 1-4, excepto que el dispositivo microfluídico 150 contiene tres compartimentos en los que están dispuestos los tres reactivos (es decir, el sensibilizador, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y/o el inactivador de oxígeno singlete).
- 25 El dispositivo microfluídico 150 incluye una carcasa 152 que incluye una cámara 153 de aplicación de muestras, un canal de entrada 154, un primer compartimento 156, un segundo compartimento 158, un tercer compartimento 160 y un compartimento 162 de residuos. Una muestra (tal como, pero sin limitarse a, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 153 de aplicación de muestras, que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el canal de entrada 154. El canal de entrada 154 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el primer compartimento 156. El primer compartimento 156 contiene una cantidad predeterminada de una composición 164 que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. El segundo compartimento 158 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el primer compartimento 156; el segundo compartimento 158 contiene una cantidad predeterminada de sensibilizador 166. El tercer compartimento 160 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el segundo compartimento 158; el tercer compartimento 160 contiene una cantidad predeterminada de una composición 168 que incluye un inactivador de oxígeno singlete. El tercer compartimento 160 puede definirse además como una cámara de lectura y está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el compartimento 162 de residuos. Además, cuando el dispositivo microfluídico 150 se utiliza en un formato de ensayo competitivo, se entenderá que el analito diana o un análogo del mismo puede unirse a uno del sensibilizador 166 y la composición 164.
- 30
- 35 El orden de distribución de los reactivos 164, 166 y 168 en los compartimentos 156, 158 y 160 es sólo a modo de ejemplo y no debe interpretarse como limitante. Los reactivos 164, 166 y 168 pueden distribuirse en los compartimentos 156, 158 y 160 en cualquier orden deseado.
- 40 El dispositivo microfluídico 150 también se ilustra como que contiene un cuarto compartimento 170 que contiene una cantidad predeterminada de solución de lavado 172. El cuarto compartimento 170 se ilustra como estando en (o capaz de estar en) comunicación fluidica con el canal de entrada 154 y/o el primer compartimento 156; sin embargo, debe entenderse que el cuarto compartimento 170 puede estar en (o puede ser capaz de estar en) comunicación fluidica con cualquiera de los compartimentos 156, 158 y/o 160. La presencia de la solución de lavado 172 es sólo a modo de ejemplo; debe entenderse que la solución presente en el cuarto compartimento puede ser un excipiente, o el dispositivo microfluídico puede contener un quinto compartimento que contiene un excipiente, como se describió en detalle anteriormente en el presente documento. Además, la presencia del cuarto compartimento 170 en el dispositivo microfluídico 150 es sólo a modo de ejemplo, y debe entenderse que el dispositivo microfluídico 150 puede producirse sin dicho compartimento si se desea.
- 45
- 50 Como se indicó anteriormente en el presente documento, cualquiera de las estructuras de ensayo descritas anteriormente en el presente documento se puede multiplexar con uno o más ensayos adicionales en un único dispositivo microfluídico. La figura 6 representa otra realización de un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico se indica con el número de referencia general 200 y es similar a los dispositivos microfluídicos 10, 10a, 10b, 50 y 150 de las figuras 1-5, excepto que el dispositivo microfluídico 200 contiene múltiples compartimentos que proporcionan un formato de ensayo multiplexado. El dispositivo microfluídico 200 incluye una carcasa 202 que incluye
- 55

una cámara 204 de aplicación de muestras, un primer canal de entrada 206, un segundo canal de entrada 208, un primer compartimento 210 y un segundo compartimento 212. Una muestra (tal como, pero sin limitarse a, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 204 de aplicación de muestras, que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con los canales de entrada 206 y 208. El primer canal de entrada 206 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el primer compartimento 210, El primer canal de entrada 206 y el primer compartimento 210 representan la estructura de ensayo descrita en detalle anteriormente en el presente documento (es decir, en la que el primer compartimento 210 contiene una composición 214 que contiene un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete, una composición 216 que contiene un inactivador de oxígeno singlete y un sensibilizador 218, en la que el analito diana o un análogo del mismo puede unirse a la composición 214 o al sensibilizador 218 si el dispositivo microfluídico 200 se usa en un formato de ensayo competitivo). Aunque esta estructura de ensayo representada es similar a la representada en la figura 1, debe entenderse que cualquiera de las otras estructuras de ensayo descritas en el presente documento anteriormente o contempladas de otro modo en el presente documento puede utilizarse en el dispositivo microfluídico de ensayo multiplexado. Además, el dispositivo microfluídico 200 está provisto del segundo canal de entrada 208 que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluidica con el segundo compartimento 212. El segundo compartimento 212 se proporciona simplemente para ilustrar la presencia de una segunda estructura de ensayo; debe entenderse que pueden estar presentes múltiples compartimentos según sea necesario para proporcionar la estructura requerida asociada con el segundo ensayo. Además, también debe entenderse que el segundo compartimento 212 puede estar provisto de reactivos similares a los presentes en el primer compartimento 210, de modo que múltiples ensayos que detectan diferentes analitos mediante el mismo mecanismo de ensayo estén presentes en el mismo dispositivo microfluídico. Como alternativa, el segundo compartimento 212 puede representar un formato de ensayo completamente diferente; el único requisito es que este segundo formato de ensayo pueda multiplexarse con uno de los ensayos descritos en el presente documento.

De este modo, de acuerdo con la presente invención, se han proporcionado composiciones que comprenden un sistema quimioluminiscente, así como kits y dispositivos microfluídicos que las contienen y métodos de uso de los mismos, que satisfacen completamente los objetivos y ventajas establecidos anteriormente en el presente documento. Aunque la presente invención se ha descrito junto con los dibujos específicos, la parte experimental, los resultados y el lenguaje expuestos anteriormente en el presente documento, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Por consiguiente, se pretende aceptar todas esas alternativas, modificaciones y variaciones que están dentro del alcance de la presente invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un kit que contiene un sistema de detección quimioluminiscente, comprendiendo el kit:
- (a) una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente a un analito diana;
- 5 (b) un sensibilizador capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado; y
- (c) una composición que comprende un inactivador de oxígeno singlete capaz de unirse específicamente a un sensibilizador no unido, en el que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y el sensibilizador están dispuestos juntos en una única composición.
- 10 2. El kit de la reivindicación 1, en el que uno de:
- (i) la composición de (a) tiene un analito diana o un análogo del mismo unido a la misma, y en el que (b) es capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana o análogo del mismo unido a (a) o al analito diana presente en una muestra; y
- 15 (ii) (b) tiene un analito diana o un análogo del mismo unido al mismo, y en el que la composición de (a) es capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana o análogo del mismo unido a (b) o al analito diana presente en una muestra.
3. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el sensibilizador o la composición que lo contiene es capaz de unirse indirectamente al analito diana y tiene estreptavidina asociada con el mismo, y en el que la biotina está asociada con un primer socio de unión específico de analito, con lo que la unión de estreptavidina y biotina y la unión del primer socio de unión específico de analito al analito diana da como resultado la asociación indirecta del sensibilizador al analito diana.
- 20 4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un segundo socio de unión específico de analito asociado con el mismo, que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente al analito diana.
- 25 5. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es una sustancia que experimenta una reacción química con oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión de luz simultánea o posterior.
6. Un dispositivo microfluídico, que comprende:
- (a) un canal de entrada a través del cual se puede aplicar una muestra;
- 30 (b) al menos un compartimiento capaz de estar en comunicación fluídica con el canal de entrada, conteniendo el al menos un compartimiento:
- (i) una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente a un analito diana;
- 35 (ii) un sensibilizador capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado; y
- (iii) una composición que comprende un inactivador de oxígeno singlete capaz de unirse específicamente al sensibilizador no unido, en el que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y el sensibilizador están dispuestos juntos en una única composición.
- 40 7. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 6, en el que uno de:
- (1) la composición de (i) tiene un analito diana o un análogo del mismo unido a la misma, y en la que (ii) es capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana o análogo del mismo unido a (i) o al analito diana presente en una muestra; y
- 45 (2) (ii) tiene un analito diana o un análogo del mismo unido al mismo, y en el que la composición de (i) es capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana o análogo del mismo unido a (ii) o al analito diana presente en una muestra.
8. El dispositivo microfluídico de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un segundo socio de unión específico de analito asociado con el mismo, que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente al analito diana.
- 50 9. El dispositivo microfluídico de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, definido además como que comprende

al menos dos compartimentos, en el que un primer compartimento es capaz de estar en comunicación fluidica con el canal de entrada y contiene (i), y en el que un segundo compartimento es capaz de estar en comunicación fluidica con al menos uno del canal de entrada y el primer compartimento y contiene (iii), y en el que (ii) está dispuesto en el primer compartimento o segundo compartimento.

5 10. El dispositivo microfluídico de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, definido además como que comprende al menos tres compartimentos, en el que un primer compartimento es capaz de estar en comunicación fluidica con el canal de entrada y contiene (i), un segundo compartimento es capaz de estar en comunicación fluidica con al menos uno del canal de entrada y el primer compartimento y contiene (ii), y un tercer compartimento es capaz de estar en comunicación fluidica con al menos uno del canal de entrada, el primer compartimento y el segundo compartimento,  
10 y en el que el tercer compartimento contiene (iii).

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

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

15 (1) una muestra sospechosa de contener el analito diana;  
(2) una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana; y  
(3) un sensibilizador capaz de unirse directa o indirectamente al analito diana y capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado, en el que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y el sensibilizador están dispuestos juntos en una única composición;

20 (b) permitir la unión de (2) y (3) al analito diana presente en la muestra, con lo que se forma un complejo en sándwich y el sensibilizador se acerca estrechamente al compuesto quimioluminiscente;

(c) añadir una composición que comprende un inactivador de oxígeno singlete capaz de unirse específicamente al sensibilizador no unido, en el que la composición se une al sensibilizador que no forma parte del complejo en sándwich;

25 (d) activar el sensibilizador para generar oxígeno singlete, en el que la activación del sensibilizador presente en el complejo en sándwich provoca la activación del compuesto quimioluminiscente presente en el complejo en sándwich;

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

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

30 (g) detectar la presencia y/o concentración del analito diana analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en el que la cantidad de quimioluminiscencia es directa o inversamente proporcional a la cantidad de analito diana en la muestra.

35 12. El método de la reivindicación 11, en el que el sensibilizador es capaz de unirse indirectamente al analito diana y tiene estreptavidina asociada con el mismo, y en el que la biotina está asociada con un primer socio de unión específico de analito, con lo que la unión de estreptavidina y biotina y la unión del primer socio de unión específico de analito al analito diana da como resultado la asociación indirecta del sensibilizador al analito diana.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que la composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete tiene un segundo socio de unión específico de analito asociado con el mismo, que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente al analito diana.

40 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es una sustancia que experimenta una reacción química con oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión de luz simultánea o posterior.

45 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, que comprende, además, la etapa de eliminar sustancialmente por lavado la muestra no unida o no unida específicamente, el sensibilizador, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y/o el inactivador de oxígeno singlete antes de la activación del sensibilizador.

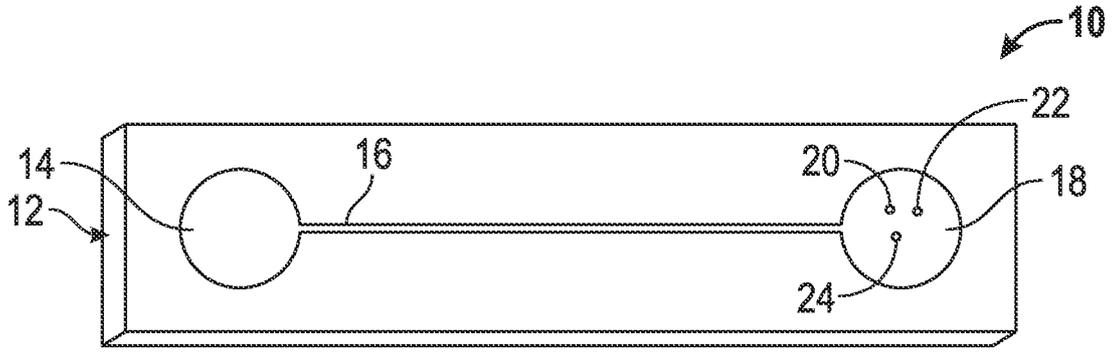


FIG. 1

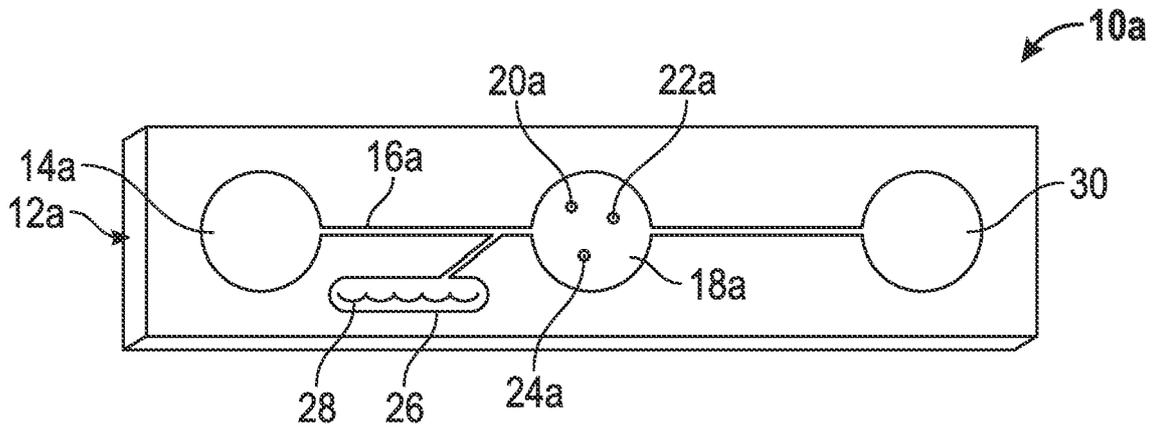


FIG. 2

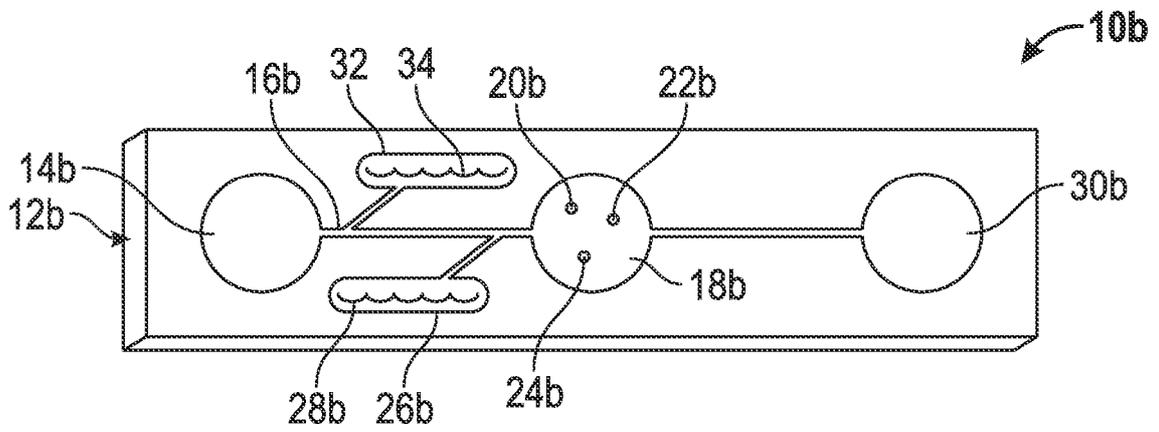


FIG. 3

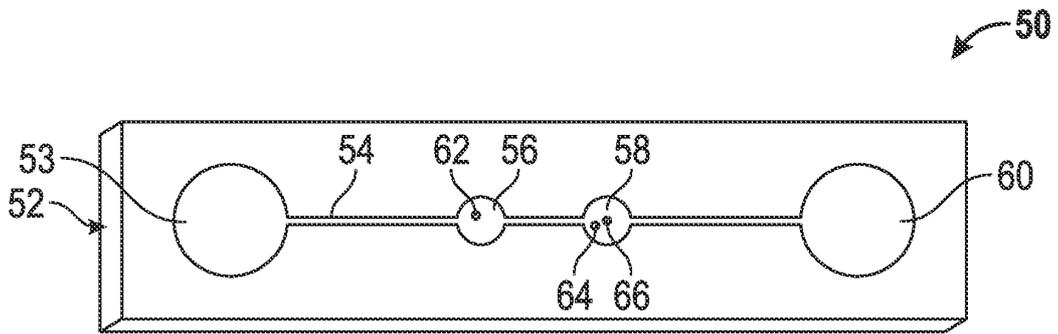


FIG. 4

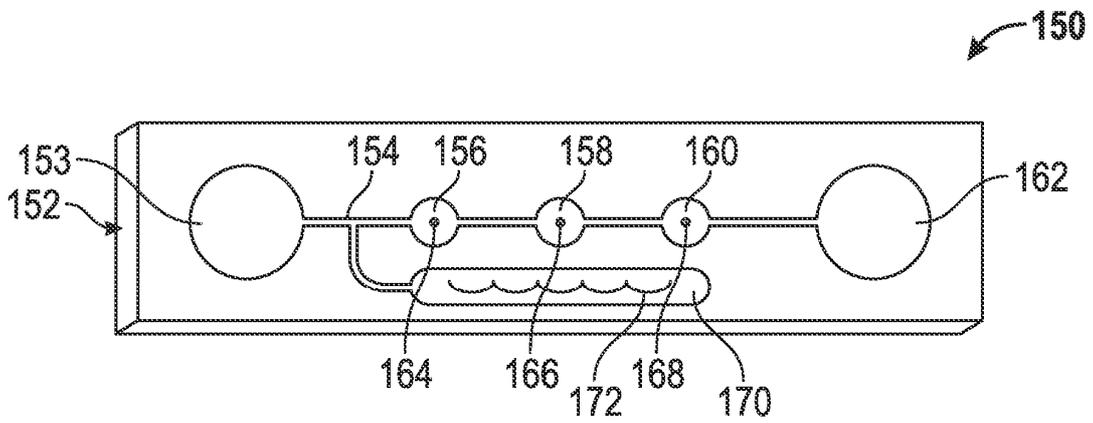


FIG. 5

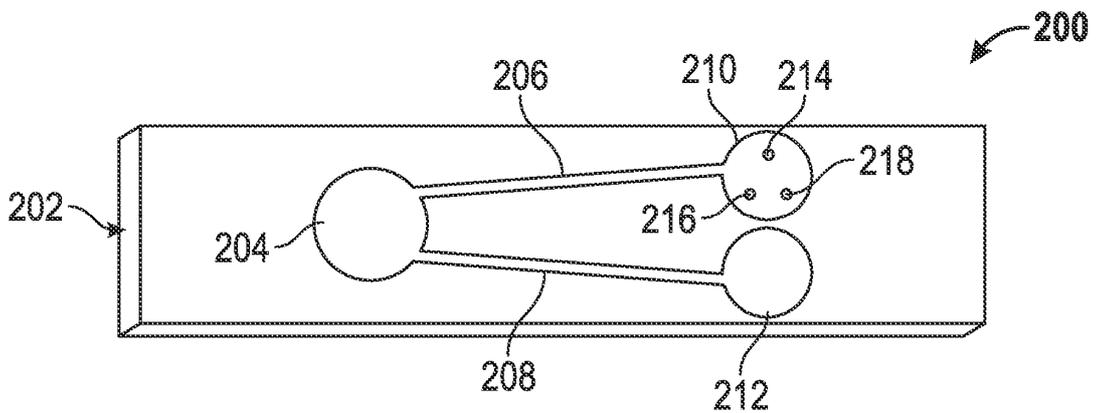


FIG. 6