

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 241**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006 E 06778077 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1910831**

54 Título: **Procedimiento y sistema para determinar la concentración de un complejo de analyte-enzima o conjugado de analyte-enzima, en especial para la detección electroquímica de los analytes**

30 Prioridad:

04.08.2005 DE 102005037436

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

06.03.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
WITTELSBACHERPLATZ 2
80333 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**BARLAG, HEIKE;
MUND, KONRAD y
GUMBRECHT, WALTER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 446 241 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

Procedimiento y sistema para determinar la concentración de un complejo de analyte-enzima o conjugado de analyte-enzima, en especial para la detección electroquímica de los analytes.

5 La invención se refiere a un procedimiento y a un sistema para determinar la concentración de un complejo de analyte-enzima o conjugado de analyte-enzima, en especial para la detección electroquímica de los analytes. En un procedimiento de este tipo se transforma desde la enzima un sustrato mediante escisión hidrolítica en una molécula reporter, cuya concentración o variación de concentración en el electrolito en reposo se determina mediante un procedimiento de medición amperométrico, que se basa en la oxidación y reducción de la molécula reporter en el mismo electrodo de metal noble.

10 Para determinar anticuerpos, antígenos o ADN en sangre, agua, aire o alimentos se usan los llamados biosensores. Se basan en el enlace específico de los analytes con una molécula de captador, es decir, por ejemplo un anticuerpo con un antígeno o una secuencia de ADN con la secuencia de captador ADN complementaria. La comprobación de este acontecimiento de enlace se realiza con frecuencia mediante procedimientos ópticos. Con ello se añaden colorantes fluorescentes, por ejemplo durante un análisis de ADN mediante la PCR en los analytes y, posteriormente, se leen en las posiciones con diferentes secuencias de captador. Estos sistemas ópticos son evidentemente de manipulación cara y compleja. Los aparatos necesarios son sensibles y no adecuados para pruebas de campo.

Una alternativa adecuada son aquí los biosensores

20 electroquímicos. Aquí se realiza la detección mediante la transformación de una sustancia electroquímica. Está muy extendida la detección electroquímica, por ejemplo en los sensores de glucosa. La glucosa se oxida mediante una enzima redox, la glucosa oxidasa, y al mismo tiempo se reduce el oxígeno presente. En perfeccionamientos de estos sensores de glucosa los mediadores sustituyen el oxígeno. Durante la oxidación de la glucosa mediante la enzima redox se reduce al mismo tiempo el mediador, por ejemplo 1,1-dimetil ferrocenos. La oxidación electroquímica del mediador reducido enzimáticamente, para la determinación amperométrica de la concentración de glucosa, puede realizarse aquí con potenciales claramente inferiores, con lo que la medición se hace más precisa y menos propensa a fallos. En este contexto se han desarrollado numerosos procedimientos pulsatorios amperométricos, que no determinan la cantidad total en el mediador redox, sino sólo la parte reducida antes enzimáticamente.

30 Sin embargo, en el caso de la detección electroquímica de acontecimientos de enlace es necesario medir con la mayor sensibilidad posible la cantidad absoluta de una sustancia redox activa. El verdadero marcador para la presencia de los analytes en una posición de sensor es la propia enzima. Durante el análisis de ADN se añade, por ejemplo en la PCR, un marcador de biotina a los analytes. Sobre un biosensor están enlazados en las diferentes posiciones de sensor diferentes secuencias de captador de ADN. El analyte sólo se hibridiza en las secuencias ajustadas y el analyte no enlazado se extrae por lavado. Para reconocer este acontecimiento de enlace se enlaza a continuación con la molécula de marcador de biotina una estreptavidina-enzima, por ejemplo fosfatasa alcalina. Si se adicióna sustrato de enzima, por ejemplo p-aminofenilfosfato, sólo se libera p-aminofenol en las posiciones de sensor en las que se ha enlazado el analyte, mediante la escisión hidrolítica del fosfato.

40 La utilización de p-aminofenilfosfatos como sustrato para la fosfatasa alcalina se presenta en CLIN. CHEM. 36/11, páginas 1941 – 1944 (1990), en donde se describe un inmunoensayo basado en gotas. Si se ha enlazado analyte con el anticuerpo inmovilizado en gotas, se indica también aquí mediante fosfatasa alcalina. Las gotas se incuban mediante p-aminofenilfosfato y después se analiza en la solución sobresaliente el p-aminofenilfosfato en un sistema de análisis de inyección en flujo. Con ello esta solución fluye a través de un sensor electroquímico, cuyo electrodo de trabajo está polarizado constantemente a unos +0,1 V vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl. La medición en el electrolito fluyente o en el volumen de muestra tiene la ventaja de que no tiene lugar empobrecimiento digno de mención del p-aminofenol delante del electrodo. Mediante el flujo se envía más tarde constantemente. Un sistema así evidentemente no tiene capacidad de microsistema. El sensor electroquímico sólo puede leer una muestra a la vez y los volúmenes necesarios son grandes.

50 Siempre que se desee utilizar un conjunto de sensores con diferentes captadores – ya se trate ahora de secuencias de captador de ADN o anticuerpos -, la detección electroquímica debe llevarse a cabo en electrolitos en reposo, para que los sensores detecten sólo la señal de los captadores inmovilizados sobre los mismos. La presencia de la enzima se indica mediante un aumento de la concentración de p-aminofenol. Para esto no son adecuados sensores electroquímicos sencillos, en los que el electrodo de trabajo está situado a un potencial constante. Mediante la transformación que se desarrolla constantemente del producto de enzima éste se consume. Al aumento de la concentración mediante la actividad de enzima se superpone por lo tanto una reducción de la concentración mediante la propia medición.

Para superar este problema se propone en el documento US 6 682 648 B1 el uso de conjuntos de electrodos interdigitales. Cada sensor se compone de dos electrodos interdigitales. Mediante un bipotenciostato se polariza uno de los electrodos positivamente y el otro negativamente. El p-aminofenol se oxida en el primer electrodo y con ello se consume. Si a continuación puede difundirse hacia el segundo electrodo, allí se reduce y la medición vuelve a estar disponible en el primer electrodo.

Sin embargo, la premisa para este último sistema de ciclaje redox es que la separación entre estos electrodos sea muy reducida, para que el transporte mediante difusión de p-aminofenol y el producto de oxidación quinonimina entre los electrodos tenga lugar con la suficiente velocidad, para lo que se hace referencia a la publicación K. Aoki, J. Electroanal. Chem, 270 (1989), página 35. En el documento ya citado US 6 682 648 B1 se propone para esto la utilización de electrodos interdigitales con dimensiones estructurales inferiores a 1 μm . De aquí se obtiene que la fabricación de un conjunto de biosensores con tales electrodos interdigitales es compleja y cara.

Se ofrecen otras indicaciones sobre la medición, en especial en fluidos o también para mediciones bioquímicas, en los documentos DE 43 35 241 A1, DE 41 31 731 A1, DE 197 17 809 U1 y DE 199 17 052 A1. Un procedimiento para la medición electroquímica del ciclaje redox con una disposición de electrodos según la praxis se describe en detalle en el documento WO 01/67587 A1.

Partiendo del último estado de la técnica, la tarea de la invención consiste en proponer un procedimiento o sistema en el que sea posible la determinación de concentraciones de una sustancia redox-activa en concentraciones de μM en conjuntos de electrodos planos con diámetros $\geq 30 \mu\text{m}$, de forma preferida $\geq 50 \mu\text{m}$. Con ello el sistema no debe ser convectivo, es decir ni el electrodo ni la solución deben agitarse o moverse y la frecuencia de medición debe ser $\geq 1 \text{ Hz}$. Aparte de esto debe crearse un dispositivo de medición correspondiente.

La tarea es resuelta conforme a la invención, en un procedimiento de la clase citada al comienzo, mediante las medidas de la reivindicación 1. Un sistema correspondiente se indica en la reivindicación 12. Perfeccionamientos del procedimiento conforme a la invención y del sistema relacionado con ella son objeto de las reivindicaciones subordinadas.

En la invención se propone pulsar el potencial del electrodo de trabajo, lo que ya se ha propuesto en otro contexto. Además de esto, sin embargo, en la presente invención se forman a continuación alternativamente fases de medición así como fases de relajación, en donde las longitudes de pulso de las fases de medición se eligen de tal modo, que hacia el final del pulso la corriente capacitiva es pequeña con relación a la corriente de Faraday, y en donde las longitudes de pulso de las fases de relajación se eligen de tal modo, que hacia el final del pulso el gradiente de concentración está relajado, de tal manera que al principio de la siguiente fase de medición la variación de concentración del producto de enzima redox-activo – causada por el consumo del producto de enzima mediante la propia medición – se anula en una medida máxima. De este modo la corriente medida al final de la fase de medición forma una señal de medición significativa, lo que “a priori” no es de esperar.

Conforme a la invención se produce la medición rápida de la concentración y en especial de la variación de concentración de un producto de enzima, en sistemas de detección molecular-biológicos, mediante la reducción redox electroquímica de la sustancia redox-activa formada enzimáticamente en los electrodos de trabajo anclados sobre una cinta chip en cavernas, mediante una carga pulsatoria cíclica, en donde la corriente medida después de la desactivación del transbordo de la capa doble forma la señal de medición.

La base de la invención es el reconocimiento de que con un procedimiento de medición adecuado para determinar la concentración de una sustancia redox-activa, puede medirse ventajosamente en electrodos con diámetros en un orden de magnitudes de entre algunos cientos de μm y 1 cm. En especial ya no son necesarios electrodos interdigitales estructurados de forma compleja. De aquí en adelante pueden utilizarse en especial también conjuntos de transductores económicos, como los que se describen en detalle por ejemplo en la solicitud de patente alemana no publicada AZ. 10 2004 004 654.9-52 del solicitante.

En el dispositivo de medición correspondiente, que no forma parte de la invención, se simplifica la estructura de medición con relación al ciclaje redox, con la finalidad de que no se necesite ningún bipotenciostato. Es suficiente con un potenciostato sencillo en combinación con un generador de pulsos.

En la invención no se ajusta un estado estacionario – como en el ciclaje redox conocido -, sino que se fuerza electroquímicamente una relajación rápida del gradiente de concentración. Para esto se pulsa el potencial del electrodo de trabajo. Se forma una capa de difusión, cuyo grosor alcanza al final del periodo de medición un valor máximo, que depende de la longitud de la fase de medición. En una medición de corrientes de oxidación se ajusta durante una fase de relajación un potencial de reducción suficiente. Las especies oxidadas durante la fase de medición y situadas todavía delante del electrodo se reducen así de nuevo y el grado de concentración, y de este modo la capa de difusión, se descomponen.

- Por lo tanto, en lugar de establecer grosores de capa de difusión constantes como en el ciclaje redox, en la “amperometría de relajación forzada” conforme a la invención se estructura y se descompone de nuevo en el tiempo la capa de difusión. En ambos casos se ajusta por medio de esto un grosor de capa de difusión limitado al menos en su valor máximo. Si se observara una reducción, entonces es necesario ajustar el potencial de reducción durante la fase de medición y el potencial de oxidación correspondiente durante la fase de relajación.
- 5 Se deducen detalles y ventajas adicionales de la invención de la siguiente descripción de figuras de ejemplos de ejecución, con base en el dibujo, en unión a las reivindicaciones. Aquí muestran
- las figuras 1 a 4, esquemáticamente, la metodología para aclarar la invención,
- 10 la figura 5 una representación gráfica de la amperometría de relajación forzada con curvas características para longitudes de pulso y curvas de concentración y señal correspondientes,
- la figura 6 una representación gráfica de la dependencia entre la concentración relativa y la separación de los electrodos,
- la figura 7 una representación gráfica de la corriente de la concentración y
- la figura 8 una representación gráfica de la pendiente en función del potencial durante la fase de relajación,
- 15 la figura 9 una representación gráfica de la dependencia entre la densidad de corriente y el tiempo,
- la figura 10 una representación correspondiente a la figura 5 para la fase de relajación,
- la figura 11 una representación correspondiente a la figura 5 con comparación entre valores experimentales y calculados,
- la figura 12 una representación gráfica de la dependencia entre la concentración y la separación entre los electrodos,
- 20 la figura 13 un dispositivo de medición para la amperometría de relajación forzada con un conjunto de transductores correspondiente,
- las figuras 14/15 un primer conjunto de transductores para el dispositivo de medición conforme a la figura 9, en una vista desde arriba y desde abajo,
- la figura 16 un segundo conjunto de transductores, basado en silicio, en una vista en planta y
- 25 la figura 17 el desarrollo de una medición normal con una curva de corriente de medición.
- En las figuras 1 a 4 se describe en primer lugar la metodología de la llamada “Forced Relaxation Amperometry (FRA)”. Con ello se parte de la base de que la metodología del ciclaje redox es conocida en sí mismo por el estado de la técnica.
- 30 En la figura 5 se han representado las curvas de señal correspondientes para el método FRA definido con base en las figuras 1 a 4. A continuación se reproducen reflexiones sobre la precisión del nuevo método de medición y por último en la figura 13 se reproduce un dispositivo de medición concreto. Con ello se indica un conjunto de transductores ejemplificativo, cuya estructura se muestra en las figuras 14 y 15. La figura 16 muestra otro conjunto de transductores. La figura 17 reproduce finalmente el comportamiento del procedimiento al utilizarse la disposición como sensor ADN.
- 35 En detalle en las figuras 1 a 4 el símbolo de referencia 1 significa un portador para al menos un electrodo de medición 2, al que está asociada una ruta de corriente 3 para un flujo de electrones, en donde se dispone de un analyte 4. Asimismo se dispone de una enzima 5, cuya concentración representa una medida para la concentración del analyte 4, por medio de que está enlazada con el analyte 4 directa o indirectamente o es desplazada por el analyte 4.
- 40 Para el enlace con el portador 1 se ha indicado en las figuras 3 y 4 un captador 6. El símbolo de referencia 7 caracteriza un sustrato, que es transformado desde la enzima 5 mediante escisión hidrolítica, en donde se obtiene una molécula reporter, que puede transformarse de forma electroquímicamente reversible en las condiciones en las que el sustrato 7 es estable.

La disposición formada por el portador 1 y el electrodo 2 representa un sensor. El electrodo 2 está polarizado mientras dura la fase de medición A, de tal modo que la molécula reporter 8 se oxida o reduce, y está polarizado mientras dura una fase de relajación B, de tal modo que la forma oxidada o reducida de la molécula reporter 8 en el mismo electrodo 2 se reduce u oxida de nuevo. Esto queda claro en las figuras 3 y 4. De este modo la corriente que fluye durante la fase de medición A es una medida de la concentración del sustrato 7 transformado desde la enzima 5.

Es ventajoso que el analyte contenga un elemento de marcaje y que la enzima contenga un elemento de acoplamiento, que se enlace específicamente con el elemento de marcaje del analyte. La enzima puede estar también enlazada directamente con el analyte. Con ello, de forma conocida está enlazada sobre o cerca de un electrodo una molécula de captador, la cual se enlaza específicamente con el analyte.

En la figura 5 se han caracterizado las diferentes fases durante la medición. Cuál es la fase de medición y cuál la fase de relajación depende de si se pretende medir una corriente de oxidación o de reducción. Las longitudes de pulso para oxidación y reducción no es necesario que sean iguales, es decir, los tiempos t_{Ox} y t_{Red} pueden ser diferentes. Tampoco los potenciales φ_{Ox} y φ_{Red} tienen que ser simétricos al potencial redox φ_0 de las especies.

La representación de la figura 5 muestra el posible desarrollo de potencial mediante la utilización de pulsos rectangulares. Con ello los potenciales φ_{Ox} y φ_{RED} y los tiempos Δt_{Ox} y Δt_{RED} con la forma de pulso 11 están aplicados a unidades arbitrarias. La forma de pulso 11 con las longitudes de pulso para oxidación y reducción no es necesario que sea simétrica. También es posible materializar la amperometría de relajación forzada con curvas de tensión triangular o curvas senoidales. En detalle, en la figura 5 la fase de medición está designada con A y la fase de relajación con B. Aparte de la curva de potencial 11 se han representado asimismo una curva 12 para la concentración del

producto de enzima delante del electrodo y además la corriente eléctrica 13 como señal de medición. El valor de corriente predominante para el proceso se presenta por lo tanto en cada caso al final del intervalo de relajación y es una medida para la variación relajada de la concentración.

En las reflexiones adicionales se parte de la base de que se pretende medir la concentración de una molécula presente en su forma reducida. En este caso, durante la fase de medición el potencial se refiere positivamente al potencial redox de las especies. Las máximas corrientes de medición se obtienen cuando el potencial está situado hasta tal punto en positivo, que se ajusta una corriente límite de difusión. La corriente no está limitada después por la cinemática de la reacción redox, sino sólo por la difusión.

El desarrollo en el tiempo del perfil de concentración de las especies reducidas se obtiene de la solución correspondiente de la ley de Fick para la difusión en el semiespacio infinito sencillo, es decir:

$$c(t, x) = c_{\infty} \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right), \quad s \rightarrow \infty \quad (1)$$

Con ello significan:

c: concentración en función del tiempo y del lugar

c_{∞} : concentración en la solución ($x \rightarrow \infty$)

erf: función de error

D: coeficiente de difusión

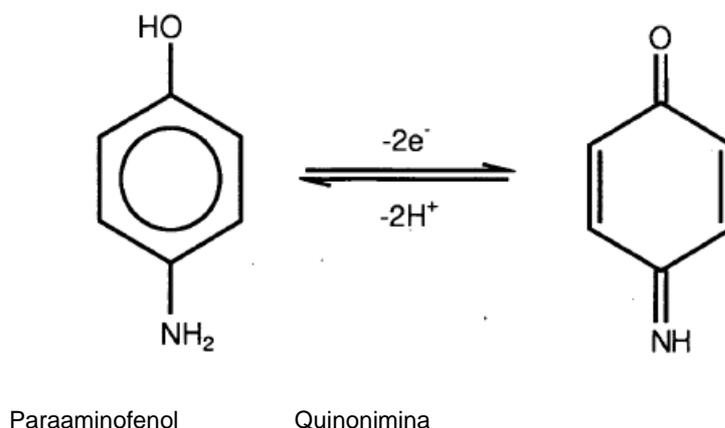
s: extensión del espacio de electrolito delante del electrodo

Puede conseguirse un aumento adicional de la señal de medición mediante una limitación del espacio de electrolito delante del electrodo. La molécula de reporter formada por la enzima difunde sólo en parte hacia el electrodo. La otra parte difunde en el espacio de electrolito alejado del electrodo. Si a continuación el espacio de electrolito se reduce hasta tal punto que es menor que la longitud de difusión durante la fase de medición, tiene lugar todavía durante la fase de medición una saturación del espacio de electrolito con molécula reporter y cada molécula de reporter adicional formada aumenta la concentración delante del electrodo. Esto es aplicable a la concentración total de molécula reporter reducida y oxidada. Sin embargo, debido a que en el caso de un espacio de electrolito muy pequeño se dificulta la ejecución del ensayo bioquímico, de aquí se deduce el requisito de un espacio de electrolito

con altura variable. Sólo al principio de la medición se reduce el espacio de electrolito y con ello aumenta la sensibilidad del sensor.

5 Mediante la reducción del espacio de electrolito se reduce además la cantidad de molécula reporter, que llega mediante difusión desde el espacio de electrolito a través de un sensor hasta el espacio de electrolito a través de un segundo sensor. Por medio de esto se reduce una adulteración de las señales de sensor a causa de sensores adyacentes y se mejora la selectividad del conjunto de sensores.

10 En la figura 6 se muestran dos perfiles de concentración 21 y 22 para una sustancia con el coeficiente de difusión $D = 3,6E-6 \text{ cm}^2/\text{s}$. Esto se corresponde con el coeficiente de difusión del paraaminofenol (pAP), con cuyo ejemplo se pretende demostrar a continuación el modo de funcionamiento de la "amperometría de relajación forzada", para lo que se reproduce seguidamente la transformación química.



15 Después de 0,1 s la capa de difusión tiene un grosor de aproximadamente 25 μm . Después de 0,25 s la extensión de la capa empobrecida con pAP comporta ya 40 μm . Cuanto más gruesa sea esta capa, más tiempo durará la relajación mediante difusión.

20 La figura 7 muestra la densidad de corriente en función de la concentración de pAP en la solución para diferentes secuencias de pulsos, que están caracterizadas mediante las curvas características 31 a 34. La fase de medición es siempre de 0,25 s, la fase de relajación de 0,75 s. La medición de corriente se produce 0,24 s después del inicio de la fase de medición. El potencial de oxidación durante la fase de medición es de +200 mV con relación al potencial redox. El potencial se ha variado durante la fase de relajación. Adopta valores de entre -300 mV y 0 mV con relación al potencial redox. En detalle es:

25	y	en la curva característica 31 en la curva característica 32	-300 mV/200 mV, -200 mV/200 mV,
		en la curva característica 33 en la curva característica 34	-100 mV/200 mV, 0 mV/200 mV,

Con estos parámetros se obtienen diferentes pendientes de la densidad de corriente j en su dependencia funcional de la concentración pAP.

30 La pendiente de la densidad de corriente con la concentración de pAP, es decir la sensibilidad de la medición, aumenta constantemente conforme el potencial se hace más positivo durante la fase de relajación. Una aplicación de la pendiente al potencial de relajación, de forma correspondiente a la figura 8, muestra con la curva característica 41 claramente la acción ventajosa de la amperometría de relajación forzada.

35 Mientras que con un potencial de relajación de 0 V vs. ϕ_0 la pendiente sólo es de 462 Acm/mol, este valor aumenta hasta 864 Acm/mol con -300 mV vs. ϕ_0 . Esta duplicación proviene de la mejor acción del ciclaje redox, porque con un potencial de relajación de -300 mV vs. ϕ_0 la quinonina delante del electrodo se reduce por completo a

paraaminofenol (pAP). Con un potencial de relajación de 0 V vs. ϕ_0 , por el contrario, se ajusta conforme a la ecuación de Nernst directamente delante del electrodo una relación de concentración

paraaminofenol : quinonimina = 1:1.

Por lo tanto la quinonimina sólo se reduce de nuevo parcialmente.

- 5 El aumento de la sensibilidad es tan solo una ventaja, aunque decisiva, de la “amperometría de relajación forzada”. La constancia de la señal de corriente ya durante los primeros segundos de la medición es otra ventaja fundamental.

10 Para determinar la sensibilidad se ha usado la densidad de corriente ajustada después de un tiempo de medición prolongado. Para la medición de actividades de enzima, sin embargo, la medición se realiza por ejemplo de tal modo que la solución todavía se agita o bombea primero. El pAP formado por la enzima se extrae así por lavado y se
ajusta una corriente base constante. Después se para la bomba y se mide durante los primeros segundos la
concentración creciente. Con ello las pendientes normales están dentro de un orden de magnitudes de $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$. Si
a continuación la propia medición conduce a un descenso de la señal, se superponen ambos efectos y se mide una
pendiente demasiado pequeña de la corriente y de este modo una actividad de enzima. Debido a que este descenso
de la corriente depende del consumo de la sustancia aparte de su concentración, este efecto no puede eliminarse
mediante normalizaciones.

20 Experimentos con concentración constante ofrecen información sobre la constancia de señal en el tiempo. La concentración ha sido de $50 \mu\text{M}$ pAP, el potencial durante la fase de medición de +200 mV. La duración de la fase de medición ha sido de 250 ms, en donde la medición de corriente se ha realizado tras 240 ms. El potencial durante la fase de relajación ha sido en un primer experimento 0 V vs. ϕ_0 , en un segundo experimento -300 mV vs. ϕ_0 . La duración de la fase de relajación se ha variado entre 250 ms y 4,75 s.

25 En la figura 9 se reproduce en una representación gráfica la dependencia de la densidad de corriente j del tiempo: se obtienen las curvas características 51 a 54 para diferentes duraciones de fase de relajación Δt_{Red} , y precisamente en detalle entre 0,255 y 4,755. Las corrientes se reducen mucho dentro de los primeros 10 s de la medición. Con una longitud de la fase de relajación de 0,25 s la reducción es de $14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 10 s. Si se aumenta la duración de la fase de relajación a 4,75 s, se reduce el descenso de la señal a $9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 10 s. Cuanto menor sea la duración de la fase de relajación, mayor será este descenso de la señal con el tiempo. Pero incluso con tiempos de relajación largos el descenso de $9 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$ es todavía considerable, con las pendientes que se pretende medir en un orden de magnitudes de $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$ en la aplicación.

30 Si a continuación se reduce el potencial durante la fase de relajación hasta -300 mV, mejora notablemente la constancia de señal. Ésta se obtiene en especial de la figura 6, que muestra una representación correspondiente a la figura 5 con las curvas características 61 a 64 para los mismos parámetros de las fases de relajación Δt_{Red} .

35 Con un tiempo de relajación de 0,25 s el descenso de señal es todavía de $8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 10 s. Con un tiempo de relajación de 0,75 s este valor es todavía de $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 10 s, con 1,75 todavía de $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 10 s y con 4,75 s todavía de $0,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 10 s. Incluso con un tiempo de relajación de 0,75 s, es decir una frecuencia de medición de 1 Hz y un potencial de relajación de -300 mV, el descenso de señal y con ello también el error es ya de tan solo aproximadamente el 1% del valor de medición esperado.

40 Los experimentos muestran la influencia de la duración y del potencial de la fase de relajación en la señal de medición. Los cálculos de simulación pueden ofrecer información adicional sobre la acción de la amperometría de relajación forzada. Con ello se calcula por un lado la densidad de corriente durante el ciclaje redox y, por otro lado, se determina para comparar la densidad de corriente sin ciclaje redox.

45 Para las simulaciones con ciclaje redox se ha supuesto que el espacio de electrolito tiene una densidad de $100 \mu\text{m}$. Tanto el potencial de oxidación como el de reducción se han elegido de tal modo, que la reacción se desarrolla en la región de corriente límite de difusión, es decir las corrientes son máximas. Las longitudes de pulso son de 250 ms con el potencial de oxidación y de 750 ms con el potencial de reducción. Para los cálculos sin ciclaje redox los parámetros eran iguales, hasta el hecho de que durante la fase de relajación no se prefija ningún potencial, y a través de los potencióstatos no puede fluir nada de corriente. Durante este tiempo el sistema está por lo tanto desacoplado electroquímicamente.

50 La comparación de los datos de simulación se realiza con los resultados experimentales para las longitudes de pulso correspondientes y los potenciales $\phi_{\text{Ox}} = +200 \text{ mV}$ y $\phi_{\text{RED}} = -300 \text{ mV}$. Estos límites de potencial se corresponden más certeramente con las prefijaciones para la simulación. Los segmentos de eje y de los datos de simulación se han adaptado a los resultados experimentales.

La figura 1 muestra una buena coincidencia entre experimento y simulación para la amperometría de relajación forzada, en donde 71 presenta los valores medidos y 72 la curva característica calculada. La caída de la densidad de corriente es reducida en estas condiciones con $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en 4 s. Por el contrario, sin “amperometría de relajación forzada” la caída de densidad de corriente durante los primeros 4 s es ya de $12 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, lo que se aclara mediante la curva característica 73. Entremedio están situados los resultados para un procedimiento de medición con potenciostatación durante la fase de relajación a potencial redox, lo que se ha reproducido mediante la curva característica 74.

La mejora de la constancia de señal en el factor 6 puede achacarse directamente a los perfiles de concentración. La siguiente figura muestra los perfiles de concentración calculados de pAP en función de la separación entre los electrodos, como se representan al final de la 5ª fase de relajación.

En la “amperometría de relajación forzada” se reduce de nuevo el producto de oxidación formado previamente durante la fase de relajación. Como consecuencia de ello la concentración de pAP directamente delante del electrodo, al final de la fase de relajación, ha aumentado de nuevo hasta el valor original c_{∞} . Más lejos del electrodo la concentración sólo se ha reducido ligeramente. Por el contrario, sin “amperometría de relajación forzada” la concentración delante del electrodo, justo antes de la siguiente fase de medición, es tan solo del 38%. También más lejos del electrodo la concentración ha descendido claramente.

Esto último se deduce en detalle de la figura 12 con las curvas características 81 y 82: con ello el ejemplo correspondiente a la curva característica 82 para una medición sin ciclaje redox en la práctica se corresponde con la medición de la concentración de una sustancia que, aunque puede oxidarse, sus productos de oxidación no pueden volver a reducirse. Análogo sería también el caso con una sustancia que, aunque esté reducida, sus productos de reducción no podrían volver a oxidarse. En el caso de un sensor bioquímico podría tratarse por ejemplo de naftol, que puede liberarse durante una reacción enzimática al igual que el pAP.

En la figura 13 puede verse en detalle el dispositivo de medición: además de mediante un conjunto de transductores 100, que se describirá con más detalle con base en las figuras 14 y 15, el dispositivo de medición se materializa fundamentalmente mediante un potenciostato adecuado 105 en combinación con un generador de pulsos 106, que entrega opcionalmente pulsos rectangulares, triangulares o senoidales. Mediante dos amplificadores operacionales 107 ó 107', de los que uno está unido a potencial de “tierra” y a una resistencia de medición definida 108, el potenciostato 105 se ha concebido de tal modo que se proporcionan unos potenciales adecuados. Con ello pueden prefijarse la longitud de pulso, la tasa de repetición y el valor del potencial. En especial las longitudes de pulso de las fases de medición y las fases de relajación pueden ajustarse por separado y tener diferente longitud. También los potenciales pueden tener diferentes valores.

Al conjunto de transductores 100 están asociados electrodos aislados, que materializan según lo determinado un electrodo de referencia RE (=reference electrode), un contraelectrodo Ce (=counterelectrode) y al menos un electrodo de medición WE (=working electrode). Estos electrodos están unidos como disposición de tres electrodos a los potenciostatos 105. La señal de los potenciostatos 105 se conecta a una unidad de tratamiento de señal o representada en detalle, con la que se realiza una valoración teniendo en cuenta ejecuciones anteriores para metodología de medición y precisión. En general se obtiene el desarrollo de señal representado en la figura 13 como I_{out} para valoración.

En las figuras 14/16 se ha reproducido el conjunto de transductores 100 formando parte del dispositivo de medición, que es plano y flexible y puede fabricarse de forma especialmente económica. Con ello es fundamental que a partir de ahora con la amperometría de relajación forzada pueda medirse con un conjunto de transductores 100 simplificado. Las figuras 14 y 15 muestran el lado superior y el inferior del conjunto de transductores 100 – compuesto por un sustrato metálico 101 y una capa aislante 102. En el lado superior se han representado por ejemplo depresiones circulares 103, que se designan como cavidades. Las cavidades 103_i se obtienen mediante la estructuración del aislante 102. Sobre la base de las depresiones 103_i está al descubierto el lado superior del sustrato metálico y forma un punto de medición, siempre que esté colocado encima un analyte.

La representación del lado posterior muestra mediante trazos una estructuración y con ello una división del sustrato metálico 101 en partes aisladas entre sí. Cada isla metálica se corresponde con una depresión 103_i en el lado delantero. Mediante puntos se indican los posibles puntos de contacto para una llamada tarjeta de agujas para un contactado eléctrico simplificado de las superficies metálicas. Con ello es fundamental que varias islas metálicas, de forma preferida tres, definan con un analyte un sensor y con los electrodos correspondientes que forman un electrodo de medición WE, un contraelectrodo GE y un electrodo de referencia RE, sean adecuadas para llevar a cabo mediciones electroquímicas.

En otra configuración, sin embargo pueden usarse también conjuntos de transductores en tecnología CMOS, lo que se describe con base en la figura 16:

En la figura 16 están dispuestas sobre la superficie sensible del sensor o portador 1 varias microcavidades 200 para la ejecución de análisis bioquímicos. Están dispuestos $m \times n$ elementos en forma de filas y columnas como conjunto de transductores 200. Con ello es fundamental que puedan realizarse reacciones químicas o mediciones simultáneamente en las cavidades aisladas, sin que al añadir sustratos pueda tener lugar una diafonía de las reacciones formada por una primera cavidad en una segunda cavidad.

En la figura 16 se han aplicado al portador 1 con superficies sensibles o a los elementos sensibles aislados contactos eléctricos discretos. Los contactos forman entradas para el circuito de medición eléctrico. Por ejemplo se dispone de dos entradas de tensión de alimentación V_{dd} , V_{ss} , una entrada GND para potencial de masa, una entrada para una señal de reloj una entrada V_{in} para una tensión de control y una entrada para una señal de reset. Asimismo están integrados sobre el chip 1 un multiplexor 210, un "Gray counter & decoder" 215 y un amplificador 220 mediante técnica de silicio estándar. La señal de medición se detecta en la salida "out", en donde con una disposición de conjunto con varias cavidades como $m \times n$ sensores aislados se obtiene una señal multiplex, que por ejemplo se lee con una frecuencia de 10 kHz.

La señal multiplex entregada en una única línea "out" se compone de una plantilla de valores de tensión discretos, a partir de los cuales se obtienen las señales de sensor aislado mediante un de-multiplexor en un aparato de valoración.

En la figura 16 se utiliza por lo tanto en una disposición de medición alternativa en lugar del conjunto de transductores sin apoyo y flexible, de forma correspondiente a las figuras 13 a 15, un conjunto de transductores en tecnología de película fina sobre un sustrato rígido. Con ello se dispone de electrodos planos, que tienen una extensión que es mayor que la longitud de difusión. Una longitud de difusión normal es para el ejemplo indicado anteriormente de 25 μm , de tal modo que los electrodos planos tienen una extensión $\geq 30 \mu\text{m}$, de forma preferida $\geq 50 \mu\text{m}$.

El sustrato rígido es en especial silicio, que está dotado de forma preferida de una capa aislante.

También con tales transductores, que hacen posible el acceso a la tecnología CMOS durante el tratamiento de señales, puede llevarse a cabo el ciclaje redox conforme a la invención.

Con una disposición conforme a la figura 13 y un conjunto de transductores 100 ó 200, alternativamente conforme a las figuras 14/15 o conforme a la figura 16, se materializa a modo de ejemplo un sensor bioquímico para el análisis de ADN: A modo de ejemplo se usa el conjunto de transductores 100, descrito con base en las figuras 14/15, formado por una capa metálica y una capa aislante unida a la misma con cavidades 3_i. El diámetro de las cavidades 3_i es de 0,8 mm, la profundidad de 90 μm y la distancia entre dos puntos de medición adyacentes de 1 mm. Las superficies de electrodo están cubiertas con una capa de oro de 2,3 μm de grosor.

En el dispositivo así descrito puede variarse la altura del espacio de electrolyte, a través del conjunto de transductores, durante el ensayo. Con ello el espacio de electrolyte puede limitarse a través del conjunto de transductores mediante un material flexible, en donde el material puede presionarse mediante una fuerza que actúa desde arriba en la dirección del conjunto. De este modo el espacio de electrolyte puede reducirse hasta un punto tal, que se impida el transporte de moléculas transporter entre los sensores del conjunto.

En total, para el fin aplicativo anterior la disposición de sensores se compone de este modo de al menos tres, pero ventajosamente también cuatro electrodos. Uno de los electrodos está cubierto después como electrodo de referencia con una capa de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), otro electrodo se utiliza como contraelectrodo CE y los otros dos electrodos se usan como electrodos de medición WE.

Sobre uno de los electrodos de medición se ancla una secuencia de oligonucleótidos sintética de longitud 25, mediante un grupo tiol terminal, sobre la superficie de oro como muestra positiva. El segundo electrodo de medición queda libre como muestra negativa. Después se incuban 15 minutos ambas superficies con una solución de 1 mg albumina de suero bovino por ml y, a continuación, se inserta el conjunto de sensores en un canal de corriente de 100 μm de profundidad. Primero se bombean sobre los electrodos 10 μl de una secuencia objetivo biotinilada en un plazo de unos 5 minutos. Después se añade por encima, después de un paso de lavado, una solución de estreptavidina de fosfatasa alcalina marcada. El lavado se realiza con una solución amortiguada de 100 mM de tris(hidroximetil)aminometano titrado a pH 8 con ácido clorhídrico y 130 mM de NaCl. Después de un reiterado lavado se bombea sobre el conjunto de sensores una solución de 2 mM del sustrato de enzima paraaminofenilfosfato (pAPP) en la solución amortiguada. En caso de presencia de la enzima fosfatasa alcalina, el sustrato de enzima pAPP se transforma en paraaminofenol (pAP).

Para medir están conectados a un potencióstato el electrodo de referencia RE, el contraelectrodo CE y en cada caso uno de los electrodos de medición WE, en cada caso en una disposición de tres electrodos. La medición se realiza mediante "amperometría de relajación forzada". Durante la fase de medición el paraaminofenol formado por la

enzima se oxida para obtener quinonina. El potencial de oxidación φ_{Ox} es de +200 mV vs. φ_0 . En la fase de relajación la quinonina formada se reduce de nuevo a paraaminofenol y precisamente con $\varphi_{Red} = -200$ mV. La longitud de pulso de la fase de medición es de 250 ms, y la de la fase de relajación de 750 ms. La medición de corriente se realiza 240 ms después del inicio de la fase de medición.

5 Al inicio de la medición la muestra positiva, es decir el electrodo, está conectada(o) a la secuencia de captador. La solución con el sustrato de enzima fluye – impulsada por una bomba – en primer lugar sobre la muestra negativa y después sobre la muestra positiva. Mediante el movimiento de flujo se extrae por lavado de los electrodos el pAP formado por la enzima, de tal modo que con la bomba conectada la corriente es constante y reducida. Si a continuación se para la bomba, aumenta con el tiempo la concentración de pAP mediante la actividad enzimática. En la medición esto destaca por un fuerte ascenso de la señal de corriente con 20 nA/s. Si se conecta de nuevo la bomba, la señal desciende de nuevo hasta el valor original. Este proceso puede repetirse todas las veces que se quiera.

15 La figura 17 muestra el desarrollo en el tiempo de la corriente con la bomba en “on/stopp”, en la disposición de sensores descrita, con muestra positiva y negativa: La curva característica 121 muestra el desarrollo de la corriente de bomba. Se obtiene para el experimento un desarrollo específico con picos aislados, en donde el parámetro es por un lado la activación de la bomba (“stopp”/“on”) y la conmutación de los electrodos de medición, por otro lado. Aquí primero desciende la corriente al parar la bomba, después permanece constante durante un breve periodo de tiempo y después aumenta lentamente. La región de medición afectada se ha situado en cada caso con razos. A $t = 400$ s se ha conmutado a la muestra negativa. Aquí desciende primero la corriente al parar la bomba, después permanece constante durante un breve tiempo y después asciende lentamente. Este aumento es causado por la difusión de pAP desde la muestra positiva a la negativa. Con la bomba en “on” se añade una corriente de pico, ya que el electrolyte fluye primero desde la muestra positiva a la negativa y, de este modo, transporta una mayor concentración de pAP al electrodo adyacente. En total es muy buena la discriminación entre muestra positiva y negativa.

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección electroquímica de un analyte, con las siguientes medidas:
 - se utiliza una enzima, cuya concentración representa una medida para la concentración del analyte, por medio de que está enlazada con el analyte directa o indirectamente o es desplazada por el analyte;
 - 5 - se utiliza un sustrato, que se transforma desde la enzima mediante escisión hidrolítica, en donde se obtiene una molécula reporter, que en ciertas condiciones puede transformarse electroquímicamente de forma reversible, en donde el sustrato es estable;
 - se utiliza un sensor con al menos un electrodo, en donde el electrodo está polarizado mientras dura una fase de medición (A), de tal modo que la molécula reporter se oxida o reduce, y en donde el electrodo está polarizado mientras dura una fase de relajación (B), de tal modo que la forma oxidada o reducida de la molécula reporter en el mismo electrodo 2 se reduce u oxida de nuevo;
 - 10 - la corriente circulante durante la fase de medición (A) se detecta como medida para la concentración del sustrato transformado desde la enzima.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza un analyte con un elemento de marcaje.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza una enzima con un elemento de acoplamiento, el cual se enlaza específicamente con el elemento de marcaje del analyte.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la enzima está enlazada con el analyte.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque está inmovilizada sobre o cerca de un electrodo una molécula de captador, la cual se enlaza específicamente con el analyte.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque hacia el final de la fase de medición (A) la corriente capacitiva es pequeña con relación a la corriente de Faraday.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque hacia el final de la fase de relajación (B) se reducen en gran medida de nuevo las moléculas reporter oxidadas durante la fase de medición (A).
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque hacia el final de la fase de relajación (B) se oxidan en gran medida de nuevo las moléculas reporter reducidas durante la fase de medición (A).
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque los potenciales se eligen de tal modo, que las reacciones de reducción y oxidación de la molécula reporter se desarrollan en la región de corriente límite de difusión.
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la tasa de repetición para la fase de medición (A) es de al menos 0,5 Hz.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la reducción o la oxidación de la molécula reporter durante la fase de relajación (B) se realiza por completo.
- 35 12. Sistema para la detección electroquímica de un analyte conforme al procedimiento según la reivindicación 1, con
 - una enzima (5), cuya concentración representa una medida para la concentración del analyte (4),
 - un sustrato (7), que se transforma desde la enzima (5) mediante escisión hidrolítica,
 - una molécula reporter (8, 8'), que en las condiciones en las que el sustrato (7) es estable, puede transformarse electroquímicamente de forma reversible, y
 - 40 - un sensor (1) con al menos un electrodo (2), que está configurado de tal modo que está polarizado mientras dura una fase de medición (A), de tal modo que la molécula reporter (8, 8') se oxida o reduce, y está polarizado mientras dura una fase de relajación (B), de tal modo que la forma oxidada o reducida de la

molécula reporter en el mismo electrodo (2) se reduce u oxida de nuevo, en donde la corriente circulante durante la fase de medición (A) es una medida para la concentración del sustrato transformado desde la enzima (5).

- 5
13. Sistema según la reivindicación 12, caracterizado porque la enzima (5) contiene un elemento de acoplamiento, el cual se enlaza específicamente con el elemento de marcaje del analyte (5).
 14. Sistema según la reivindicación 12, caracterizado porque la enzima (5) puede enlazarse con el analyte (4).
 15. Sistema según la reivindicación 12, caracterizado porque está inmovilizada sobre o cerca de un electrodo una molécula de captador (4), la cual puede enlazarse específicamente con el analyte (4).

FIG 1

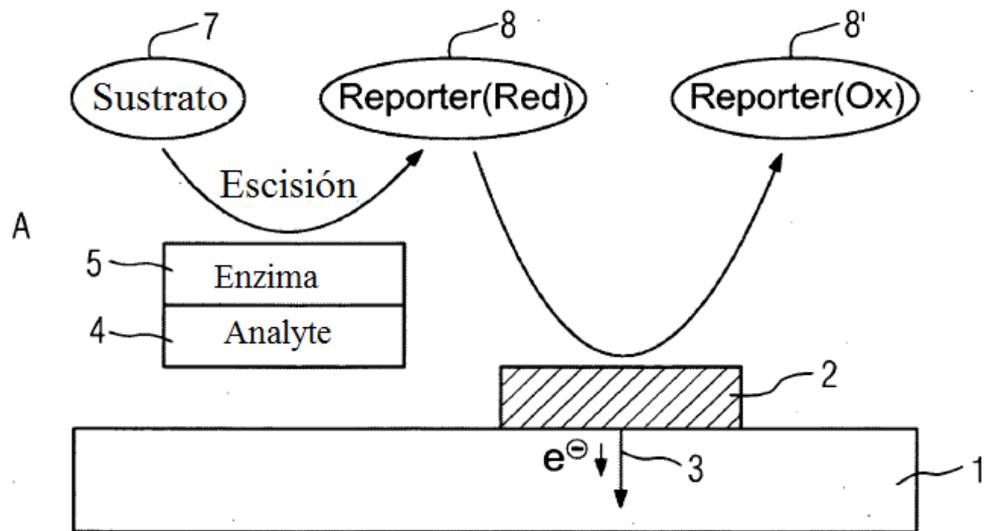


FIG 2

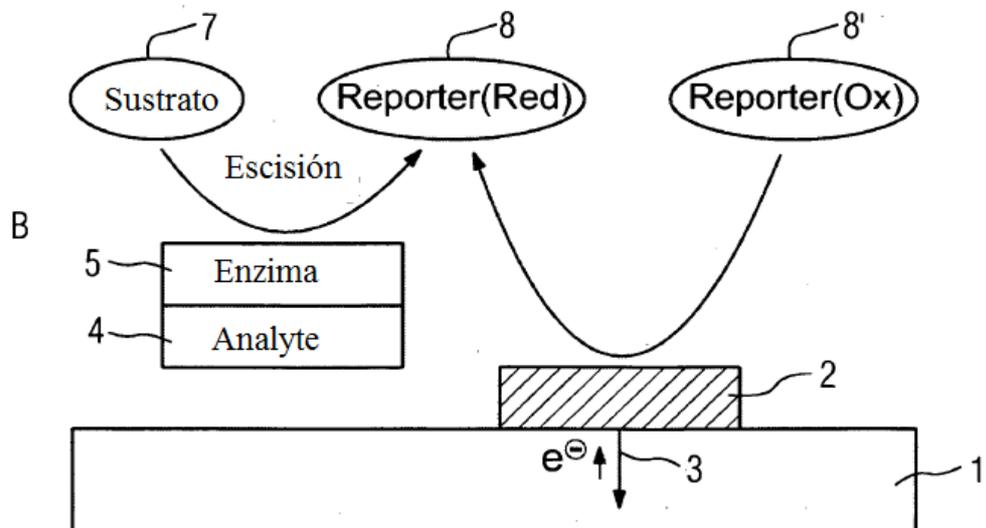


FIG 3

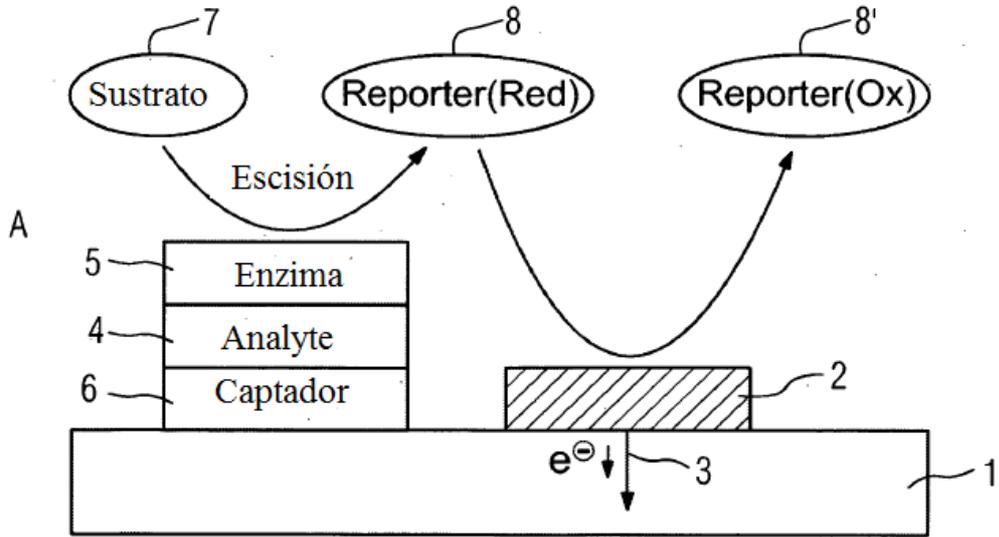


FIG 4

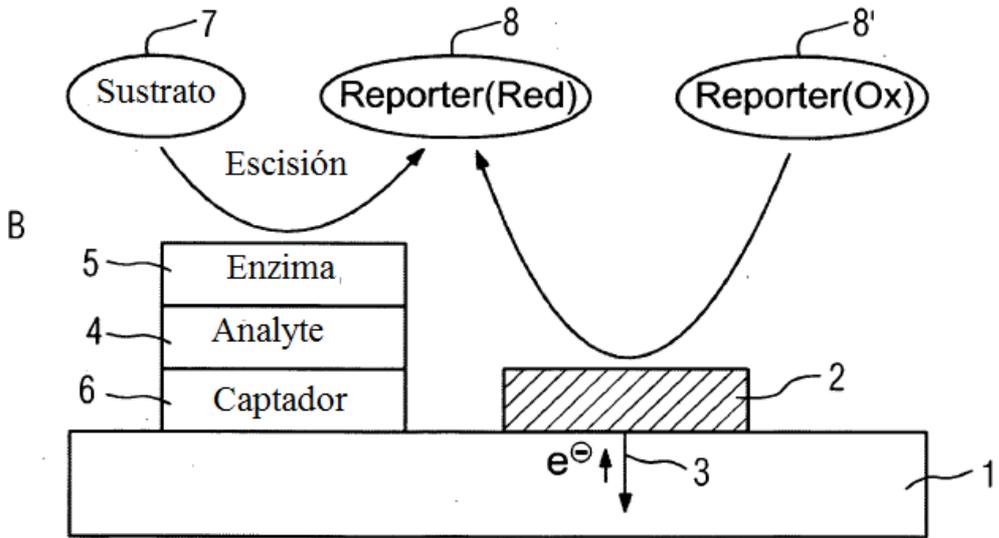


FIG 5

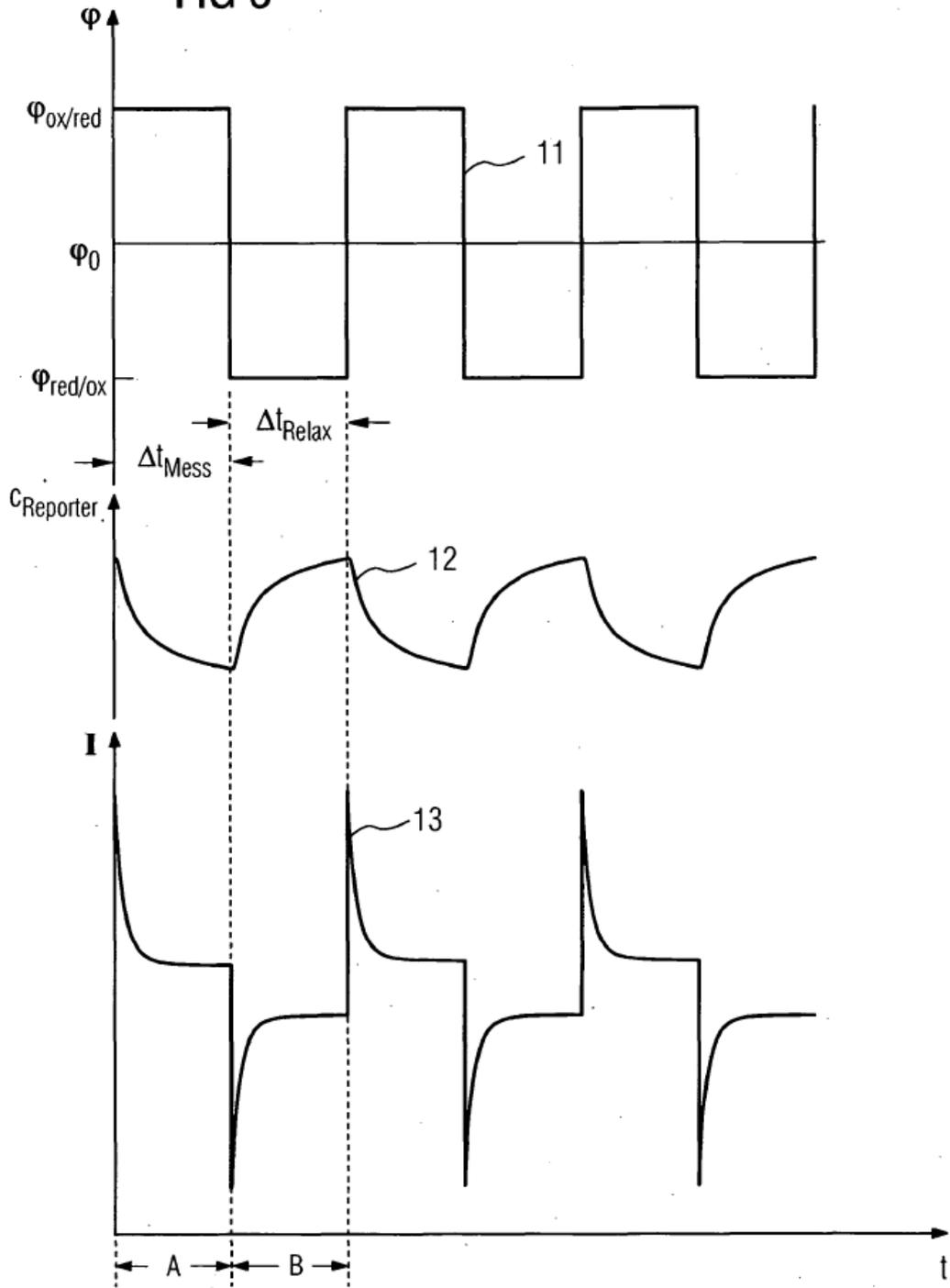


FIG 6

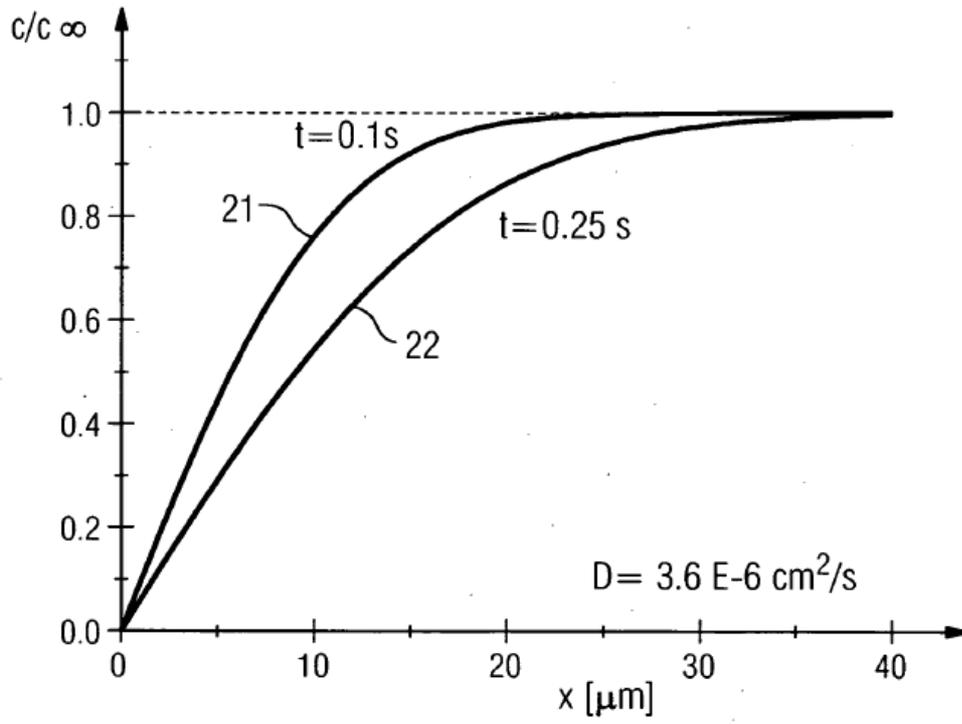


FIG 7

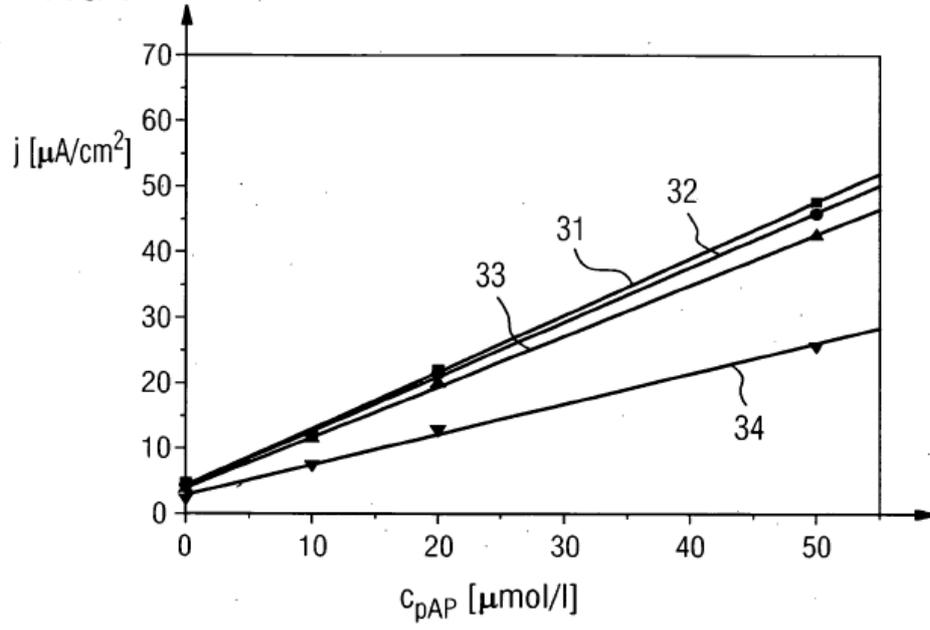


FIG 8

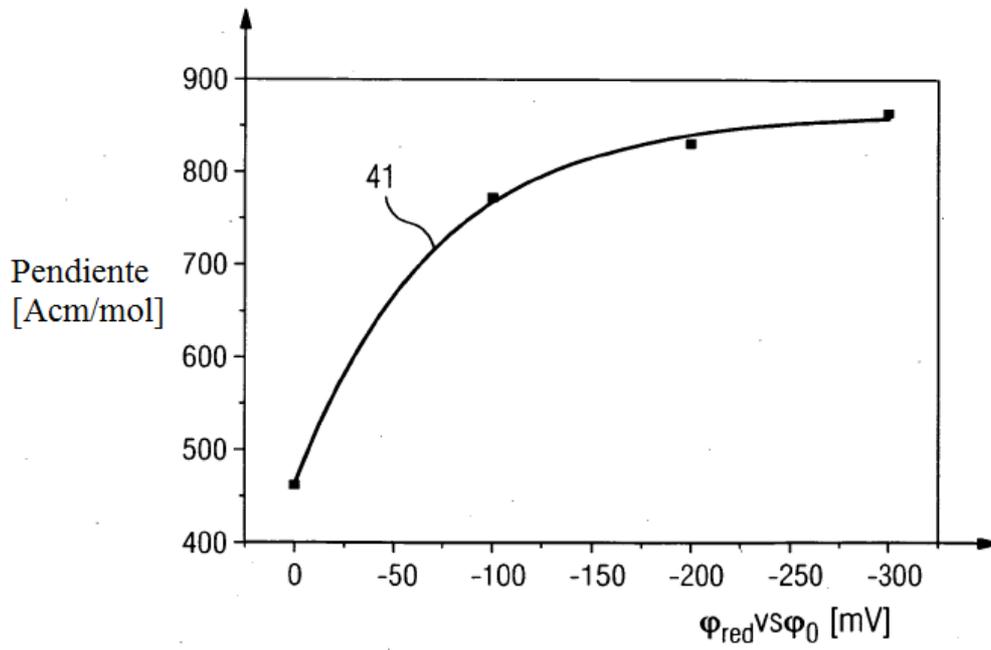


FIG 9

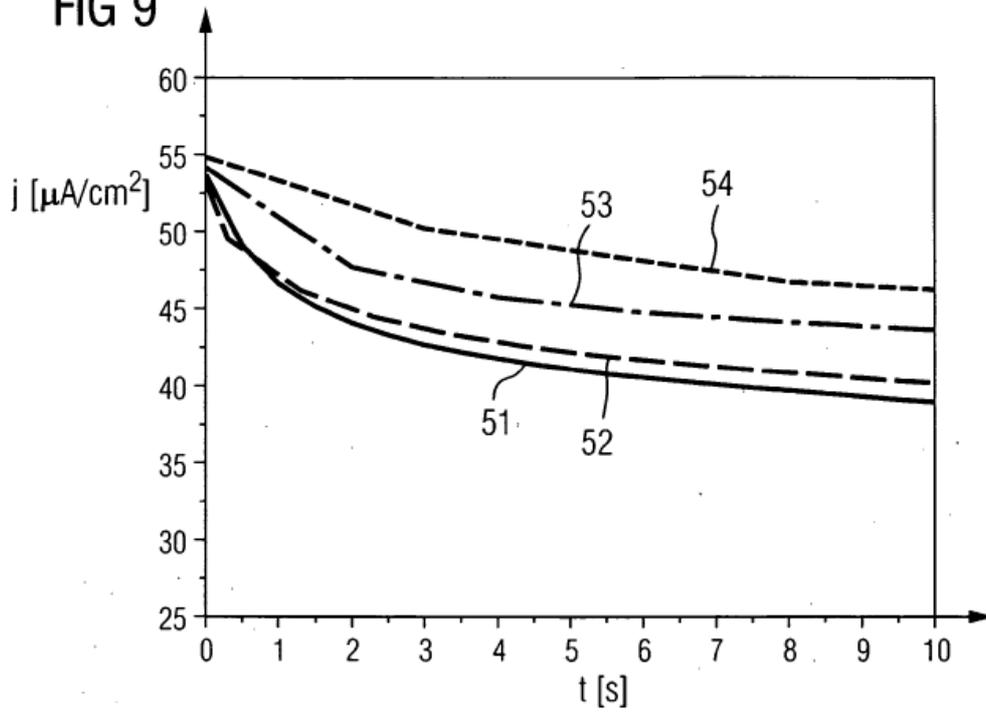
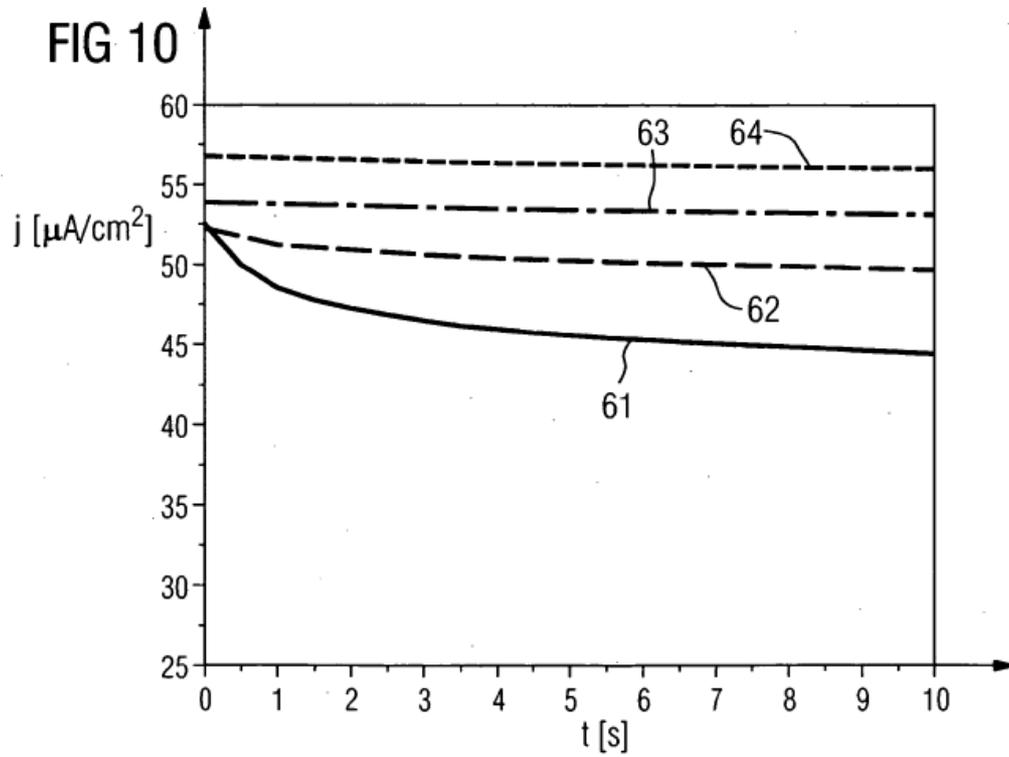


FIG 10



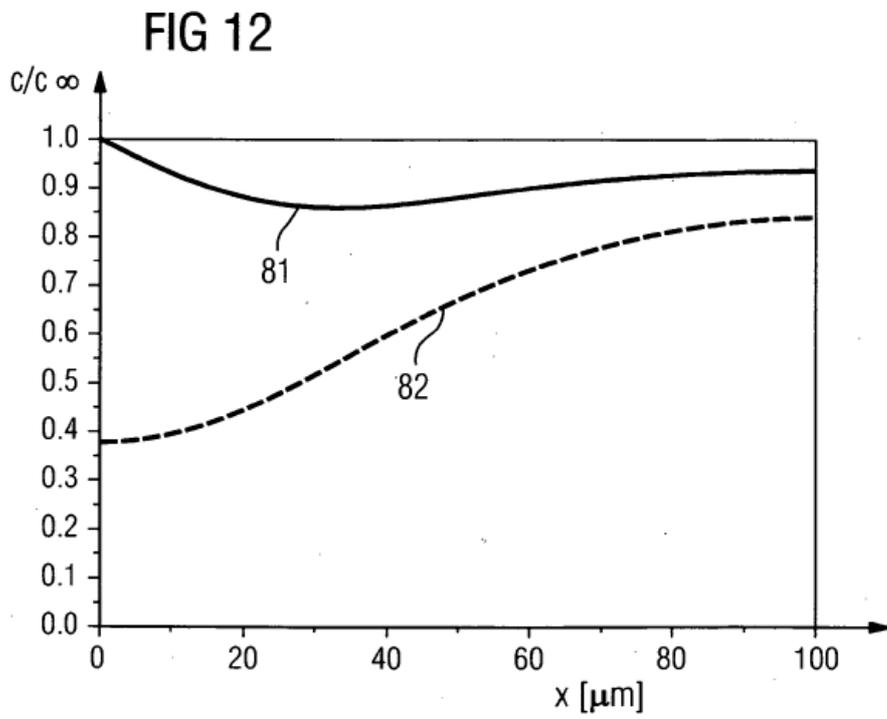
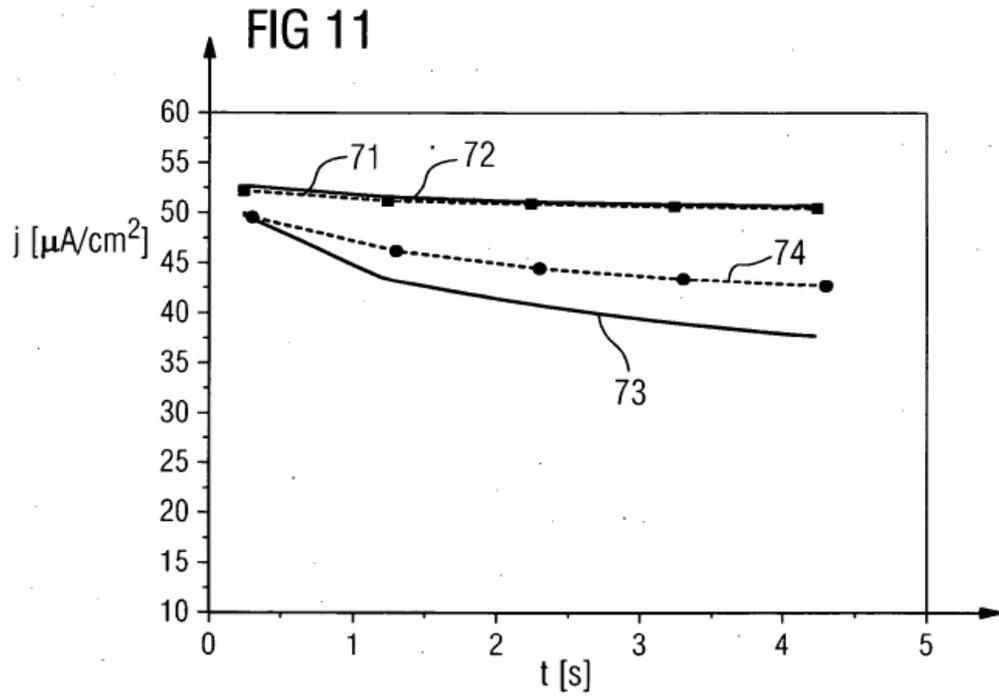


FIG 13

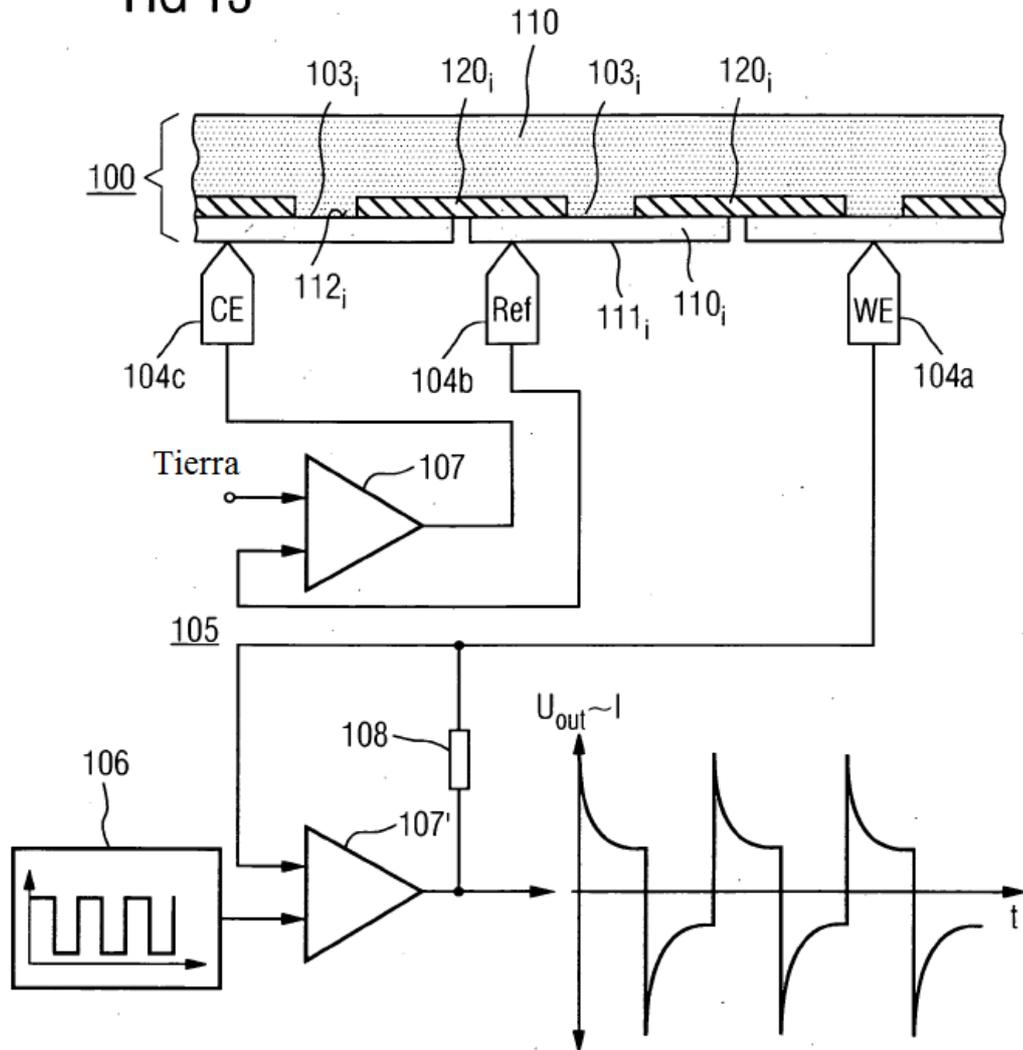


FIG 14

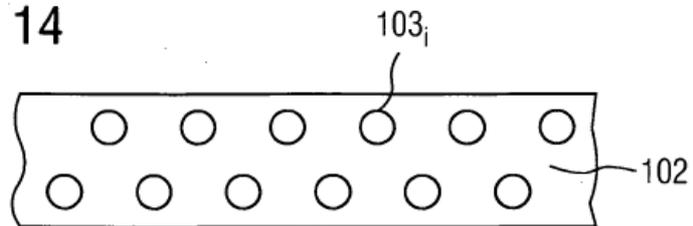


FIG 15

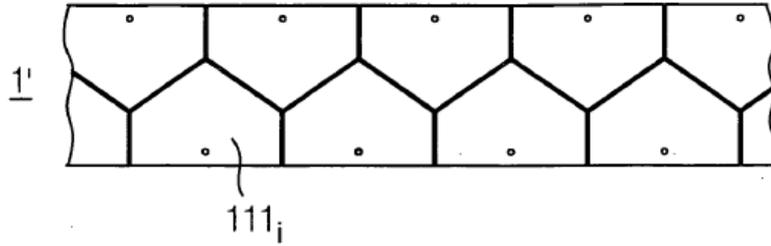


FIG 16

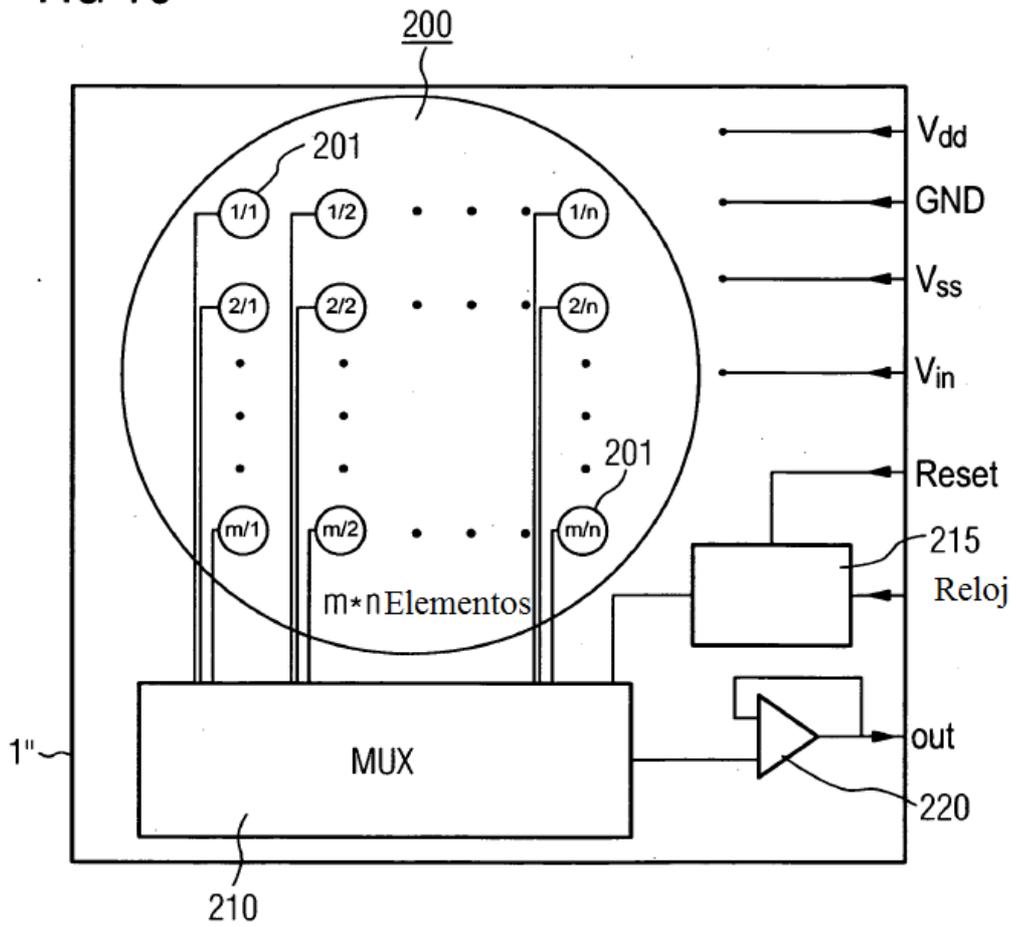


FIG 17

