

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 429**

51 Int. Cl.:

C08G 77/46 (2006.01)

C08J 3/03 (2006.01)

C08L 83/12 (2006.01)

C09D 183/12 (2006.01)

C09D 183/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09724309 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2254894**

54 Título: **Solución acuosa para la aplicación a un canal y procedimiento de aplicación**

30 Prioridad:

26.03.2008 US 39720

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

19.12.2013

73 Titular/es:

**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
(100.0%)
1-7, Nihonbashi-honcho 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-0023, JP**

72 Inventor/es:

**CHANG, WILLIAM, W.P. y
SHIH, YIHSING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 429 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

Solución acuosa para la aplicación a un canal y procedimiento de aplicación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de aplicación de una solución acuosa que contiene un tampón y un tensioactivo de organosilicona a un canal que tiene una superficie hidrófoba en dispositivos, en particular dispositivos de microfluidos, para prevenir o minimizar, entre otros, la formación de burbujas de aire sobre las superficies hidrófobas.

Antecedentes de la invención

10 Un tensioactivo es un compuesto anfílico que tiene tanto un grupo hidrófilo, denominado cabeza, como un grupo hidrófobo, denominado cola. La combinación de grupos hidrófilos e hidrófobos de los tensioactivos permite que este compuesto sea soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos. Los polisiloxanos con grupos laterales colgantes poliéter (organosiliconas) son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, de las patentes de Estados Unidos 5.696.192; 5.159.096 y 6.372.874). En parte debido a su anfifilicidad, los tensioactivos de organosilicona son conocidos por ser buenos agentes humectantes, lo que significa que mejoran la difusión del medio acuoso sobre superficies hidrófobas cuando se añaden al medio acuoso.

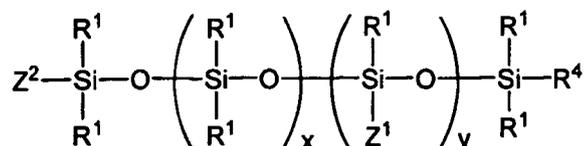
15 Por otra parte, no se conoce la utilización de tensioactivos de organosilicona como agentes humectantes en dispositivos clínicos y analíticos para inmunoensayos, ensayos enzimáticos o inmunoensayos enzimáticos, en particular dispositivos microfluídicos para dichos usos.

Sumario de la invención

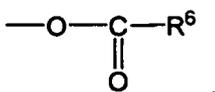
20 Los inventores han descubierto que una mezcla de una cierta clase de tensioactivos de organosilicona introducidos en canales hidrófobos de un dispositivo promueve la humectabilidad de la superficie de los canales e previene o minimiza la formación de burbujas sobre la superficie de los canales, en particular en canales de microfluidos.

25 Se proporciona un procedimiento de aplicación de una solución acuosa en un canal microfluídico. La solución acuosa incluye un tampón y un tensioactivo de organosilicona y también puede incluir un agente de bloqueo para prevenir una interacción entre la superficie del canal y un componente de la solución acuosa.

La estructura de un tensioactivo de organosilicona en la mezcla puede ser:

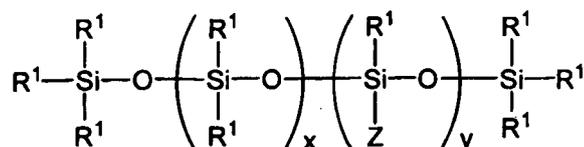


30 en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y Z¹ es un grupo hidroxialquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un grupo poliéter, Z² es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o un grupo poliéter, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o



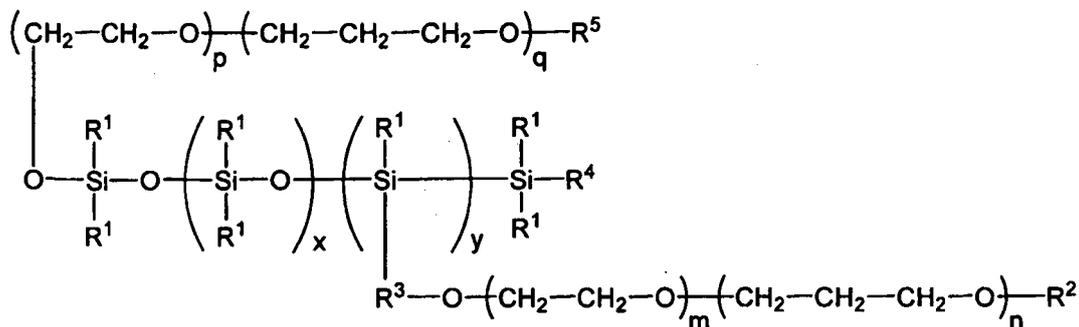
en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y es un número entero igual o superior a 1, y x es un número entero igual o superior a cero.

35 La estructura de un tensioactivo de organosilicona en la mezcla puede ser:

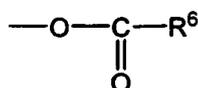


en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y Z es un grupo poliéter, y es un número entero igual o superior a 1, y x es un número entero igual o superior a cero.

A modo de ejemplo, el tensioactivo de organosilicona puede tener la fórmula:

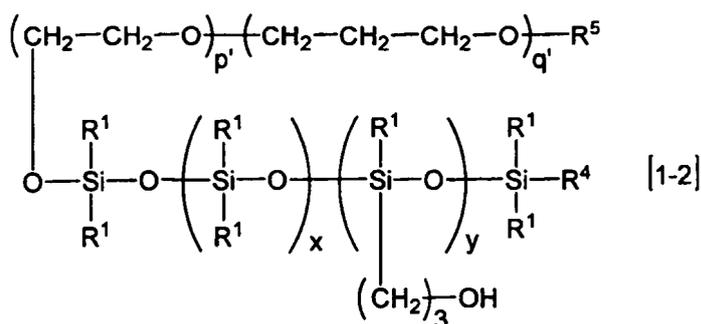
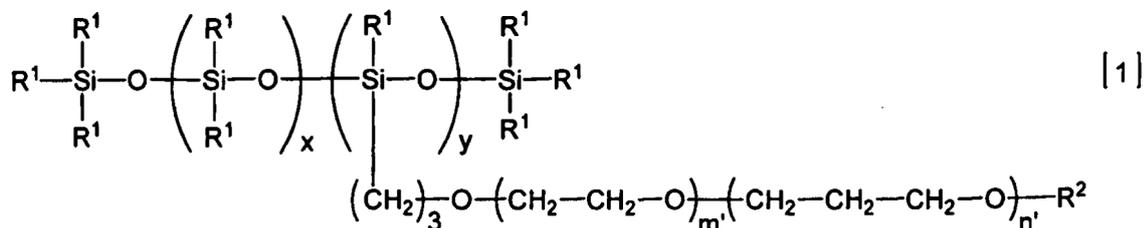


5 en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R² es un grupo alquilo, un grupo acetilo, un átomo de hidrógeno, o un grupo OH, R³ es un grupo alquilo, R⁵ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o

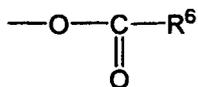


(en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH), y es un número entero igual o superior a 1, y x, m, n, p y q son independientemente un número entero igual o superior a cero.

10 Otro ejemplo de tensioactivo de organosilicona puede tener las fórmulas [1] o [1-2]:



15 en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R² es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, un grupo acetilo, un átomo de hidrógeno, o un grupo OH, R⁵ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o



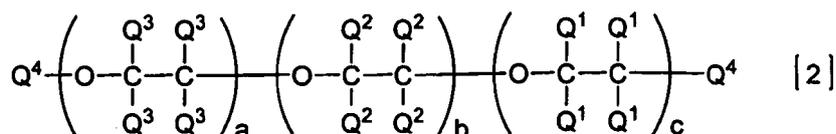
(en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH), y, m' y p' son independientemente un número entero igual o superior a 1, y x, n' y q' son independientemente un número entero

igual o superior a cero.

En un ejemplo adicional, R¹ puede ser CH₃. Además, n o n' pueden ser cero de manera que la estructura anterior contenga óxido(s) de etileno y no óxido de propileno. Además, x puede ser cero e y puede ser uno de manera que la estructura se convierta en un compuesto de trisiloxano. Por otra parte, x puede oscilar entre 0 y 130, 0 y 40, 0 y 10, 0 y 4; y puede oscilar entre 1 y 40, 1 y 30, 1 y 20, o 1 y 4; m puede oscilar entre 1 y 50, 2 y 30, 3 y 20, o 4 y 16; y n puede oscilar entre 0 y 50, 0 y 25, 0 y 10, o 0 y 4.

El agente de bloqueo para prevenir una interacción entre la superficie del canal y un componente de la solución acuosa puede ser un oligómero de poli(óxido de alquileno) y/o poli-dimetilacrilamida (p-DMA).

La estructura del agente de bloqueo – oligómero de poli(óxido de alquileno) – puede ser:



en la que cada Q¹ es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, cada Q² es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, cada Q³ es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y cada Q⁴ es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo OH, en la que a, b, y c son independientemente un número entero igual o superior a 1. Cada Q¹ puede ser independientemente un átomo de hidrógeno, y cada Q³ puede ser independientemente un átomo de hidrógeno. Por otra parte, cada Q¹ puede ser independientemente un átomo de hidrógeno, cada Q³ puede ser independientemente un átomo de hidrógeno, y tres de las Q² son un átomo de hidrógeno y una de las Q² es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Por otra parte, "a" puede oscilar entre 0 y 130 o 12 y 101; "b" puede oscilar entre 0 y 100 o 2 y 56; y "c" puede oscilar entre 0 y 130 o 12 y 101.

En otro ejemplo, el agente de bloqueo puede ser poli-dimetil acrilamida (p-DMA). Con un agente humectante se puede añadir una p-DMA de bajo a elevado peso molecular.

La cantidad del tensioactivo de organosilicona puede ser del 0,001 al 0,5% en peso en una solución acuosa.

Adicionalmente se puede suministrar un agente de bloqueo para prevenir una interacción entre la superficie del canal y un componente de la solución acuosa. Así, el tensioactivo de organosilicona se combina con un tampón y el agente de bloqueo. El agente de bloqueo puede estar contenido en la solución acuosa que contenga el tampón y el tensioactivo de organosilicona o en otra solución acuosa que no contenga tensioactivo de organosilicona. La longitud del agente de bloqueo es superior a la longitud del tensioactivo de organosilicona cuando se extienden las moléculas.

Para reducir las tensiones superficiales de la solución sobre el canal hidrófobo se proporciona un procedimiento de aplicación de una solución acuosa sobre superficies hidrófobas que tienen un canal de microfluidos, incrementando así la humectabilidad del canal de microfluidos. La solución, que contiene el tensioactivo de organosilicona, además puede contener un agente de bloqueo para incrementar el rendimiento del tensioactivo de organosilicona.

Características adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción siguiente, y en parte serán obvias con la descripción, o se pueden aprender mediante la puesta en práctica de la invención. Las características de la invención se concretarán y se conseguirán por medio de los elementos y combinaciones señaladas en particular en las reivindicaciones adjuntas.

Los dibujos acompañantes, que se incorporan y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran una o más realizaciones de la invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

40 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A y 1B muestran los perfiles de la corriente cuando se pasa una corriente través de un sistema de microfluidos. En la Figura 1A, las burbujas de aire impiden una conducción correcta de la corriente; en la Figura 1B, no se forman burbujas de aire y la corriente pasa de manera correcta.

Las Figuras 2A y 2B muestran los electroferogramas de acuerdo con una realización de la presente invención.

45 La Figura 3 muestra un microchip para su uso en un inmunoensayo microfluidico de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4A muestra un electroferograma ejemplar con un tensioactivo de organosilicona (trisiloxano) en reactivos de acuerdo con una realización de la presente invención;

50 La Figura 4B muestra un electroferograma ejemplar con pre-carga de alcohol en los canales de un dispositivo de microfluidos;

Las Figuras 5A y 5B muestran el efecto de aflamamiento sobre la forma de un pico en un ensayo a medida que se incrementa el pH de acuerdo con otra realización de la presente invención.

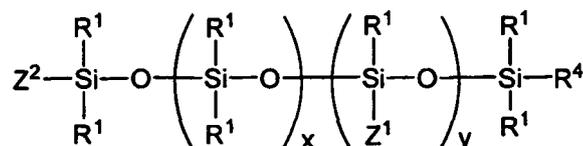
La Figura 6 muestra un electroferograma de acuerdo con una realización de la presente invención.

Descripción de las realizaciones

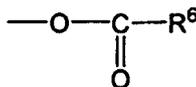
5 Los componentes de muchos dispositivos que incluyen dispositivos microfluídicos están fabricados de materiales plásticos o materiales poliméricos hidrófobos tales como polimetilmetacrilato (PMMA), polímero de ciclo-olefina (PCO), o copolímero de ciclo olefina (CCO). Aunque la utilización de plásticos ha promovido la posibilidad de intercambiar y desechar los componentes, la hidrofobicidad de los plásticos ha introducido otro problema cuando, por ejemplo, en los procedimientos de ensayo está involucrado un medio acuoso. Las superficies hidrófobas en contacto con el medio acuoso tienden a promover la formación de burbujas de aire sobre la superficie, que pueden interferir con los ensayos. Por ejemplo, cuando se rellenan reactivos acuosos en microcanales de plástico de un dispositivo de microfluidos, las burbujas de aire quedan atrapadas en los canales, lo que puede dar lugar al fracaso del ensayo. Los microcanales, que se definen por tener aproximadamente menos de 1000 μm de profundidad o aproximadamente menos de 100 μm de profundidad, se pueden pre-cargar con un alcohol, tal como alcohol isopropílico, puro o con agua antes de rellenar los canales a presión con reactivos acuosos para suprimir la formación o el atrapamiento de burbujas de aire, pero este procedimiento indefectiblemente complica las operaciones del ensayo, consume más tiempo, y añade costes. Por otra parte, la introducción de un alcohol puede contaminar los reactivos e interferir con los resultados del ensayo.

Los tensioactivos de organosilicona como agentes humectantes para difundir los reactivos acuosos se han encontrado que son eficaces a la hora de prevenir o minimizar la formación de burbujas de aire en canales tales como canales microfluídicos con superficies hidrófobas. El término "tensioactivos de organosilicona" o en su forma singular "un tensioactivo de organosilicona" se puede referir a una única especie o a una distribución de tensioactivos de organosilicona en base, por ejemplo, al peso molecular promedio en peso. Un canal, como se denomina en el presente documento, puede ser un pasaje tubular cerrado dentro de un material o una ranura o un surco sobre la superficie de un material. Los canales pueden incluir capilares o tubos estrechos. A modo de ejemplo, la profundidad del canal puede ser de 1000 μm aproximadamente o inferior o de 100 μm aproximadamente o inferior, el diámetro interno del canal puede ser de 1 a 1000 μm aproximadamente, de 1 a 200 μm aproximadamente, o de 1 a 100 μm aproximadamente, y la longitud del canal puede ser de 0,1 mm a 100 cm aproximadamente, de 0,1 mm a 20 cm aproximadamente, o de 0,1 mm a 10 cm aproximadamente. Los tensioactivos de organosilicona con un reactivo o una muestra se pueden cargar directamente en un canal sin prepararlo mediante la pre-carga con un alcohol. La combinación de tensioactivos/reactivos de organosilicona (muestra) humecta la superficie hidrófoba del canal para prevenir que las burbujas se adhieran a la superficie o para liberar las burbujas de la superficie, y las burbujas resultantes en solución son arrastradas del canal hacia pocillos de residuos, por ejemplo, mediante la aplicación de presión. En comparación con la técnica de pre-carga con un alcohol, la carga directa de la combinación de tensioactivo/reactivo de organosilicona (muestra) produce una reducción en el tiempo y los costes de ejecución de un ensayo.

La estructura de un tensioactivo de organosilicona en la mezcla puede ser:

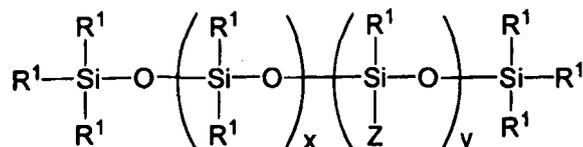


40 en la que R^1 individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y Z^1 es un grupo hidroxialquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un grupo poliéter, Z^2 es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o un grupo poliéter, R^4 es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o



45 (en la que R^6 es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH), y es un número entero igual o superior a 1, y x es un número entero igual o superior a cero.

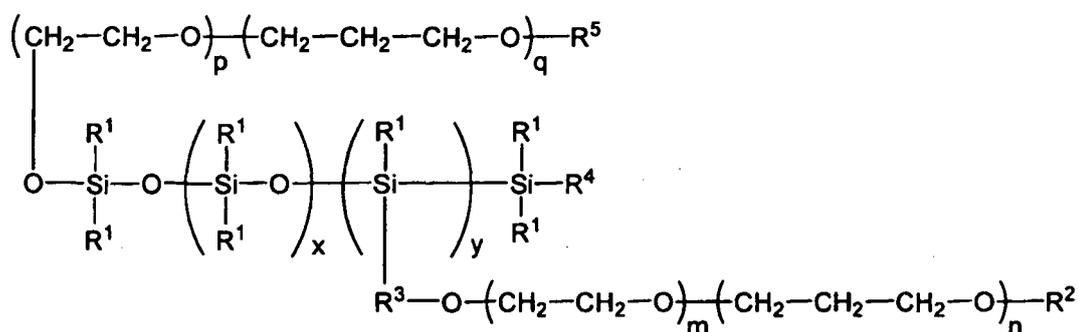
La estructura de un tensioactivo de organosilicona en la mezcla puede ser:



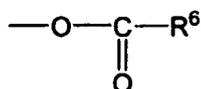
en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y Z es un grupo poliéter, y es un número entero igual o superior a 1, y x es un número entero igual o superior a cero.

- 5 El grupo poliéter representado mediante Z, Z¹ y Z² incluye una cadena de unidades de repetición, en la que la cadena de unidades de repetición incluye al menos un grupo divalente derivado de un monómero de óxido de etileno que tiene de 2 a 4 átomos de carbono tal como óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno, etc.

Un ejemplo del tensioactivo de organosilicona que se puede utilizar tiene la estructura siguiente:



- 10 en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R² es un grupo alquilo, un grupo acetilo, un átomo de hidrógeno, o un grupo OH, R³ es un grupo alquileo, R⁵ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o



- 15 (en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH), y es un número entero igual o superior a 1, y x, m, n, p y q son independientemente un número entero igual o superior a cero.

Un grupo alquileo representado mediante R³ incluye un grupo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo trimetileno, un grupo tetrametileno, un grupo etilideno, un grupo propilideno, un grupo isopropilideno, un grupo metilmetileno, un grupo metiletileno, un grupo etilmetileno, un grupo butileno, un grupo metilpropileno, un grupo etiletileno, etc.

- 20 R³ en la fórmula puede ser un grupo trimetileno.

El índice, x, es un número entero igual o superior a cero (0). Específicamente, x puede ser, en un límite inferior, 0 (cero) o superior, y en un límite superior, 130 o inferior, 40 o inferior, 10 o inferior, o 4 o inferior. X puede ser 0 (cero).

El índice, y, es un número entero igual o superior a 1. Específicamente, y puede ser, en un límite inferior, 1 o superior, y en un límite superior, 40 o inferior, 30 o inferior, 20 o inferior, o 4 o inferior. Y puede ser 1.

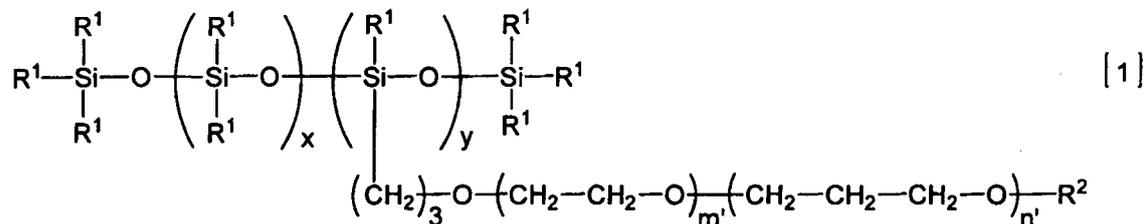
- 25 Los índices, x + y pueden ser, en un límite inferior, 1 o superior, y en un límite superior, 170 o inferior, 70 o inferior, 30 o inferior, o 8 o inferior.

Los índices, m y p, son independientemente un número entero igual o superior a cero (0). Específicamente, n puede ser, en un límite inferior, 0 o superior, 1 o superior, 2 o superior, 3 o superior, o 4 o superior, y en un límite superior, 50 o inferior, 30 o inferior, 20 o inferior, o 16 o inferior. p se puede definir de forma similar.

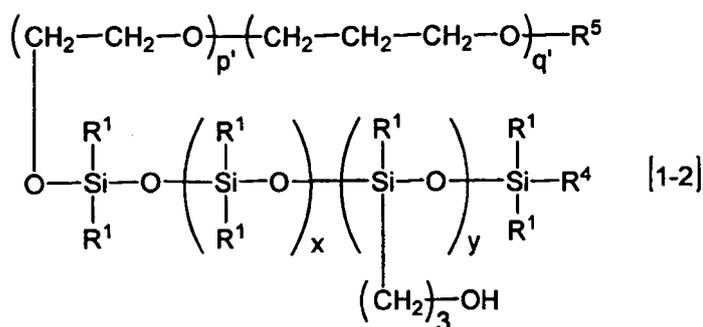
- 30 Los índices, n y q son independientemente un número entero igual o superior a cero (0). Específicamente, n puede ser, en un límite inferior, 0 (cero) o superior, y en un límite superior, 50 o inferior, 25 o inferior, 10 o inferior, o 4 o inferior. El índice, n, puede ser 0 (cero). Los índices, m + n pueden ser, en un límite inferior, 1 o superior, 2 o superior, 3 o superior, o 4 o superior, y en un límite superior, 100 o inferior, 55 o inferior, 30 o inferior, o 16 o inferior. q y p + q se pueden definir de forma similar.

Al menos m, n, p y q son un número entero igual o superior a 1.

Otro ejemplo del tensioactivo de organosilicona que se puede utilizar tiene la estructura siguiente:

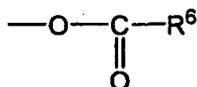


o



5

en la que R¹ individualmente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R² es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, un grupo acetilo, un átomo de hidrógeno, o un grupo OH, R⁵ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o



10

(en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH), en la que y, m' y p' son independientemente un número entero igual o superior a 1, y x, n' y q' son independientemente un número entero igual o superior a cero.

15

Un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono representados mediante R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ y Z² y un grupo alquilo de un grupo hidroxialquilo representado mediante Z y Z¹ en las fórmulas anteriores pueden ser de cadena lineal o ramificada, o pueden ser una cadena lineal e incluye un grupo que tiene de 1 a 2 átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, y un grupo terc-butilo.

R¹ puede ser un grupo metilo.

20

R² y R⁵ pueden ser un grupo metilo, un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo, o pueden ser un grupo OH.

El índice, x, es un número entero igual o superior a cero (0). Específicamente, x puede ser, en un límite inferior, 0 (cero) o superior, y en un límite superior, 130 o inferior, 40 o inferior, 10 o inferior, o 4 o inferior. X puede ser 0 (cero).

El índice, y, es un número entero igual o superior a 1. Específicamente, y puede ser, en un límite inferior, 1 o superior, y en un límite superior, 40 o inferior, 30 o inferior, 20 o inferior, o 4 o inferior. Y puede ser 1.

25

Los índices, x + y pueden ser, en un límite inferior, 1 o superior, y en un límite superior, 170 o inferior, 70 o inferior, 30 o inferior, o 8 o inferior.

Los índices, m' y p', son independientemente un número entero igual o superior a 1. Específicamente, m' puede ser, en un límite inferior, 1 o superior, 2 o superior, 3 o superior, o 4 o superior, y en un límite superior, 50 o inferior, 30 o inferior, 20 o inferior, o 16 o inferior. p' se puede definir de forma similar.

30

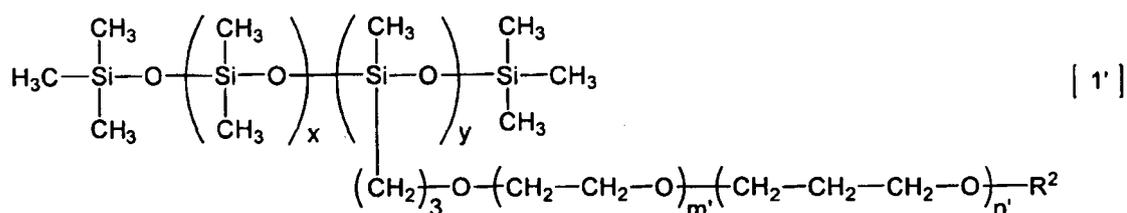
Los índices, n' y q' son independientemente un número entero igual o superior a cero (0). Específicamente, n' puede ser, en un límite inferior, 0 (cero) o superior, y en un límite superior, 50 o inferior, 25 o inferior, 10 o inferior, o 4 o inferior.

inferior. El índice, n', puede ser 0 (cero). Los índices, m' + n' pueden ser, en un límite inferior, 1 o superior, 2 o superior, 3 o superior, o 4 o superior, y en un límite superior, 100 o inferior, 55 o inferior, 30 o inferior, o 16 o inferior. q' y p' + q' se pueden definir de forma similar.

El peso molecular promedio en peso (Mw) del tensioactivo de organosilicona es de 100 a 10.000, o de 400 a 2000.

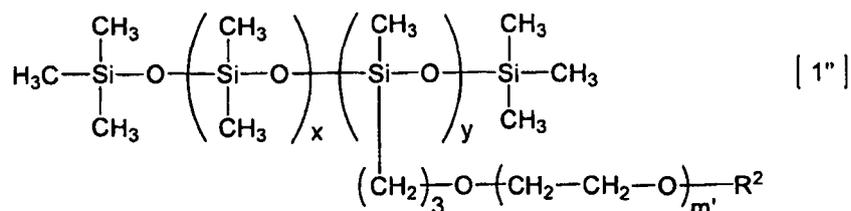
- 5 El tensioactivo de organosilicona representado mediante la fórmula [1] se puede sintetizar de acuerdo con lo desvelado en W. Noll, Chemistry and Technology of Silicones, Academic Press. Nueva York: 1968.

Por tanto, el tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1] anterior adicionalmente puede ser un tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1'] siguiente, un tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1''] siguiente o un tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1'''] siguiente:

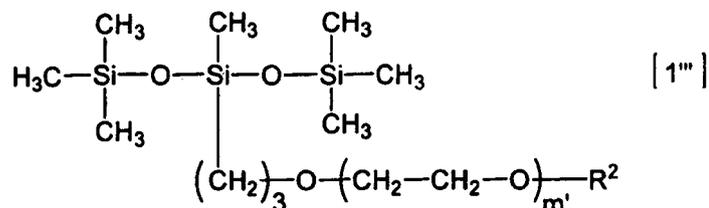


10

en la que R², x, y, m' y n' son iguales a como se ha descrito anteriormente,

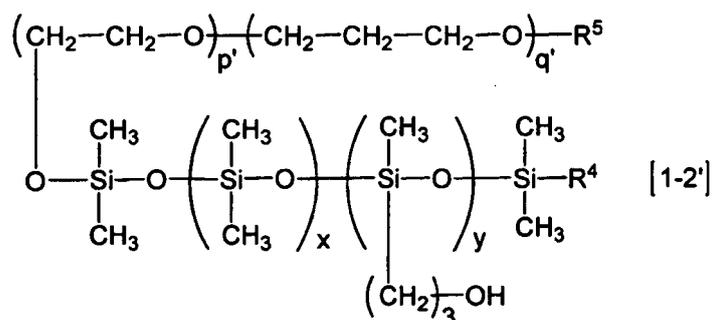


en la que R², x, y, y m' son iguales a como se ha descrito anteriormente,

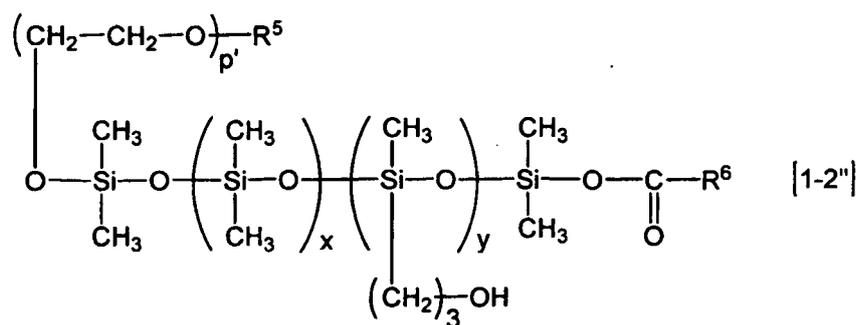


- 15 en la que R² y m' son iguales a como se ha descrito anteriormente.

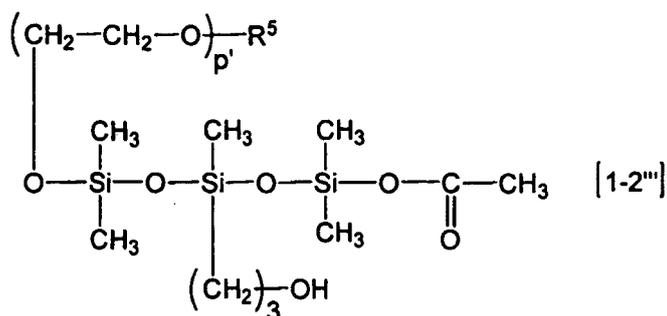
Por tanto, el tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1-2] anterior además puede ser un tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1-2'] siguiente, un tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1-2''] siguiente o un tensioactivo de organosilicona que incluye la fórmula [1-2'''] siguiente:



- 20 en la que R⁴, R⁵, x, y, p' y q' son iguales a como se ha descrito anteriormente.



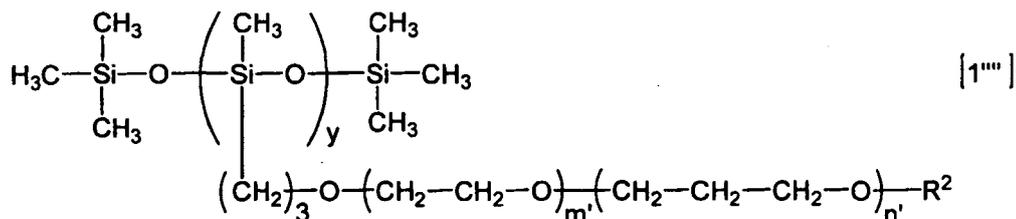
en la que R⁵, R⁶ y p' son iguales a como se ha descrito anteriormente.



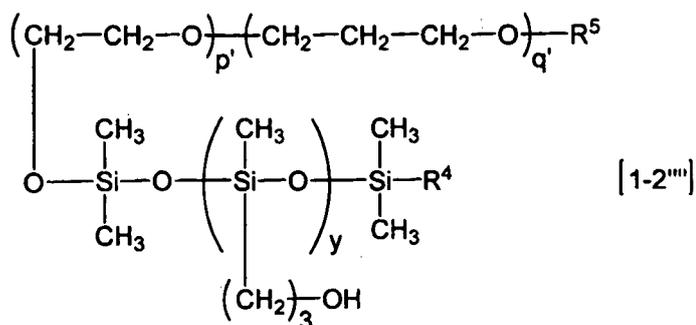
en la que R⁵ y p' son iguales a como se ha descrito anteriormente.

- 5 La cantidad de tensioactivo de organosilicona es, en un límite inferior, del 0,001% (v/v) o superior, del 0,01% (v/v) o superior, o del 0,03% (v/v) o superior en una solución acuosa, y en un límite superior, del 1,5% (v/v) o inferior, o del 1,0% (v/v) o inferior, o del 0,5% (v/v), o inferior o del 0,2% (v/v) o inferior, o del 0,1% (v/v) o inferior en una solución acuosa.

- 10 A modo de ejemplo, uno de los tensioactivos de organosilicona adecuado para su utilización en la prevención o minimización de las burbujas de aire es el tensioactivo de trisiloxano ("trisiloxano"). El trisiloxano puede tener la fórmula siguiente:



en la que R², y, m' y n' son iguales a como se ha descrito anteriormente y m' + n' = 4 a 12,



- 15 en la que R⁴, R⁵, y, p' y q' son iguales a como se ha descrito anteriormente y p' + q' = 4 a 12.

En términos de intervalos, para prevenir o minimizar la formación de burbujas de aire a los tampones y reactivos se

les puede incorporar del 1,5% al 0,001% (v/v) de un tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano. El intervalo del aditivo tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano puede ser del 0,2% al 0,01%, y se puede limitar adicionalmente entre el 0,1% y el 0,01%. El trisiloxano puede estar en forma pura o puede estar en forma de agente humectante Superwetting Agent® (SWA), que, por ejemplo, incluye más del 60,0% de metil (hidróxido de propilo etoxilado) bis (trimetilsiloxi) silano, el 15-20% de monoalil éter de óxido de polietileno, e igual o inferior al 9% de polietilenglicol, o puede estar en forma purificada tal como Dow-309 (3-(3-hidroxiopropil)-heptametiltrisiloxano, etoxilado, acetato) de Dow-Corning Corp. También se puede utilizar el tensioactivo de organosilicona producido por GE denominado Silwet® tal como Silwet 408, Silwet L-77 y el tensioactivo de organosilicona producido por Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., tal como KF-640, KF-642, y KF-643.

Las Figuras 1A y 1B ilustran respectivamente lo que ocurre en un sistema de ensayo cuando (A) no se utiliza un tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano, de manera que se forman burbujas de aire en los canales y cuando (B) se utilizan tensioactivos para prevenir o minimizar la formación de burbujas de aire. La Figura 1A es un ejemplo del fallo de la corriente provocado por una humectación incompleta de los canales. Los tampones acuosos se introdujeron directamente en microcanales hidrófobos secos de un dispositivo microfluídico sin la utilización de tensioactivos de organosilicona o la pre-humectación con un alcohol de manera que se produjeron burbujas de aire en los canales. Cuando se aplicó la corriente a través de los canales para llevar a cabo un procedimiento de ensayo, la corriente resultante osciló ampliamente debido a la discontinuidad de la corriente inducida por las burbujas de aire, dando lugar al fallo de la corriente. La Figura 1B muestra un ejemplo en el que reactivos que contenían el 0,1% (v/v) de trisiloxano se introdujeron directamente en los microcanales de un dispositivo microfluídico de manera que se previno en su mayor parte la formación de burbujas de aire, cuando no completamente. No se produjo una corriente altamente oscilante sino un paso de corriente relativamente estable, como cabría esperar con canales sin burbujas de aire. Así, para la realización de procedimientos de ensayo, por ejemplo, electroforesis capilar (CE) o isotacoforesis (ITP), que requieren un paso de corriente a través de los canales, la utilización de tensioactivos de organosilicona tales como trisiloxano en los reactivos contribuye a evitar el fallo del ensayo debido a las burbujas de aire.

El tampón se puede utilizar para electroforesis, pero no se limita a esta técnica. Otras técnicas en las que se puede utilizar el tampón incluyen, por ejemplo, ensayo de hibridación y ensayo de inmunización. El tampón puede ser, por ejemplo, tampón Tris, tampón de fosfato, tampón veronal, tampón de borato, tampón de Good, tampón SSC, tampón TBE, tampón TAE, un tampón de histidina, un tampón de imidazol. La concentración del tampón puede ser, por ejemplo, de 0,1 mM a 10 M, de 1 mM a 5 M, o de 5 mM a 1 M. Además, el pH del tampón puede ser, por ejemplo, de 2 a 13, de 4 a 11, de 5 a 9, de 6 a 8, de 6 a 9, o de 6 a 10.

La solución acuosa se aplica a un canal, en particular a microcanales.

La solución acuosa contiene al menos el tampón y el tensioactivo de organosilicona, y también puede contener el agente de bloqueo. Por otra parte, la solución acuosa además puede contener al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un ion de cabeza, un ion de arrastre, un analito, una muestra, un análogo, una sustancia marcadora, un anticuerpo, un antígeno, una cadena de ácidos nucleicos, una proteína, un polímero cargado, una sustancia cargada que forma una micela, medios de separación (matriz para el tamizado de polímeros).

Como ion de cabeza, se puede utilizar cualquier ion que tenga una velocidad electroforética superior a la de un analito o un análogo. Dicho ion incluye, por ejemplo, Cl⁻. La concentración de iones puede variar, por ejemplo, de 1 μM a 10 M, de 100 μM a 1 M, o de 1 mM a 500 mM.

Como ion de arrastre, se puede utilizar cualquier ion que tenga una velocidad electroforética más lenta que la de un analito o un análogo. Estos iones incluyen, por ejemplo, el tampón de Good tal como HEPES, TAPS, MES, MOPS, un aminoácido tal como glicina, treonina. La concentración puede ser, por ejemplo, de 1 μM a 10 M, de 100 μM a 1 M, o de 1 mM a 500 mM.

El analito incluye, por ejemplo, una cadena de nucleótidos (por ejemplo, una cadena de oligonucleótidos y una cadena de polinucleótidos con una secuencia específica); un cromosoma; una cadena peptídica (por ejemplo, C-peptido y angiotensina I), proteínas séricas [por ejemplo, procalcitonina, inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), albúmina, ferritina]; una enzima [por ejemplo, una amilasa (tipo pancreática, tipo glándula salival y tipo X), una fosfatasa alcalina (por ejemplo, hepática, ósea, placentaria y del intestino delgado), una fosfatasa ácida (por ejemplo, PAP), una γ-glutamil transferasa (por ejemplo, renal, pancreática y hepática)]; microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, bacterias de la tuberculosis, neumococos, organismos diftéricos, meningococos, gonococo), virus (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del herpes, virus de la hepatitis, virus de ATL, virus del SIDA), hongos (por ejemplo, Candida y Cryptococcus), espiroquetas (por ejemplo, leptospira, Treponema pallidum), clamidias y micoplasmas; alérgenos causantes de broncoespasmos, rinitis alérgica y dermatitis atópica (por ejemplo, el alérgeno derivado del polvo doméstico), ácaros tales como Dermatophagoides farinae y Dermatophagoides pteronyssinus, polen de cedro, ciprés, Pasupalum thunbergii, ambrosia, hierba timotea, pasto vernal dulce, un animal tal como un gato, un perro o un cangrejo; un marcador tumoral de un antígeno proteico (por ejemplo, PSA, PGI y PGI); un antígeno carbohidrato [AFP (por ejemplo, L1 a L3), hCG (por ejemplo, la familia hCG), transferrina, IgG, tiroglobulina, antígeno carcinoembrionario (por ejemplo, CEA, NCA, NCA-2 y NFA), CA19-9, PIVKA-II, CA125, un

antígeno específico de la próstata]; una cadena de hidratos de carbono (azúcar) [por ejemplo, ácido hialurónico, β -glucano y una cadena de hidratos de carbono (azúcar) contenida en el antígeno carbohidrato descrito anteriormente, una proteína de unión a una cadena de hidratos de carbono (azúcar) (por ejemplo, la proteína de unión al ácido hialurónico y la proteína de unión al β -glucano); lectina (por ejemplo, concanavalina A, lectina de lenteja); un fosfolípido (por ejemplo, cardiolipina); un lipopolisacárido (por ejemplo, endotoxina); sustancias químicas (hormonas tales como PTH, T3, T4, TSH, insulina, LH, FSH y prolactina); un receptor (por ejemplo, un receptor de estrógeno y TSH); un ligando (por ejemplo, estrógeno y TSH), y sus anticuerpos.

El anticuerpo engloba un producto de descomposición, tal como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ producidos por la degradación con una enzima proteolítica (por ejemplo, proteinasa) tal como papaína o pepsina o por degradación química.

Además, el analito puede estar marcado directamente por una sustancia marcadora o a través de una sustancia de unión al analito.

La muestra se ejemplifica por lo siguiente: muestras de origen biológico que incluyen fluido corporal tal como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido linfático, excreciones tales como la orina, heces, expectoración, materia purulenta, exfoliación dérmica, muestras ambientales tales como alimentos, bebidas, agua del grifo, agua de mar, agua de lagos y marismas, agua de río, aguas residuales de fábricas, lavados para semiconductores, lavados después del lavado de instrumental médico, y sus productos procesados reconstituidos por disolución en agua o en un tampón tal como tampón Tris, tampón de fosfato, tampón veronal, tampón de borato, y tampón de Good. Una muestra engloba un analito como se ha descrito anteriormente producido por síntesis química.

El análogo incluye, por ejemplo, un analito en una muestra, una diana de un análisis; uno en el que una parte de la estructura de un analito en una muestra, por ejemplo, se modifica, altera, desnaturaliza, o elimina (el denominado análogo). Otros ejemplos de análogos son una proteína recombinante con mutaciones parciales; un péptido con la secuencia peptídica parcialmente modificada; una cadena de nucleótidos que contiene secuencias de nucleótidos parcialmente modificadas. Los ejemplos específicos de un analito en una muestra, una diana en un análisis, se han descrito anteriormente.

Además, el análogo puede estar marcado directamente por una sustancia marcadora o a través de una sustancia de unión al análogo.

Una sustancia marcadora se puede usar en un inmunoensayo enzimático (EIA), un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo de fluorescencia (FIA), y en un procedimiento de hibridación, por ejemplo. Una sustancia marcadora incluye, por ejemplo, enzimas tales como fosfatasa alcalina (ALP), β -galactosidasa (β -Gal), peroxidasa (POD), microperoxidasa, glucosa oxidasa (GOD), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), malato deshidrogenasa y luciferasa. Todas estas enzimas se pueden utilizar para proporcionar señales amplificadas mediante enzimas para aumentar la sensibilidad del ensayo. Una sustancia marcadora puede ser un colorante, en particular, colorantes fluorescentes de alto rendimiento cuántico tales como colorantes Alexa Fluor (Molecular Probes Inc.) o colorantes Hilyte (AnaSpec inc.) o CyDyes (Amersham Bioscience Inc) con los diversos espectros de excitación y emisión correspondientes a los diferentes análogos de los colorantes. Además, como sustancias marcadoras se pueden utilizar otros materiales fluorescentes, tales como fluoresceína, rodamina, dansilo, fluorescamina, cumarina, y colorantes fluorescentes de tierras raras, tales como samario (Sm), europio (Eu), terbio (Tb) o disprosio (Dy) y un compuesto de quelato tal como 4,4'-bis (1",1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanodion-6"-il) clorosulfo-O-terfenilo (BHHCT), ácido 4,7-bis (clorosulfonyl)-1,10-fenantrolin-2, 9-dicarboxílico (BCPDA), ácido β -naftiltrifluoroacético (β -NTA). Como marcadores para sondas de ácidos nucleicos para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos se pueden utilizar colorantes fluorescentes intercalantes, tales como bromuro de etidio, homodímero de etidio-1 (EthD-1), colorantes de cianina de tipo dimérico tales como POPO-1, BOBO-1, YOYO-1, TOTO-1, y otros colorantes fluorescentes de tinción de ácidos nucleicos. Como sustancia marcadora también se pueden utilizar luminiscentes y marcadores de espín.

Además, la sustancia marcadora puede estar unida a la sustancia de unión al analito o al análogo.

La sustancia de unión al analito o la sustancia de unión al análogo significa una sustancia que tiene una propiedad capaz de formar un complejo entre el analito o el análogo, en concreto, un complejo que contiene el analito o el análogo como constituyente mediante la unión con el analito o el análogo, tal como se ha descrito anteriormente.

Dicha sustancia significa la sustancia que se une con el analito o con el análogo mediante una interacción como una reacción "antígeno" = "anticuerpo", una reacción "cadena de hidratos de carbono (azúcar)" = "proteína", una reacción "cadena de hidratos de carbono (azúcar)" = "lectina", una reacción "enzima"- "inhibidor", una reacción "proteína"- "cadena peptídica" o una reacción "cromosoma o cadena de nucleótidos"- "cadena de nucleótidos". Cuando una de las sustancias de los pares anteriormente mencionados es el analito o el análogo, la otra es la sustancia de unión al analito o al análogo. Por ejemplo, cuando el analito o el análogo es un "antígeno", la sustancia que se une al analito o al análogo es un "anticuerpo", y cuando el analito o el análogo es un "anticuerpo", la sustancia que se une al analito o al análogo es un "antígeno" (lo mismo se aplica a los demás pares anteriores).

Específicamente, la sustancia de unión al analito o al análogo puede ser un anticuerpo para el analito o el análogo, o un antígeno unido con el analito o el análogo, o una proteína de unión al analito o al análogo.

5 El anticuerpo engloba un producto de descomposición, tal como los fragmentos Fab y F(ab')₂ producidos por la degradación con una enzima proteolítica (por ejemplo, proteinasa) tal como papaína o pepsina o por degradación química. Se puede utilizar una sustancia capaz de modificar la movilidad electroforética del analito o el análogo, e incluye un óxido metálico inorgánico tal como sílice y alúmina; un metal tal como oro, titanio, hierro y níquel; un óxido metálico inorgánico introducido con un grupo funcional mediante una operación tal como el tratamiento de acoplamiento de silano; organismos tales como diversos microorganismos y células eucariotas; polisacáridos tales como agarosa, celulosa y dextrano insoluble; compuestos de polímeros sintéticos tales como látex de poliestireno, 10 un copolímero de estireno-butadieno, un copolímero de estireno-ácido metacrílico, un copolímero de acroleína-etilenglicol dimetacrilato, látex de estireno-ácido estirenosulfónico, poliacrilamida, poliglicidil metacrilato, partículas recubiertas de poliácroleína, poliácronitrilo reticulado, polímeros a base de ácido acrílico o éster de acrilato, un copolímero de acrilonitrilo-butadieno, un copolímero de cloruro de vinilo-éster de acrilato y un copolímero de polivinilacetato-acrilato; biomoléculas tales como eritrocitos, azúcares, cadenas de ácidos nucleicos (polinucleótidos tales como ARN, ADN), proteínas, polipéptidos y poliaminoácidos (ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, polilisina), lípidos. La sustancia capaz de modificar la movilidad electroforética del analito o el análogo puede ser un ácido nucleico (una cadena de nucleótidos), proteína, polipéptido o poliaminoácido, o puede ser un ácido nucleico (una cadena de nucleótidos) o un poliaminoácido. La cadena de ácidos nucleicos puede ser de una sola hebra, de doble cadena, o superior, o puede ser de doble cadena.

20 La sustancia capaz de modificar la movilidad electroforética del analito o el análogo se puede unir directamente al analito o al análogo o se puede unir a través de la sustancia de unión al analito o análogo.

Además, la sustancia capaz de modificar la movilidad electroforética del analito o el análogo puede estar marcada por una sustancia marcadora y/o unida a la sustancia de unión al analito o análogo.

25 Como polímero cargado para bloquear las interferencias no específicas, se puede seleccionar uno que tenga la carga opuesta (positiva o negativa) de la de una sustancia también presente en una muestra.

Los ejemplos de un polímero cargado incluyen polímeros polianiónicos y polímeros policatiónicos.

30 Los polímeros polianiónicos incluyen polisacáridos tales como heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, ácido poliwolfrámico, ácido wolframofosfórico, ácido hialurónico, sulfato de dermatán y sulfato de polianetol; polinucleótidos tales como ADN (por ejemplo, ADN plasmídico, ADN de timo de ternera, ADN de esperma de salmón, ADN unido con celulosa y ADN sintético), y ARN; polipéptidos tales como poliaminoácidos (por ejemplo, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico), un polipéptido sintético; compuestos de polímeros sintéticos tales como poli-dldC, sulfato de polivinilo y ácido poliacrílico; compuestos cerámicos tales como partículas de vidrio, vidrio coloidal, y leche de vidrio, y sus complejos.

35 Además, los polímeros policatiónicos incluyen polisacáridos tales como quitosano, y sus derivados; polipéptidos tales como polilisina, polihistidina, poliarginina, protamina, histona, y ornitina; compuestos de polímeros sintéticos tales como polialilamina, polietilenimina, y polivinilamina; poliaminas tales como espermina y espermidina; lípidos catiónicos; compuestos cerámicos, y sus complejos.

Los polímeros polianiónicos pueden ser un polisacárido aniónico o pueden ser heparina.

40 Los polímeros cargados descritos anteriormente se pueden usar independientemente o en una combinación adecuada con dos o más tipos.

Se puede utilizar cualquier sustancia de micela cargada siempre y cuando su velocidad electroforética sea más rápida que la de un analito o un análogo. Dicha sustancia cargada incluye, por ejemplo, un agente tensioactivo tal como SDS. Se puede utilizar una cantidad por encima de la concentración micelar crítica. La concentración de la sustancia cargada puede ser, por ejemplo, de 1 µM a 10 M, de 100 µM a 1 M, o de 1 mM a 500 mM.

45 Los ejemplos de agentes de carga son, pero no están limitados a, poliésteres tales como óxido de polietileno (polietilenglicol), óxido de polipropileno; polialquiléniminas tales como polietilenimina; polímeros del ácido poliacrílico tales como ácido poliacrílico, ésteres de poliacrilato, y poli(metilacrilato); polímeros a base de poliamida tales como poliacrilamida, polimetacrilamida; polímeros a base del ácido polimetacrílico tales como ácido polimetacrílico, ésteres de polimetacrilato y poli(metilmetacrilato); polímeros a base de polivinilo tales como acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona y poliviniloxazolidona; polímeros hidroxílicos solubles en agua tales como pululano, elsinano, xantano, dextrano y goma guar; compuestos celulósicos solubles en agua tales como metil celulosa, hidroxietil celulosa e hidroxipropil celulosa; sus derivados, y copolímeros que tienen una pluralidad de tipos de unidades monoméricas que componen estos polímeros. Estos agentes de carga se pueden utilizar de forma independiente o en combinación con dos o más tipos.

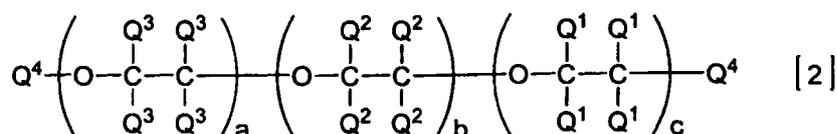
55 Los pesos moleculares de los agentes de carga como se ha descrito anteriormente pueden ser de 500 Da a 6000 kDa, de 1 a 1000 kDa, o de 50 a 500 kDa.

Las concentraciones de los agentes de carga como se ha descrito anteriormente se pueden seleccionar de manera conveniente en un intervalo del 0,01 al 40% (p/v), del 0,01 al 20% (p/v), o del 0,1 al 10% (p/v).

Al realizar ensayos tales como inmunoensayos, los tensioactivos de organosilicona tales como trisiloxano se pueden combinar con un agente de bloqueo, que se utiliza para prevenir una interacción entre la superficie del canal y un componente de la solución acuosa. El agente de bloqueo puede estar contenido en la solución acuosa que contiene el tampón y el tensioactivo de organosilicona o en otra solución acuosa que no contenga tensioactivo de organosilicona. La solución acuosa que contiene el tampón, el tensioactivo de organosilicona y el agente de bloqueo se puede aplicar al canal, o la solución acuosa que contiene el tampón y el tensioactivo de organosilicona y la solución acuosa que contiene el agente de bloqueo y no contiene tensioactivo de organosilicona se pueden aplicar al canal por separado.

El agente de bloqueo puede ser copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y/o poli-dimetilacrilamida (p-DMA).

El agente de bloqueo - el oligómero de poli(óxido de alquileo) - puede tener la estructura siguiente:



en la que cada Q^1 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, cada Q^2 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, cada Q^3 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y cada Q^4 es un átomo de hidrógeno o un grupo OH, en el que a, b, y c son independientemente un número entero igual o superior a 1.

Un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono representados mediante Q^1 , R^2 y Q^3 en la fórmula [2] puede ser de cadena lineal o ramificada, o puede ser una cadena lineal e incluye un grupo que preferentemente tiene de 1 a 2 átomos de carbono, y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, y un grupo terc-butilo. Q^1 en la fórmula [2] puede ser un átomo de hidrógeno.

Tres de los Q^2 en la fórmula [2] pueden ser cada uno un átomo de hidrógeno y el restante puede ser un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, o tres de los Q^2 puede ser cada uno un átomo de hidrógeno y el restante puede ser un grupo metilo.

Q^3 en la fórmula [2] puede ser un átomo de hidrógeno.

En la fórmula [2], a es un número entero igual o superior a 1. Específicamente, a puede ser, en un límite inferior, 1 o superior, o 12 o superior, y en un límite superior, 130 o inferior, 101 o inferior, o 50 o inferior.

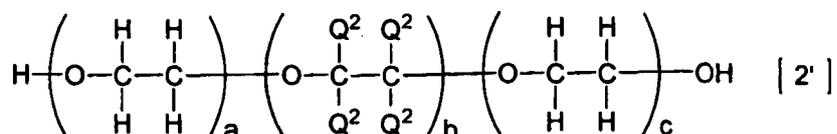
En la fórmula [2], b es un número entero igual o superior a 1. Específicamente, b puede ser, en un límite inferior, 1 o superior, 2 o superior, 50 o superior, y en un límite superior, 100 o inferior, o 70 o inferior.

En la fórmula [2], c es un número entero igual o superior a 1. Específicamente, c puede ser, en un límite inferior, 1 o superior, o 12 o superior, y en un límite superior, 130 o inferior, 101 o inferior, o 50 o inferior.

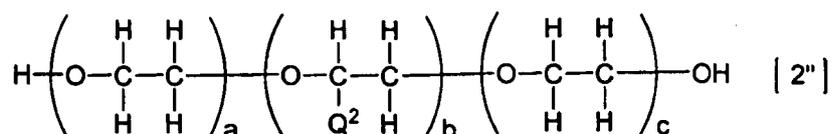
Los índices, a + b + c pueden ser, en un límite inferior, 3 o superior, 20 o superior, o 40 o superior, y en un límite superior, 500 o inferior, 350 o inferior, 300 o inferior, o 250 o inferior.

El peso molecular promedio en peso (M_w) del oligómero de poli(óxido de alquileo) representado por la fórmula [2] es de 4700 a 13.000 o de 8400 a 12.600.

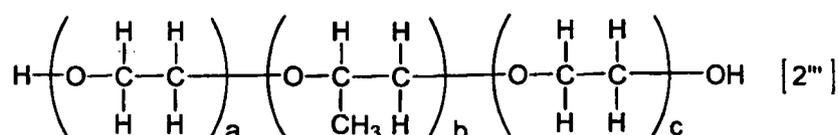
El oligómero de poli(óxido de alquileo) que incluye la fórmula general [2] anterior puede ser un oligómero de poli(óxido de alquileo) que incluye la siguiente fórmula general [2'], un oligómero de poli(óxido de alquileo) que incluye la siguiente fórmula general [2''] o un oligómero de poli(óxido de alquileo) que incluye la siguiente fórmula general [2''']:



en la que Q^2 , a, b y c son iguales a como se ha descrito anteriormente,



en la que Q^2 es el mismo grupo alquilo que tiene de un 1 a 4 átomos de carbono como se ha descrito anteriormente, y a, b y c son iguales a como se ha descrito anteriormente,



5 en la que a, b y c son iguales a como se ha descrito anteriormente.

La cantidad de los agentes de bloqueo es en un límite inferior, del 0,001% (v/v) o superior, del 0,01% (v/v) o superior, o del 0,03% (v/v) o superior en una solución acuosa, y en un límite superior, del 5% (v/v) o inferior, del 0,5% (v/v) o inferior, o del 0,1% (v/v) o inferior en una solución acuosa.

10 Un ejemplo de un agente de bloqueo que se puede utilizar para mejorar el rendimiento del ensayo es Pluronic® F-127. Por ejemplo, la combinación de trisiloxano con un oligómero de poli(óxido de alquileo) tal como Pluronic® F-127 puede producir una separación óptima de las muestras, tales como las isoformas L1 y L3 de la α -fetoproteína (AFP). L3 es una isoforma fucosilada de la AFP. La Figura 2A muestra un electroferograma de un inmunoensayo de una isoforma de la AFP usando un microchip PCO, un dispositivo microfluídico con canales y pocillos de interconexión, con un agente humectante tensioactivo de organosilicona añadido en el tampón y los reactivos (concentración final del 0,1% de trisiloxano) pero sin oligómero de poli(óxido de alquileo) tal como Pluronic® F-127. El llenado directo de los reactivos en los canales no produjo burbujas y la reacción se llevó a cabo con éxito. Sin embargo, sin el agente de bloqueo, las isoformas de la AFP no se separaron como se observa por la fusión de los dos picos de la Figura 2A. Cuando un oligómero de poli(óxido de alquileo), tal como Pluronic® F-127 y el tensioactivo de organosilicona se añaden al reactivo a una concentración final del 0,1% de cada uno de ellos, se resuelven los picos L1 y L3, como se ve en la Figura 2B. Se puede incorporar un oligómero de poli(óxido de alquileo) tal como Pluronic F-127® a los reactivos y tampones en el intervalo del 0,5% al 0,01% (v/v), y más en particular del 0,1% al 0,01%.

25 En otro ejemplo, se puede utilizar poli-dimetilacrilamida (p-DMA) como agente de bloqueo para los inmunoensayos. La aplicación de una p-DMA de bajo peso molecular puede requerir otro agente de bloqueo tal como Pluonic F-127 para dar una buena resolución de los picos para inmunoensayos tales como el inmunoensayo de las isoformas de la AFP, pero una p-DMA de elevado peso molecular puede no requerirlo.

30 La p-DMA A es un ejemplo de una p-DMA de bajo peso molecular con $M_n = 56.114$, $M_w = 114.474$, M_w del pico = 88.461, y $M_w/M_n = 2,04$, en la que M_n es el peso molecular promedio en número de la p-DMA y M_w es el peso molecular promedio en peso de la p-DMA. Los conceptos de "peso molecular promedio en número" y "peso molecular promedio en peso" son parámetros bien definidos en la técnica de la química de polímeros y se pueden determinar empíricamente. Por lo general, el peso molecular promedio en número se mide mediante cromatografía de permeación en gel, viscosimetría (ecuación de Mark-Houwink), y procedimientos coligativos como la osmometría de presión de vapor o la valoración del grupo terminal, y el peso molecular promedio en peso de los polímeros se mide por dispersión de luz, dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS), dispersión de rayos X, y la velocidad de sedimentación. El pico se refiere al pico de la cromatografía de tamaños moleculares utilizada para medir el tamaño molecular de los polímeros.

40 La p-DMA A de bajo peso molecular (LMW) por sí misma no parece bloquear los gránulos poliméricos para los inmunoensayos de las isoformas de la AFP al 0,9% (v/v). Sin embargo, mediante la combinación de p-DMA A con Pluronic F-127 al 0,1% produce unas buenas resoluciones del pico. Por otra parte, una p-DMA B de elevado peso molecular (HMW) con $M_n = 411.696$, $M_w = 1.009.890$, M_w de pico = 1.042.960, y $M_w/M_n = 2,453$ dio buenas resoluciones del pico para los inmunoensayos de la isoforma de la AFP al 0,9% sin Pluronic F-127. Por otra parte, la p-DMA C con $M_n = 356.223$, $M_w = 1.114.600$, M_w de pico = 1.080.200, y $M_w/M_n = 3,126$ también dieron resultados similares a los de la p-DMA B HMW. Se cree que al ser la p-DMA HMW un polímero más largo tendrá una mayor afinidad de unión por la superficie plástica para bloquear la superficie con más eficacia que la p-DMA LMW.

45 Los ejemplos de los agentes de bloqueo se han descrito en términos de los inmunoensayos de las isoformas de la AFP pero la utilización de los agentes de bloqueo no se limita a uno cualquiera de los ensayos particulares.

No solamente los sistemas de ensayo particulares sino cualquier procedimiento diagnóstico analítico o clínico que requiera el llenado o la transferencia de líquidos acuosos a través de canales hidrófobos se pueden beneficiar de la utilización de aditivos tensioactivos de organosilicona tales como el trisiloxano para mejorar las propiedades

humectantes/de llenado de superficies hidrófobas de materiales poliméricos.

Además de incorporar el tensioactivo de organosilicona directamente al reactivo en forma de componente, se puede aplicar tensioactivo concentrado (> 1%) para tratar superficies hidrófobas antes de llenar los canales con reactivos acuosos. La superficie tratada se enjuaga con agua para retirar los tensioactivos no adsorbidos. Posteriormente los reactivos sin el tensioactivo de organosilicona se pueden rellenar. Esta técnica puede ser útil para cromatografía electrocinética micelar (MECC), en la que con frecuencia se seleccionan tensioactivos anfipáticos para unir y separar los analitos diana. La adsorción del tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano sobre superficies hidrófobas y el lavado de cualquier exceso puede evitar la introducción del tensioactivo de organosilicona en la masa de fluido que provoquen interferencias no deseables en la MECC debido a que los tensioactivos a concentraciones elevadas (superiores a la concentración micelar crítica (CMC)) forman micelas. (Terabe, S y col. *Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries*. *Anal Chem*, 1984; 56:111).

En otra aplicación, se puede añadir un tensioactivo de organosilicona a tampones acuosos que contengan células que se deben clasificar o contar dentro o a lo largo de microcanales (Bacterial cell sorting in microchannels, Lastoskie, C.M.; Sastry, A.M.; Forrester, S.B.; Kim, T.Y. *Bio-, Micro-, and Nanosystems*, 2003. ASM Conferences, 7-10 July 2003) para prevenir/minimizar la adhesión de las células o de las burbujas de aire a la pared del aparato analítico. Dependiendo del sistema de detección, es probable que las burbujas de aire incrementen la incidencia de los falsos positivos.

Para cromatografía líquida a baja presión (LC) realizada en microcanales (Regnier FE y col. *Chromatography and electrophoresis on chip: critical elements of future integrated, microfluidics analytical systems for life science*, *Trends Biotechnol*, 1999; 17:101) con paredes hidrófobas, el tensioactivo de organosilicona se puede añadir a la fase móvil de LC. Los tampones acuosos que contienen tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano se pueden bombear directamente en las microcolumnas sin dejar tras de sí burbujas de aire. Las burbujas de aire atrapadas con frecuencia provocan una pérdida de resolución y/o el fallo de la columna en μ -LC.

La electroforesis capilar por zonas (CZE) (Jorgenson JW y Lukacs KD, *Capillary zone electrophoresis*, *Science*, 1983, 222: 266) se ha aplicado para separar y detectar especies cargadas y especies no iónicas, en tamaños que oscilan entre iones pequeños, macromoléculas (proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos tales como ADN o ARN), y células enteras. Esta técnica analítica es útil en una gran variedad de campos, que abarcan desde la vigilancia medioambiental hasta el control de calidad de productos farmacéuticos (biológicos o químicos) e investigación biomédica. Los electrolitos utilizados en la separación CZE por lo general son de naturaleza acuosa. En consecuencia, cuando se utilizan canales plásticos o hidrófobos, es extremadamente difícil rellenar los microcanales sin generar burbujas de aire. Al incluir un tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano en los tampones, se puede prevenir o minimizar la formación de burbujas de aire, que da lugar a la posibilidad de utilizar CZE sobre microchips poliméricos. Por otra parte, la solidez y reproducibilidad del ensayo CZE también se puede mejorar con la inclusión de un agente de bloqueo que impida la adsorción de las moléculas a separar que se han descrito anteriormente y también la detección de reactivos tales como homólogos de unión marcados como anticuerpos o moléculas colorantes marcadas como colorantes fluorescentes que se intercalan con el ADN o el ARN o colorantes fluorescentes que tiñen proteínas.

Como parte de un proceso de síntesis, purificación o fabricación, con frecuencia se debe determinar la presencia y/o niveles de isómeros posicionales, quirales o estereoisómeros (análisis estructural de las isoformas). Esto se puede conseguir mediante cromatografía electrocinética micelar en capilares convencionales o microcanales sobre microchips. Cuando el canal de separación tiene una superficie hidrófoba, es deseable añadir un tensioactivo de organosilicona tal como trisiloxano para facilitar el llenado del analito y los electrolitos en soluciones acuosas. No obstante, si se utilizan otros tensioactivos como pseudo-fase para realizar la separación para evitar interferencias se puede seleccionar una concentración de organosilicona que esté por debajo de su propia CMC.

Se pueden aplicar dispositivos con cámaras y/o canales a escala micrométrica para que formen la base de un sistema de análisis micrométrico total (μ TAS) o también conocido como Lab-on-a-Chip a análisis de alto rendimiento de biomoléculas, tanto a escala genómica como proteómica, así como estudios químicos, clínicos y enzimáticos rutinarios. Algunos de los principales beneficios incluyen el bajo consumo de reactivos y de muestras, la facilidad de automatización, la reducción de costes y la capacidad de integrar múltiples procedimientos en un único dispositivo de forma transparente. Dichos dispositivos pueden estar fabricados parcial o completamente de sustratos o recubrimientos poliméricos que tengan características de poca o ninguna carga.

A pesar de que tener una superficie virtualmente no cargada proporciona características deseables, tal como la adsorción mínima de las especies cargadas (por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos), la desventaja clave radica en su hidrofobicidad. Las superficies hidrófobas no son compatibles con los tampones y reactivos acuosos que se utilizan habitualmente en ciencias. La humectación parcial de los canales hidrófobos con frecuencia da lugar a espacios atrapados de aire que producen discontinuidades en la corriente de líquidos y eléctrica. La humectación completa de dichos dispositivos se puede posibilitar con la adición a los reactivos acuosos de tensioactivos de organosilicona que incluyen trisiloxano. Los tensioactivos de organosilicona reducen enormemente la tensión superficial en la interfaz entre los reactivos acuosos y la superficie hidrófoba, y con ello, facilitan la humectación completa de los microcanales hidrófobos por parte de soluciones acuosas, que previene o minimiza la formación de

burbujas de aire.

El procedimiento de aplicación de la solución acuosa incluye, pero no está limitado a, un procedimiento para la aplicación de la solución acuosa eléctricamente al canal mediante la aplicación de tensión sobre el canal; un procedimiento para la aplicación de la solución acuosa al canal mediante presurización o despresurización del canal; y un procedimiento para la aplicación de la solución acuosa al canal mediante la utilización de una actividad capilar.

Se pueden utilizar procedimientos electroforéticos basados en diversos principios (modos de separación). Un procedimiento electroforético incluye, por ejemplo, los procedimientos que utilizan diferencias en la movilidad electroforética en capilares tales como (1) Procedimiento de apilamiento de muestras con amplificación de campo (FASS) [US-A-2003-0057092 A1; Weiss, D. J., Saunders, K., Lunte, C.E. *Electrophoresis* 2001, 22, 59-65; Britz-McKibbin, P., Bebault, G.M., Chen, D.D.Y. *Anal Chem.* 2000, 72, 1729-1735; y Ross, D., Locascio, L.E. *Anal Chem.* 2002, 71, 5137-5145]; (2) Procedimiento de inyección de muestras con amplificación de campo (FASI) [Chien, R.L y col. *J. Chromatogr.* 1991, 559, 141-148, y similares]; (3) Isotacoforesis (ITP) [Everaerts, F.M., Geurts, M. Mikkers, F.E.P., Verheggen, T.P.E.M *J Chromatogr.* 1976, 119, 129-155; Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Peek, J.A.F. *J. Chromatogr.* 1979, 168, 293-315; Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Peek, J.A.F. *J. Chromatogr.* 1979, 168, 317-332; Hirokawa, T, Okamoto, H. Ikuta, N., y Gas, B., *Analytical Sciences* 2001, Vol. 17 Supplement BB5, y similares]; (4) Procedimiento de isoelectroenfoque (iF) [Wehr I-, y col., *Am. Biotechnol. Lab.* 1990, 8, 22; Kilar F. y col., y *Electrophoresis* 1989, 10, 23-29]; (5) Procedimiento de apilamiento de muestras de gran volumen (LVSS) [Siri, N. y col., *J. Chromatogr. B.* (2003), 793, 151-157]; (6) Procedimiento de unión por pH (apilamiento mediado por pH) [P. Britz-McKibbin y col., 2000, *Anal. Chem.*, 72, 1242, P. Britz-McKibbin y col., 2002, *Anal. Chem.*, 74, 3736]; (7) Procedimiento de barrido (cromatografía electrocinética micelar de apilamiento) [J. P. Quirino y col., 1998, *Science*, 282, 465, J. P. Quirino y col., 1999, *Anal. Chem.*, 71, 1638, Y. Sera y col., 2001, *Electrophoresis*, 22, 3509]; el denominado procedimiento de electroforesis capilar por zonas (CZE) para la separación de una sustancia objetivo mediante el movimiento de cada sustancia a diferentes velocidades dependiendo de la intensidad de su carga, en el que un capilar se rellena fundamentalmente sólo con una solución tampón para la electroforesis, [Referencia: H. Hisamoto y col., *Chem. Commun.*, (2001), 2662, y similares]; la denominada cromatografía electrocinética micelar (MEKC) utilizando una sustancia cargada que forma una micela iónica, y la separación de una sustancia objetivo mediante la interacción con dicha micela, [Referencia: S. Terabe, *Trends Anal. Chem.*, (1989), 8, 129, y similares]; el denominado procedimiento de electroforesis capilar en gel (CGE) para la separación de una sustancia objetivo mediante la utilización de un agente de carga tal como un polímero que tiene un efecto de tamiz molecular, y mediante la carga de una molécula y el tamaño de una molécula que induce la interacción con un polímero, [Referencia: S. Hjerten, *J.Chromatogr.*, (1987), 397, 409]

La tensión se aplica de manera que la intensidad de campo eléctrico está en un intervalo, en un límite inferior, no inferior a 5 V/cm, no inferior a 10 V/cm, no inferior a 50 V/cm, no inferior a 500 V/cm, o no inferior a 1000 V/cm, y como un límite superior, no superior a 10.000 V/cm, no superior a 5000 V/cm, o no superior a 2000 V/cm.

Ejemplos:

Ejemplo 1

En primer lugar se prepara una solución madre de tensioactivo de organosilicona (1% en v/v) mediante la mezcla de 1 parte de trisiloxano (Número CAS 67674-67-3 2-[hidroxi (polietileno) propil] heptametiltrisiloxano 8 EO) (TS-HY) con 99 partes de agua. Para preparar los reactivos utilizados para rellenar los microcanales de un sistema de microfluidos, se añadió una cantidad diferente de este tensioactivo de organosilicona al 1% a los reactivos concentrados en función de la concentración de tensioactivo de organosilicona final. A modo de ejemplo, para preparar una solución de tensioactivo de organosilicona al 0,1%, y Tris-Cl 75 mM a pH 7,5, se mezclaron a temperatura ambiente 1 parte de tensioactivo de organosilicona al 1%, 5 partes de Tris-Cl 150 mM, a pH 7,5 y 4 partes de agua.

La Figura 3 muestra un microchip microfluídico 100 ejemplar fabricado de PCO con canales de interconexión 110 que conectan los pocillos marcados con W1 a W4 para los pocillos de residuos, TB para el pocillo del tampón de arrastre, LB para el pocillo del tampón de cabeza, R1 y R2 para los pocillos de reactivo, HO para el pocillo de transferencia, y S para para el pocillo de muestra. El chip 100 se utilizó para realizar un inmunoensayo con las isoformas de la AFP basado en el microchip, a modo de ejemplo para mostrar los efectos de la utilización de tensioactivos de organosilicona. La AFP es un marcador tumoral que se expresa ectópicamente en células de carcinoma hepatocelular (HCC) y con frecuencia se encuentra en concentraciones elevadas en el suero de pacientes con HCC. También es producida por células hepáticas de pacientes con hígados cirróticos o infectados con VHC y el VHB, lo que disminuye la especificidad de la AFP como marcador para el HCC. El aumento de la aparición de una cadena de carbohidratos unidas a asparagina en la AFP-L3 que es reactiva con la aglutinina de *Lens culinaris* (LCA), que en el caso de HCC produjo AFP, ha proporcionado un parámetro de diagnóstico y pronóstico mejorado para el reconocimiento temprano del HCC.

En la Figura 3, el chip 100 funciona sobre un procedimiento de mezcla impulsado por electroforesis, en el que los reactivos R1 y R2 y la muestra S se extraen hacia un canal central 120 por medio de vacío (aplicación de presión negativa sobre los pocillos de residuos, W1-W4) en un orden de movilidades tal que la aplicación de una tensión a

través de TB y LB los impulsará juntos y les permitirá reaccionar. Este proceso se denomina apilamiento de isotacoforesis (ITP). El anticuerpo de ADN proporcionado en R1 está altamente cargado y se mueve más rápido que la muestra, por lo que se concentra debido al apilamiento de ITP antes de la unión con la muestra. El anticuerpo de ADN sirve para acelerar la movilidad electroforética del complejo inmune formado. La muestra que ha reaccionado (el complejo inmune), proporcionada para que se mueva más rápido que el anticuerpo con un colorante fluorescente en R2, reacciona posteriormente para unirse con este anticuerpo. El apilamiento de ITP a continuación enfoca la muestra reaccionada en una banda estrecha, y esta banda estrecha de la muestra a continuación se transfiere para su separación y detección mediante electroforesis capilar (CE). Por lo tanto, después de haber completado las reacciones de unión y apilamiento de ITP, se aplica una tensión de transferencia entre HO y LB para separar y detectar el inmuno-complejo mediante CE.

La Tabla 1 proporciona el tipo de reactivos suministrados en los distintos pocillos. Para cada uno de los reactivos y la muestra, el tensioactivo de organosilicona se proporcionó a una concentración final del 0,1% (v/v), y estos reactivos y la muestra se introdujeron en los pocillos apropiados del microchip 100 para el llenado de los microcanales 110 con una cantidad mínima de burbujas de aire o sin burbujas de aire.

Tabla 1

Zona de TB	Zona de ADN	Zona muestra de	Zona Hilyte	Zonas HO y LB	Residuos
Tris 75 mM	BisTris 75 mM pH 6	BisTris 75 mM pH 7	BisTris 75 mM pH 7	Tris 75 mM pH 7,5	Tris 75 mM pH 7,5
HEPES 125 mM	NaCl 50 mM	NaCl 50 mM	NaCl 50 mM	NaCl 75 mM	NaCl 75 mM
0,6% de pDMA A	0,6% de pDMA A	0,6% de pDMA A	0,6% de pDMA A	0,6% de pDMA A	0,6% de pDMA A
0,1% de PF-127	0,1% de PF-127	0,1% de PF-127	0,1% de PF-127	0,1% de PF-127	0,1% de PF-127
3% de glicerol	3% de glicerol	3% de glicerol	3% de glicerol	3% de glicerol	3% de glicerol
0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20
0,01% de BSA	0,01% de BSA	1% de BSA	1% de BSA	0,01% de BSA	0,01% de BSA
	200 nM de ADN-Ab	100 nM de Colorante-Ab	100 nM de Colorante-Ab	2 mg/ml LCA	
		AFP-L1/L3 50 pM	AFP-L1/L3 50 pM		

Así, en vista de la Figura 3, se proporcionó el reactivo marcado en la zona TB en el pocillo, TB, el reactivo marcado en la zona ADN y el reactivo marcado en la zona Hilyte se suministraron en R1 y R2, respectivamente, y el reactivo con la muestra marcada en la zona de Muestra se suministró en S, y el reactivo marcado en las zonas HO y LB se suministró en HO y LB, y el reactivo marcado en Residuos se suministró en los pocillos de residuos, W1-W4.

En la Tabla 1, pDMA es polidimetilacrilamida (# 26, peso mol. 114,5 kDalton); PF-127 es Pluronic® F-127 (un agente de bloqueo: HO (C₂H₄O)_a (C₃H₆O)_b (C₂H₄O)_aH, a = 101, b = 56); ADN-Ab es ADN conjugado con un anticuerpo monoclonal específico para la AFP humana; Hilyte-Ab es colorante fluorescente Hilyte conjugado con un anticuerpo monoclonal específico para la AFP humana. La AFP L1 y L3 son las isoformas L1 y L3 purificadas de la α-fetoproteína humana.

Los reactivos y la muestra anteriores (50 pM de AFP L1 y de 50 pM de AFP L3 en solución salina tamponada con fosfato) que contienen cada uno tensioactivo de organosilicona al 0,1% y PF-127 al 0,1% fueron inyectados directamente desde los pozos en los microcanales secos. Se puede aplicar presión a través de los pozos para empujar los líquidos hacia los canales. Alternativamente, se puede aplicar vacío sobre los pozos de residuos para arrastrar el tensioactivo de organosilicona, los reactivos y la muestra hacia los canales. Las regiones ocupadas por los reactivos y la muestra después de ser arrastrados se denominan zonas. Por ejemplo, los reactivos y la muestra se cargaron al aplicar -5 psi a cualquiera de los pocillos de residuos adecuado durante 20 segundos. A continuación los reactivos se transportaron electrocinéticamente mediante isotacoforesis (ITP) con la aplicación de 1500 V entre TB y LB. El inmuno-complejo resultante se apiló en una banda estrecha y se separó mediante electroforesis capilar (CE) con la aplicación de 800 V entre HO y LB. La tasa de adquisición de datos fue de 20 Hz. Se utilizaron instrumentos ópticos de detección de fluorescencia para detectar el complejo inmune marcado por fluorescencia a

medida que pasa por la ventana de detección próxima al pocillo LB excitado con un láser de diodo rojo. Esto separa el inmuno-complejo de los picos fluorescentes no específicos y resuelve la AFP-L1 y -L3 mediante electroforesis en un gel de tamizado que contiene, por ejemplo, aglutinina de *L. culinaris* (LCA) que se une selectivamente a AFP-L3.

5 Sin el tensioactivo, se forman burbujas de aire y se adhieren a las paredes del canal cuando se introducen líquidos acuosos directamente en los microcanales secos, pero con la adición del tensioactivo de organosilicona a los reactivos, se previene o se minimiza enormemente la formación de burbujas de aire de manera que el ensayo se puede llevar a cabo de manera eficaz. La Figura 4A (que es la misma que la Figura 2B) muestra el resultado de la separación e identificación de la AFP L1 (primer pico) y L3 (segundo pico) utilizando el chip 100. La Figura 4B muestra un resultado ejemplar de realizar el mismo inmunoensayo con las isoformas de la AFP pero sin la adición del tensioactivo de organosilicona a los reactivos y la muestra. En su lugar, los canales se pre-cargaron con alcohol para suprimir la formación de burbujas de aire y, a continuación los reactivos se inyectaron en los canales mediante presión para desplazar el alcohol. Con este enfoque se observa una resolución similar, pero es necesaria una etapa adicional para humectar previamente los canales hidrófobos utilizando alcoholes. Por otra parte, los alcoholes son difíciles de almacenar y utilizar en aplicaciones instrumentales prácticas del día a día.

15 Ejemplo 2

En otro ejemplo, además de mejorar la humectabilidad de los canales hidrófobos, la adición de tensioactivos de organosilicona tal como el tensioactivo de organosilicona a los reactivos también mejoró la reproducibilidad del inmunoensayo de las isoformas de la AFP sobre un chip (Tabla 2). Este ejemplo se llevó a cabo de una forma similar al Ejemplo 1 mediante la utilización de los mismos reactivos que en el Ejemplo 1.

20 Tabla 2

Procedimiento de humectación del canal	CV, área del pico AFP L1	CV, área del pico AFP L3
Con tensioactivo de organosilicona	2,83%	3,21%
Con pre-carga de alcohol	5,79%	5,80%

Los coeficientes de variación (CV) para el área del pico de las isoformas de la AFP de un inmunoensayo de la AFP sobre un chip fue del 2,83% para el área del pico L1 y del 3,21% para el área del pico L3. El CV para el inmunoensayo de las isoformas de la AFP cuando no se utilizan tensioactivos de organosilicona sino que los canales están pre-cargados con alcohol fue del 5,79% para el área del pico L1 y del 5,8% para el área del pico L3. Los resultados anteriores se promediaron con seis replicaciones. Los valores de CV indican que los resultados se pueden reproducir con fiabilidad y que la reproducibilidad tiende a ser mejor con los tensioactivos de organosilicona que con la pre-carga de un alcohol.

30 Ejemplo 3

En otra realización que supone un inmunoensayo sobre un chip con la hormona estimuladora del tiroides (TSH), se modificó el pH de un tampón de cabeza tal como aquellos que se han descrito anteriormente para determinar el efecto sobre la forma del pico (altura y anchura del pico). Este ejemplo se llevó a cabo de una forma similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para la TSH en lugar de los anticuerpos monoclonales para la AFP humana, y se utilizó una muestra que contiene TSH (100 mIU/litro en suero) en lugar de la muestra que contiene la AFP. Los reactivos son los que se han descrito anteriormente y se añadió una muestra (100 mIU/litro en suero) que contiene tensioactivos de organosilicona a los pocillos de un chip plástico seco microfluídico y sus microcanales secos se rellenaron por medio de vacío a partir de los canales de residuos. Los resultados muestran que la forma del pico de la TSH se afilaba a medida que el pH del tampón de cabeza se incrementaba desde pH 7,5 a pH 9. Los resultados se resumen en las Figuras 5A y 5B. Como se muestra en la Figura 5A, la altura del pico se incrementa a medida que el pH se incrementa desde 7,5 a 9,0. Por otra parte, como se muestra en la Figura 5B, la anchura del pico se reduce a medida que se incrementa el pH desde 7,5 a 9,0. Estos resultados indican que la forma del pico se afila a medida que se incrementa el pH.

40 Ejemplo 4

En otra realización, se sometieron a ensayo diversos agentes humectantes para la carga del chip y la eficacia del comportamiento del ensayo en el ensayo de DCP (descarboxi protrombina). Este ensayo es para un biomarcador proteico de carcinoma hepatocelular que es la proteína protrombina modificada post-traduccionalmente que carece del complemento normal de las cadenas laterales de aminoácidos carboxi-terminales. El ensayo para la DCP utiliza composiciones de tampón similares a las del ensayo de la AFP y anticuerpos específicos para la proteína DCP marcada con ADN como modificador de la movilidad electroforética o con colorante HiLyte como marcador fluorescente. Los agentes humectantes tensioactivos de organosilicona sometidos a ensayo fueron TS-HY (3-[hidroxi (polietileno) propil]-heptametil trisiloxano) al 0,1%, KF-642 al 1%, KF-640 al 1%, y TS-ME (2-[metoxi (polietileno)-

propil] heptametil trisiloxano) al 0,04%. Los diversos tensioactivos de organosilicona se ajustaron a las concentraciones indicadas con el fin de optimizar su actividad de llenado de los canales sin burbujas y, al mismo tiempo, reducir su actividad espumante que es una característica problemática de los agentes humectantes. Los reactivos de ensayo se formularon como se describe en la Tabla 3 a continuación, con las adiciones de los diversos agentes humectantes tensioactivos de organosilicona y Pluronic F-127 como se especifica en la tabla.

Tabla 3

TB	Tampón de ADN	Tampón de Muestra	Tampón de Hilyte	Calibrador de muestra	Zona LB
Tris 75 mM	BisTris 75 mM pH 6	Tris 100 mM pH 7,5	BisTris 75 mM pH 6	BisTris 75 mM pH 6	Tris 40 mM pH 7,5
HEPES 125 mM	NaCl 50 mM	NaCl 50 mM	NaCl 150 mM	NaCl 150 mM	NaCl 50 mM
0,9% de pDMA D	1,1% de pDMA D	1,1% de pDMA D	1% de BSA	0,5% de BSA	0,6% de pDMA D
0,1% de PF-127	0,1% de PF-127	0,1% de PF-127	Ácido benzoico al 0,1%	DCP 4000 mAU/ml	0,1% de PF-127
3% de glicerol	3% de glicerol	3% de glicerol	1 uM HiLyte-Ab		3% de glicerol
0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20	0,05% de Tween 20			0,05% de Tween 20
0,01% de BSA	0,01% de BSA	0,01% de BSA			0,01% de BSA
	600 nM de ADN-Ab	1 uM de IgG de ratón			4% de Heparina Li
	0,1% de Heparina Li				

La pDMA D tiene un Mn de 87.024 y un Mw de 231.127. Se diluye el calibrador de la muestra de DCP mediante la adición de 5 ul en 11 ul de tampón de Hilyte + 34 ul de tampón de muestra. Esta muestra diluida se añadió al pocillo de muestra (S) del chip microfluídico mostrado en la Figura 3. Los reactivos y la muestra (TB, Tampón de ADN, calibrador de DCP diluido en la muestra, y LB) se pusieron en los pocillos apropiados del dispositivo microfluídico como se describe en el Ejemplo 1 para el ensayo de la AFP en microchips y la Figura 3, y el ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 1. El electroferograma de un ensayo de DCP se muestra en la Figura 6. Los resultados de las pruebas de diversos tensioactivos de organosilicona con los reactivos de DCP fueron los siguientes:

1. Todos los tensioactivos de organosilicona sometidos a ensayo ayudaron en la carga de los dispositivos microfluídicos sin la formación de burbujas después de la preparación y la carga de los chips a las concentraciones sometidas a ensayo.
2. La estabilidad del tiempo de migración fue equivalente para todos los tensioactivos de organosilicona sometidos a ensayo.
3. La recuperación del área del pico fue equivalente para todos los tensioactivos de organosilicona sometidos a ensayo, excepto para KF-640 que dio un pico ancho en comparación con otros tensioactivos de organosilicona sometidos a ensayo y por lo tanto no fue tan útil como los demás para el ensayo de DCP.
4. La actividad espumante se ordenó de mayor a menor, TS-HY > TS-ME = KF-642 (KF-640 ND).

En resumen, el TS-HY (3-[hidroxi (polietileno) propil]-heptametil trisiloxano) al 0,1%, el TS-ME (2-[metoxi (polietileno) propil] heptametil trisiloxano) al 0,04%, y el KF-642 (polisiloxano) al 1% dieron un buen rendimiento de ensayo para el ensayo de DCP. También se encontró que KF-642 al 1% dio un buen llenado del chip y un buen rendimiento de ensayo para los ensayos de la AFP después de más pruebas, así como para el ensayo de DCP. Con respecto a la formación de espuma de los reactivos que contienen estos agentes humectantes añadidos, el KF-642 y TS-ME fueron los de menor actividad espumante. Por último, con respecto a la estabilidad a largo plazo del material en las formulaciones reactivas, el KF-642 mostró una buena estabilidad en estudios de estabilidad acelerada.

En resumen, el Dow-309 (trisiloxano 2-hidroxi terminal) al 0,1%, trisiloxano Silwet 408 al 0,04%, y el KF-642 (polisiloxano) al 1% dio un buen rendimiento de ensayo para el ensayo de DCP. También se encontró que el KF-642 al 1% dio un buen llenado del chip y un buen rendimiento de ensayo para los ensayos de la AFP. Con respecto a la formación de espuma de los reactivos que contienen estos agentes humectantes añadidos, el KF-642 y Silwet-408

fueron los de menor actividad espumante. Por último, con respecto a la estabilidad a largo plazo del material en formulaciones reactivas, el KF-642 fue muy estable en estudios de estabilidad acelerada.

REIVINDICACIONES

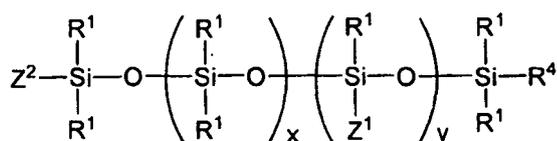
1. Un procedimiento de aplicación de una solución acuosa a un canal microfluídico que tiene superficies hidrófobas, que comprende:

5 proporcionar la solución acuosa que comprende un tampón y un tensioactivo de organosilicona;
 aplicar la solución acuosa al canal microfluídico que tiene superficies hidrófobas.

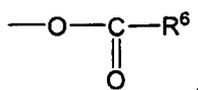
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

(i) el tensioactivo de organosilicona comprende un grupo siloxano y un grupo poliéter que está unido al grupo siloxano; o

(ii) el tensioactivo de organosilicona comprende la fórmula de:

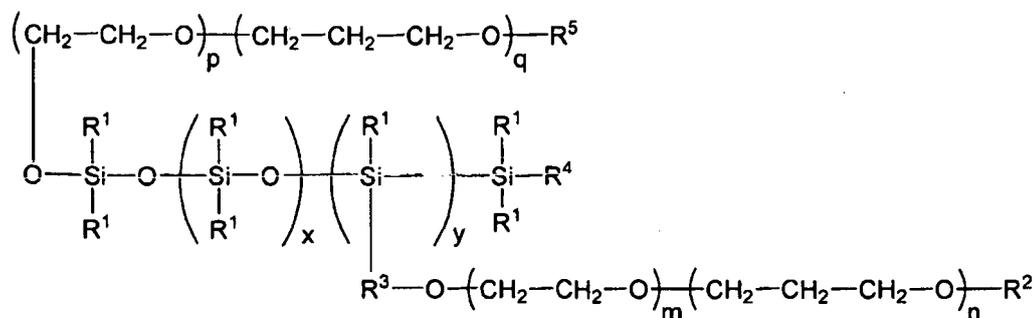


10 en la que R¹ es individualmente un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y Z¹ es un grupo hidroxialquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono o un grupo poliéter, Z² es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono átomos con o sin un grupo OH o un grupo poliéter, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o

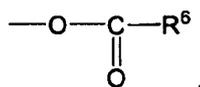


15 en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y es un número entero igual o superior a 1, y x es un número entero igual o superior a cero; o

(iii) el tensioactivo de organosilicona comprende la fórmula:

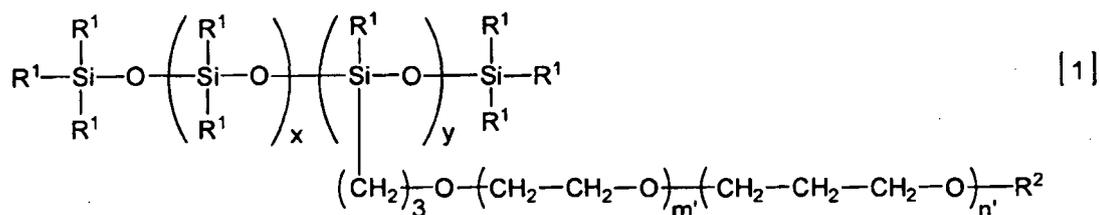


20 en la que R¹ es individualmente un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R² es un grupo alquilo, un grupo acetilo, un átomo de hidrógeno, o un grupo OH, R³ es un grupo alquileo, R⁵ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o

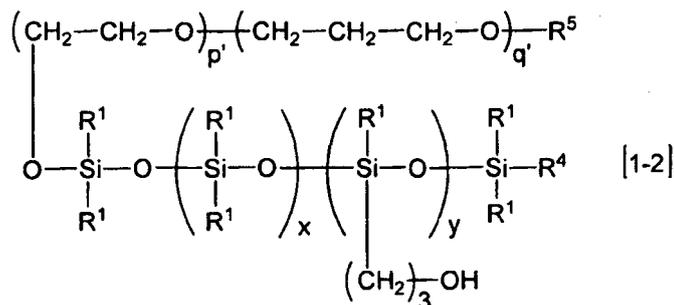


25 en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, y es un número entero igual o superior a 1, y x, m, n, p y q son independientemente un número entero igual o superior a cero; o

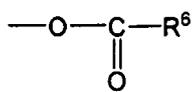
(iv) el tensioactivo de organosilicona comprende las fórmulas [1] o [1-2]:



o



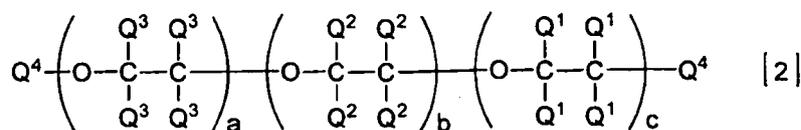
- 5 en las que R¹ es individualmente un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R² es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, un grupo acetilo, un átomo de hidrógeno, o un grupo OH, R⁵ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, R⁴ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH o



- 10 en la que R⁶ es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono con o sin un grupo OH, en la que y, m' y p' son independientemente un número entero igual o superior a 1, y x, n' y q' son independientemente un número entero igual o superior a cero.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa comprende además un agente de bloqueo, en el que el agente de bloqueo es un oligómero de poli(óxido de alquilenos) y/o poli-dimetilacrilamida (p-DMA).

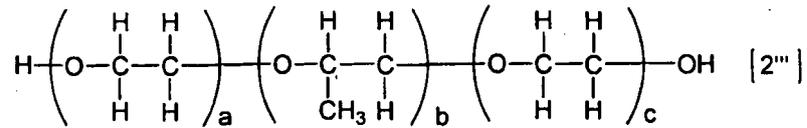
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el oligómero de poli(óxido de alquilenos) comprende la fórmula:



- 20 en la que cada Q¹ es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, cada Q² es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, cada Q³ es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y cada Q⁴ es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo -OH, en la que a, b, y c son independientemente un número entero igual o superior a 1, preferentemente cada Q¹ es un átomo de hidrógeno y cada Q³ es un átomo de hidrógeno.

- 25 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa comprende además un agente de bloqueo, en el que el agente de bloqueo es el oligómero de poli(óxido de alquilenos), de tal manera que la longitud del oligómero de poli(óxido de alquilenos) es mayor que la longitud del tensioactivo de organosilicona.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el oligómero de poli(óxido de alquilenos) comprende la fórmula:



en la que a = 99 aproximadamente a 101 aproximadamente, b = 56 aproximadamente a 69 aproximadamente, y a = c.

5 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la p-DMA tiene un peso molecular promedio en número de 50.000 o superior y un peso molecular promedio en peso de 100.000 o superior.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

10 proporcionar en la solución acuosa de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un ion de arrastre, un ion de cabeza, un analito, una muestra, un análogo, una sustancia marcadora, un anticuerpo, un antígeno, una cadena de ácidos nucleicos, una proteína, un polímero cargado, una sustancia cargada que forma una micela, y un agente de carga.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el canal que tiene superficies hidrófobas

- 15 (i) es un canal microfluídico hidrófobo para una separación electroforética sobre una muestra y/o para un inmunoensayo sobre una muestra, o
 (ii) es un canal microfluídico hidrófobo para clasificar o contar células dentro o a lo largo del canal de microfluidos, o
 (iii) es un microcanal o microcapilar hidrófobo para una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar de zonas, o cromatografía electrocinética micelar.

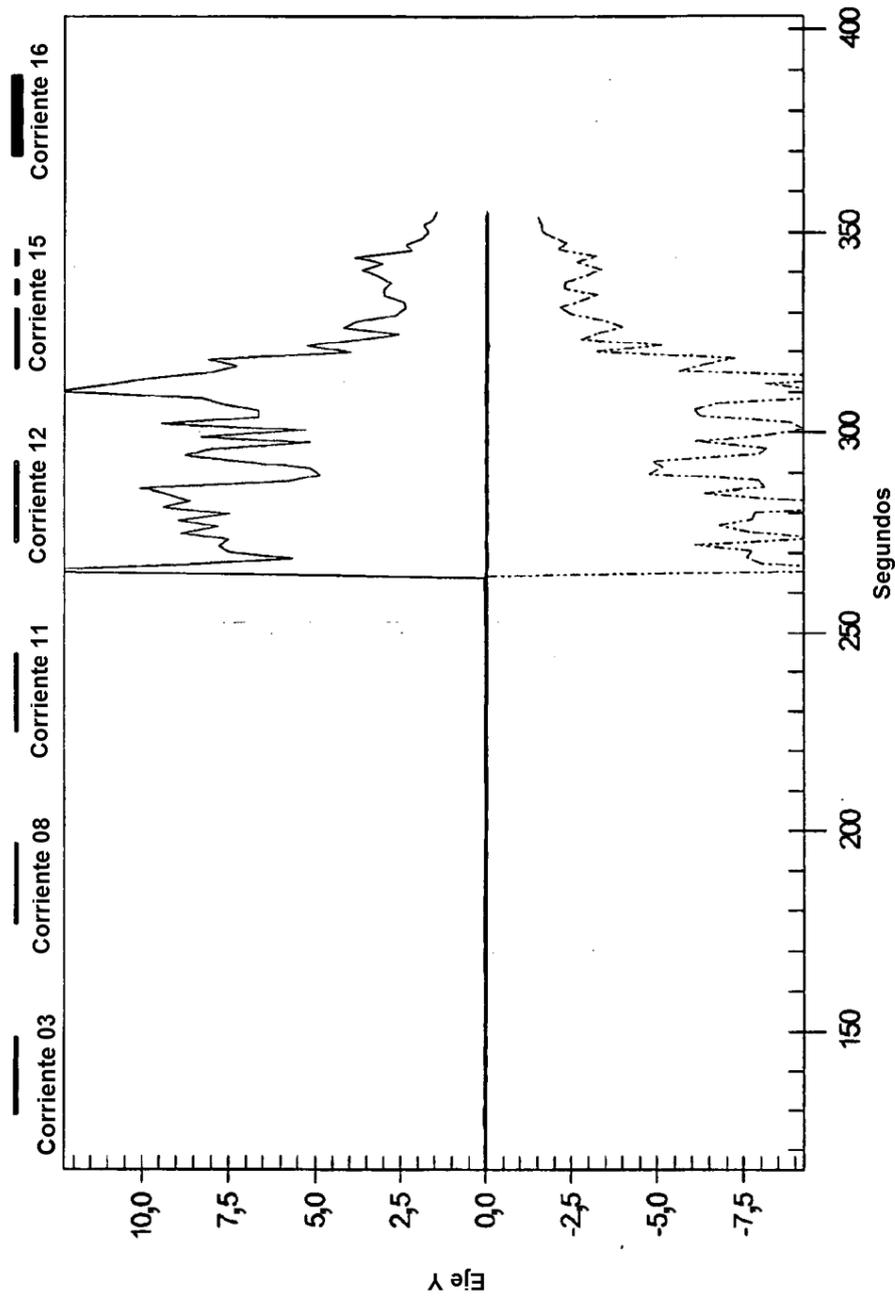


Fig. 1A

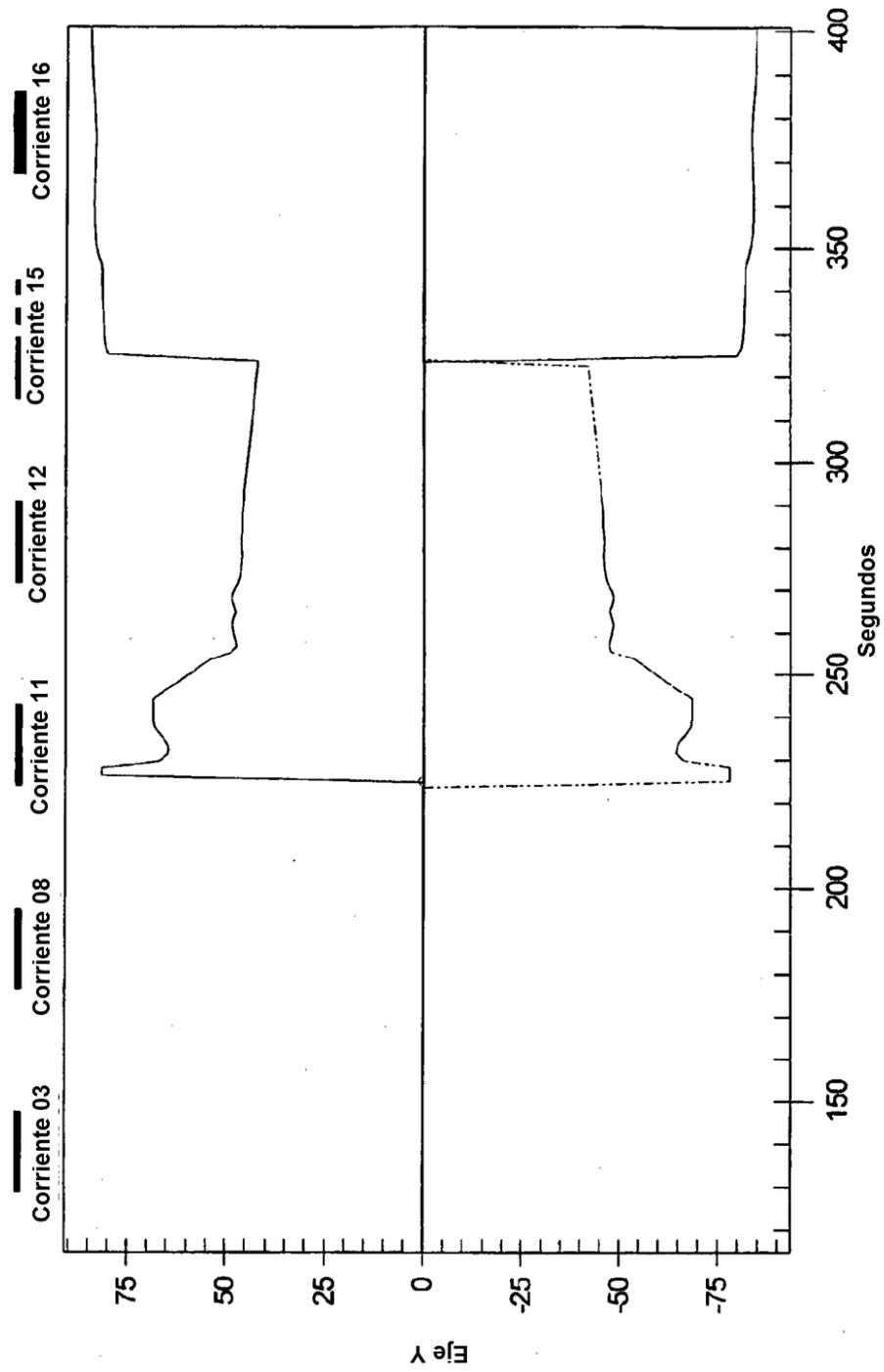


Fig. 1B

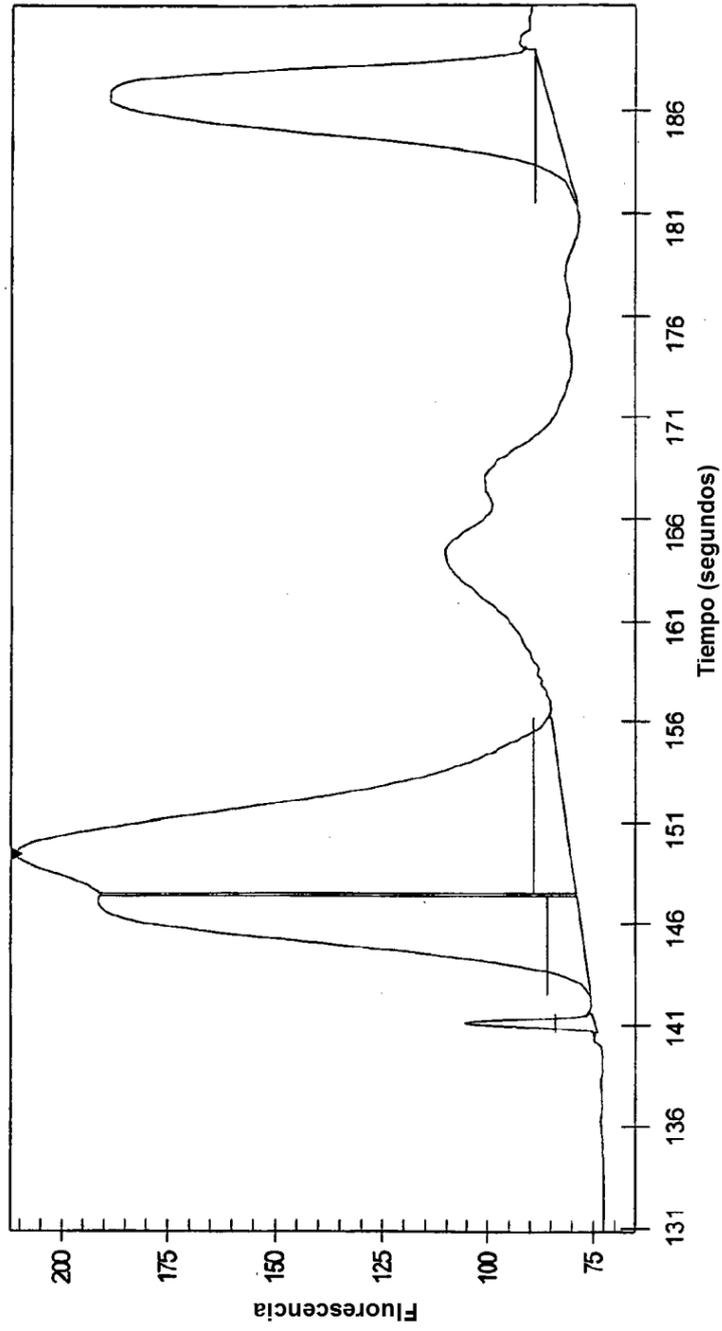


Fig. 2A

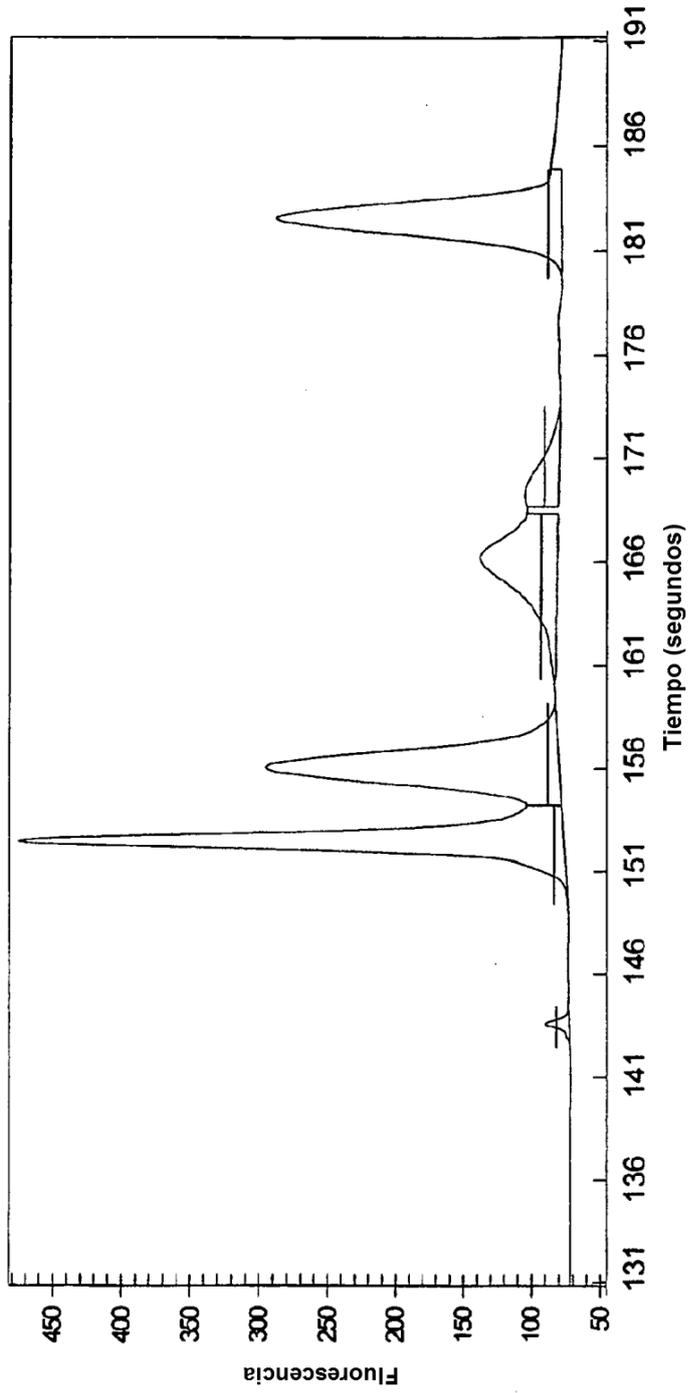


Fig. 2B

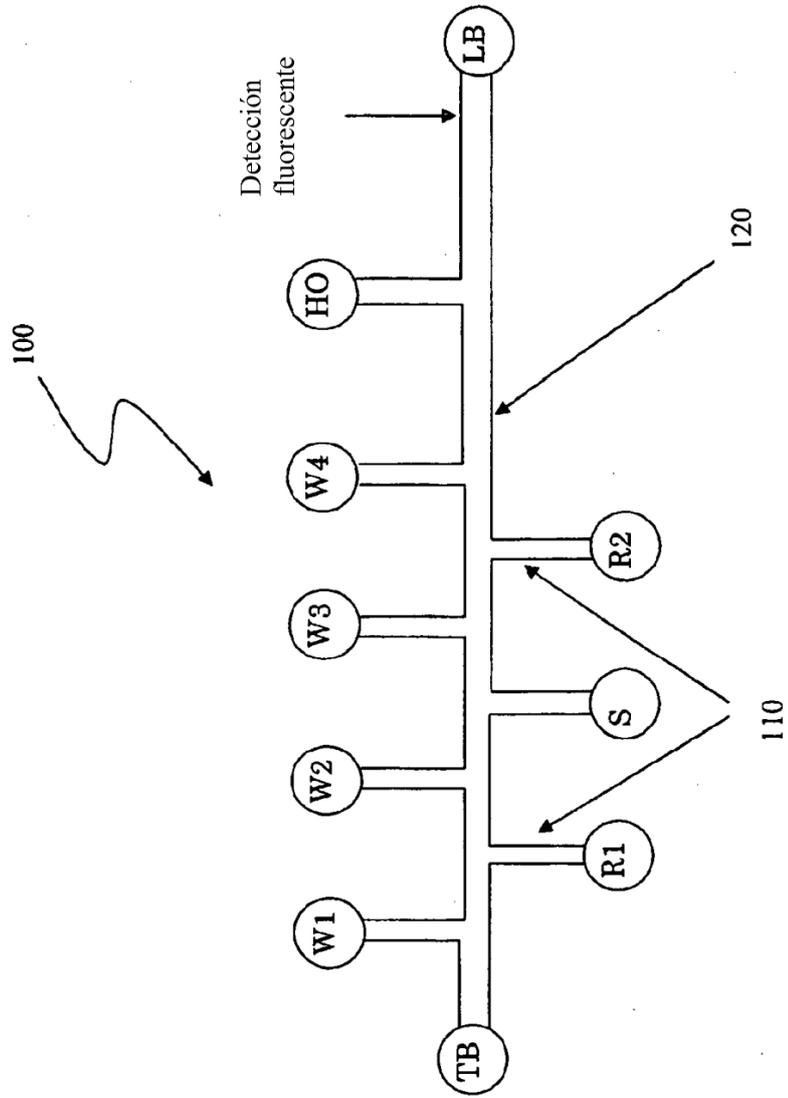


Fig. 3

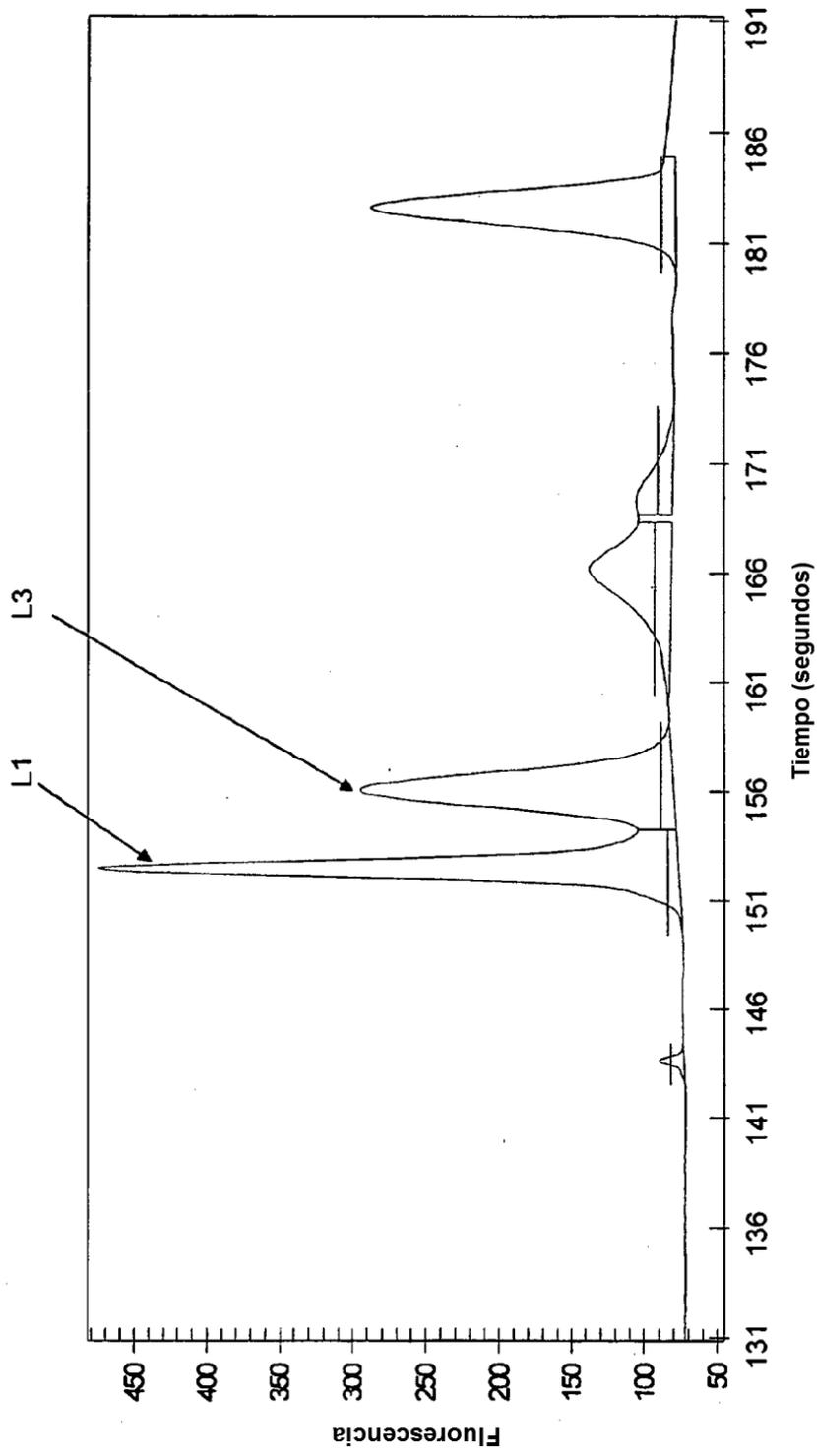


Fig. 4A

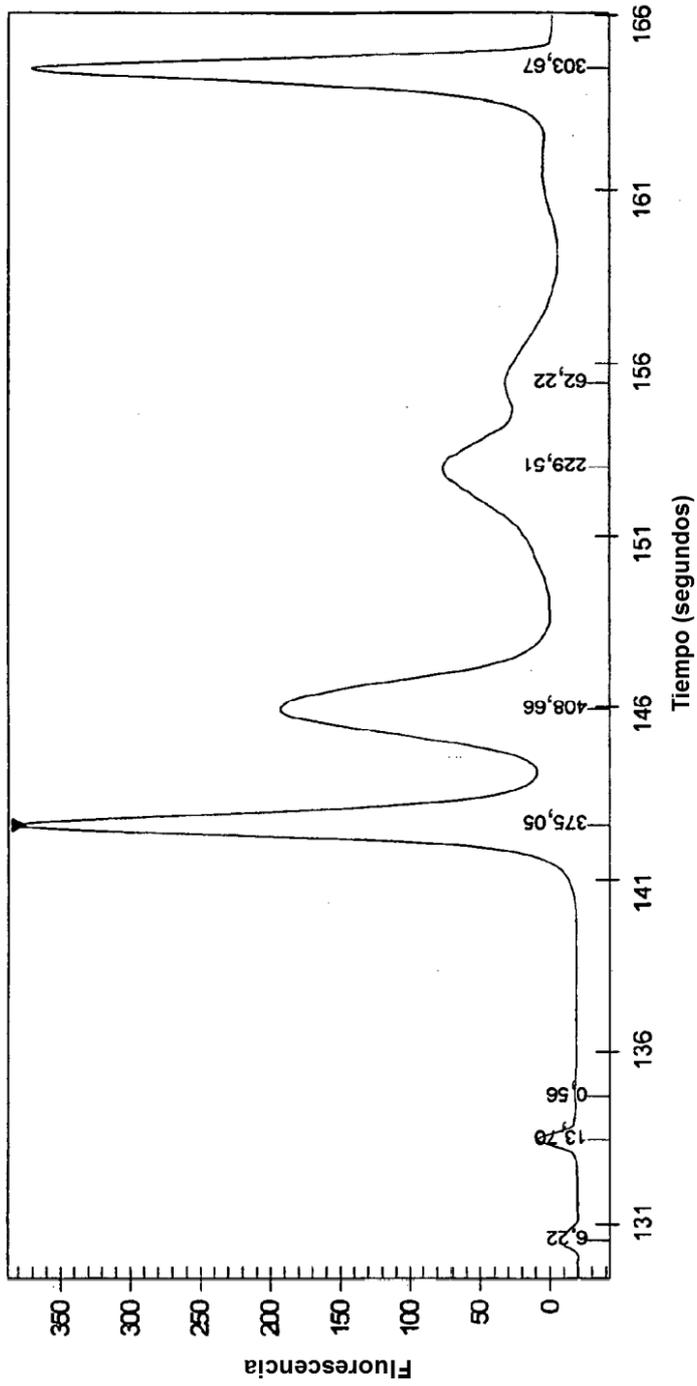


Fig. 4B

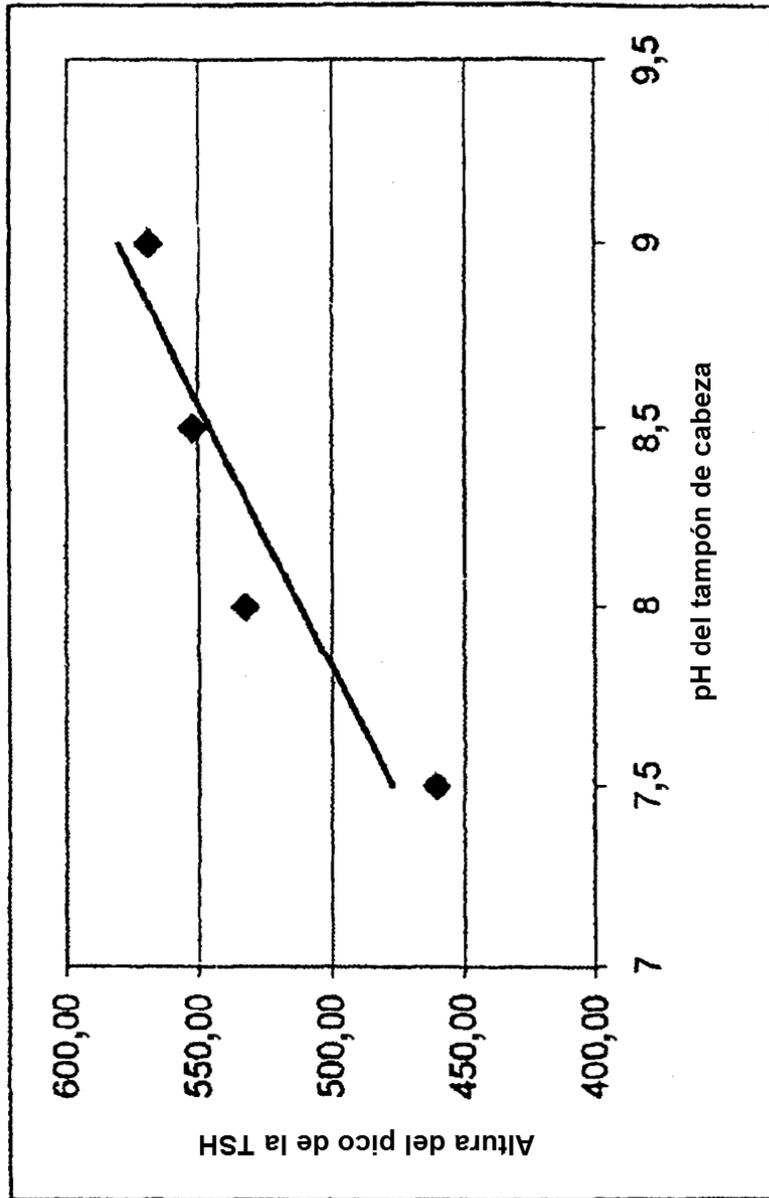


Fig. 5A

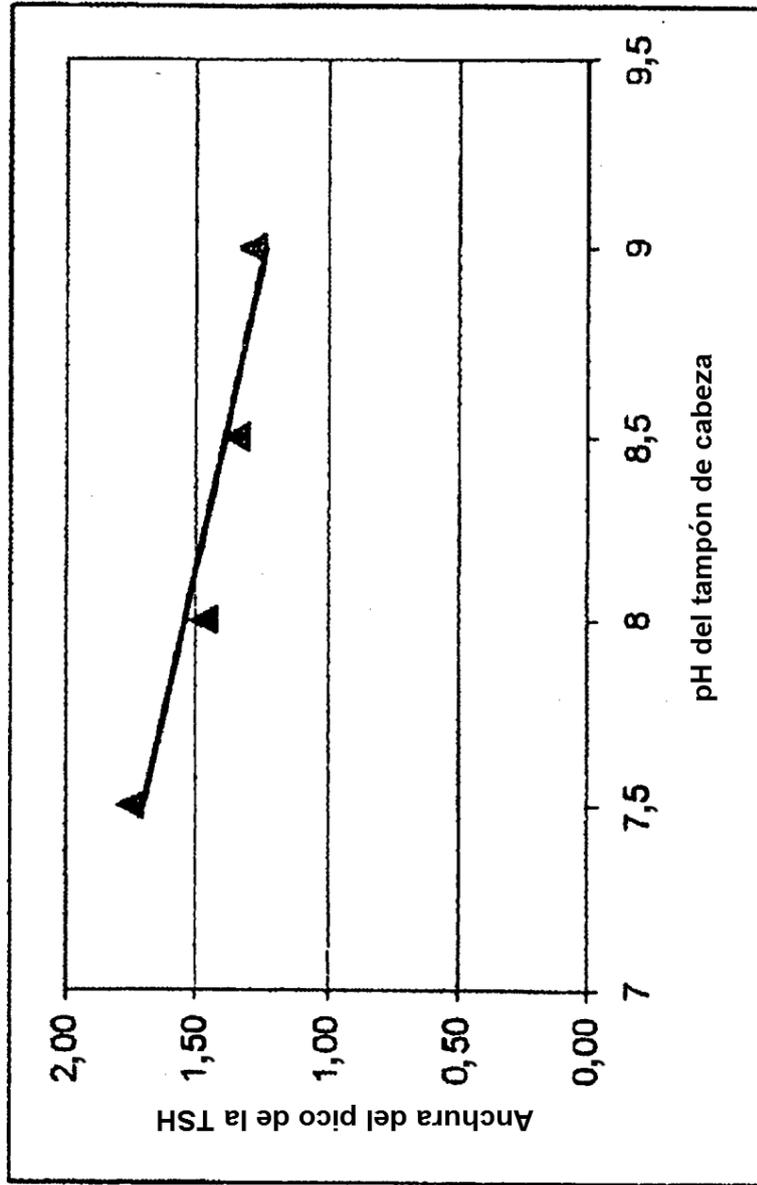


Fig. 5B

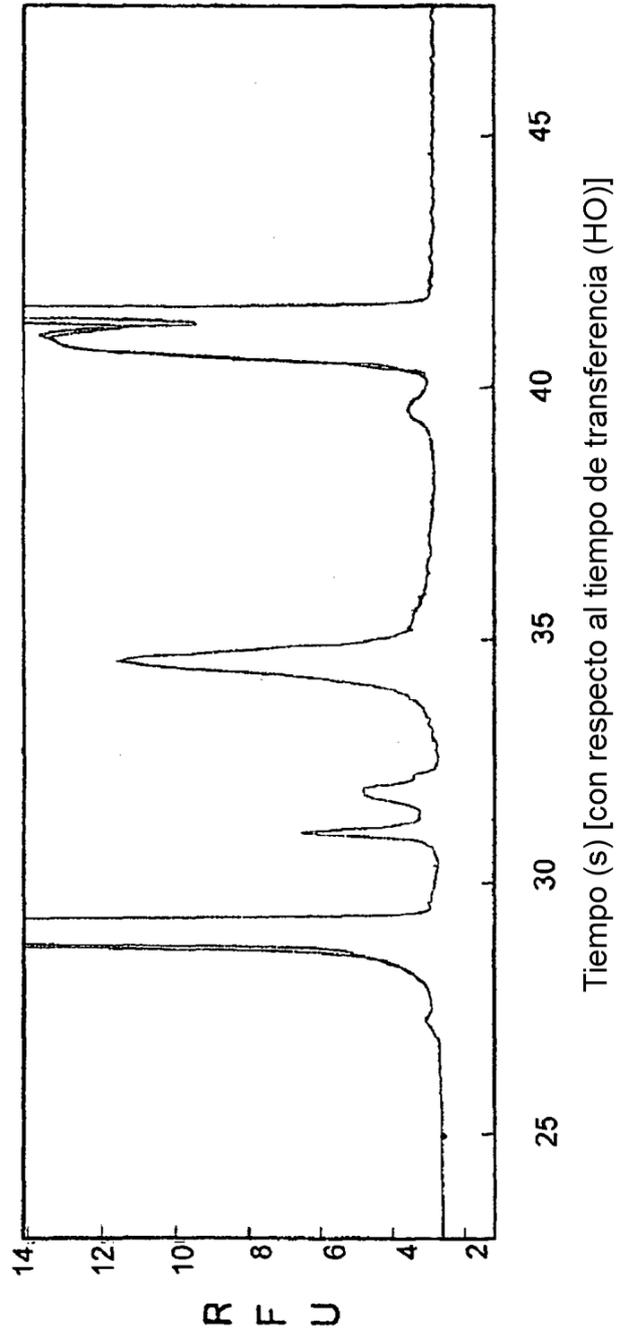


Fig. 6