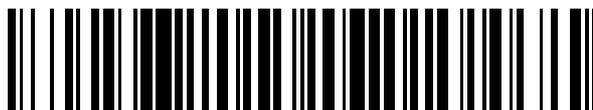


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 129**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 21/66** (2006.01)

**G01N 21/84** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2006 E 06725861 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 1864117**

54 Título: **Dispositivo de película porosa/aislante/conductor y método analítico basado en electroquimiluminiscencia asociado**

30 Prioridad:

**30.03.2005 FI 20050331**

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

**02.02.2016**

73 Titular/es:

**LABMASTER LTD (100.0%)  
FISKARSINKATU 11  
20750 TURKU, FI**

72 Inventor/es:

**MÄKINEN, PIIA, KAARINA;  
KULMALA, SAKARI, MIKAEL;  
KORPELA, TIMO, KALEVI;  
ESKOLA, JARKKO, UOLEVI y  
ALA-KLEME, TIMO, VÄINÖ, KALEVI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 558 129 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**

Dispositivo de película porosa/aislante/conductor y método analítico basado en electroquimiluminiscencia asociado

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a métodos analíticos y dispositivos que explotan el fenómeno de la electroquimiluminiscencia. La invención es especialmente apropiada para el diagnóstico clínico rápido cuantitativo.

**Antecedentes de la invención**

10 En la actualidad, hay una necesidad de fondo general de tecnologías de diagnóstico rápido, sensible y cuantitativo. Tales son adecuadas para amplias áreas del mercado, que incluyen la salud pública, la investigación, la agricultura, el cuidado del medio ambiente, la medicina veterinaria, y ciertas áreas de producción industrial. La sensibilidad, mejorada, velocidad, robustez, estabilidad, y disminución del coste por análisis son factores, que después de haberse logrado en tecnologías de diagnóstico, pueden encontrar aplicaciones en bastante nuevas áreas.

15 Se puede obtener muy alta sensibilidad con ciertos instrumentos de diagnóstico, pero son demasiado caros. Por otra parte, ciertos métodos pueden ser suficientemente baratos, ejemplificados por la inmunocromatografía, pero no son aplicables a ciertas necesidades del mercado. Cualquier tecnología, en la que se cumplan un conjunto de tales demandas, tendrá un lugar importante en los diagnósticos futuros y un enorme potencial de mercado.

20 Hay varios principios analíticos diferentes en el uso práctico en diagnóstico: por ejemplo, ensayos basados en radiactividad, ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA), ensayos colorimétricos y ensayos basados en fluorescencia, y quimiluminiscencia que incluye electroquimiluminiscencia (ECL) anódica, así como de electrones calientes inducidos (catódica). La ECL inducida por electrones calientes se describe con detalle en la patente US 6251690, Kulmala S., et al.. Cada una de estas técnicas tiene su papel con respecto al conjunto de sensibilidad, robustez, estabilidad, velocidad, y precio. Las diferencias entre las técnicas reflejan la función de las limitaciones físicas o ventajas de los métodos. Por ejemplo, un inconveniente de la aplicación basada en compuesto radiactivo es el decaimiento de marcador en un período de tiempo y el coste extra de los residuos radiactivos desde el punto de vista tanto de seguridad como medioambiental. La aplicación de los ensayos más sensibles en el diagnóstico está limitada por la complicada naturaleza de los ensayos e instrumentos, y sólo los expertos pueden realizar los ensayos. La complejidad del ensayo generalmente es directamente proporcional al precio del instrumento y/o el ensayo. En el contexto de los instrumentos complejos, se podrían mencionar las técnicas de electroquimiluminiscencia anódica que ahora se están volviendo cada vez más populares: el instrumento es un complicado robot de laboratorio, cuyo manejo necesita experiencia y en el que el procedimiento de medida implica lavados y etapas de preparación repetidas. Son factores que incrementan el coste de los análisis, así como incrementan la cantidad de residuos y, por lo tanto, hará este método imposible para las necesidades de pequeños laboratorios, consultorios médicos, etc. (analíticas clínicas o de diagnóstico inmediato).

35 Los métodos comercialmente beneficiosos se basan en el principio de que las sustancias a analizar se identifican y miden en mezclas por medio de las llamadas sustancias marcadoras. En las medidas basadas en las propiedades únicas de las moléculas biológicas, como en ensayos inmunoquímicos, el analito a medir (X) se puede sorber selectivamente de una mezcla de moléculas a anticuerpos unidos a una fase sólida y a continuación las moléculas unidas se miden con otro anticuerpo marcado que se une selectivamente a (X). Las sustancias marcadoras pueden ser isótopos radiactivos, enzimas, absorbentes de luz, moléculas fluorescentes o fosforescentes, ciertos quelatos metálicos, etc., que están unidos covalentemente al anticuerpo. Alternativamente, el (X) purificado se puede marcar y la cantidad de muestra no marcada desconocida (X) se puede medir mediante una reacción de competencia. Los ensayos para ADN y ARN pueden también estar basados en la unión selectiva (bioafinidad). También muchos otros análisis químicos y bioquímicos se pueden llevar a cabo por los mismos principios. Para disminuir el coste y/o incrementar la precisión de la medida, hay actualmente una tendencia a medir varios parámetros diferentes al mismo tiempo en la muestra. Una posibilidad es usar marcadores que fluorescen o fosforescen (iluminan) a diferentes longitudes de onda o que poseen diferentes tiempos de fluorescencia. Diferentes principios y estrategias de medida, que se pueden usar en inmunodiagnóstico, se han descrito en el libro *The Immunoassay Handbook*, Editado por David Wild, Stockton Press Ltd., Nueva York, 1994, en las páginas 1-618.

50 Se sabe en la técnica anterior que las sustancias orgánicas y quelatos metálicos son beneficiosos como sustancias marcadoras y que pueden ser excitadas por la luz o electroquímicamente para producir luminiscencia específica del marcador. Estos métodos son particularmente sensibles y son muy apropiados. Sin embargo, debido a que las concentraciones medidas son extremadamente bajas, también hay dificultades dependientes de cada caso; el uso de la fluorescencia puede ser perturbado, entre otras cosas, por dispersión Tyndall, Rayleigh y Raman. Cuando se miden sustancias biológicas, hay, casi sin excepción, después del pulso de excitación, una fluorescencia base alta de descarga rápida. La fosforescencia en fase de disolución se puede usar principalmente sólo con quelatos entre iones de lantánidos y moléculas orgánicas especialmente sintetizadas. El inconveniente de las técnicas de excitación con los marcadores fotoluminiscentes es la complejidad de los instrumentos y el alto precio de los componentes ópticos sensibles.

En general, la ventaja de la ECL es el bajo precio de los componentes de excitación eléctrica y óptica más simple.

En comparación con la fotoluminiscencia, se pueden evitar varios inconvenientes. La electroquimiluminiscencia anódica tradicional con electrodos metálicos inertes se puede llevar a cabo con luminóforos orgánicos por medio de un instrumento relativamente simple en disolventes no acuosos. Sin embargo, en ensayos de bioafinidad, en los que se concentran las mayores expectativas comerciales, se aplican disoluciones acuosas. Las muestras biológicas se toman casi siempre en disoluciones no orgánicas y por lo tanto el sistema de medida debe trabajar en disoluciones acuosas o por lo menos en disoluciones de agua micelar. Sólo un número muy limitado de quelatos de metales de transición están funcionando como marcadores de ECL en ECL anódica en agua o disoluciones micelares.

Hasta ahora, la aplicación química analítica comercialmente más importante de la ECL anódica es el método que usa de derivados de quelato de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ , en el que la fase de detección del marcador ocurre en la fase micelar. Como se sabe por los libros de texto, las mezclas micelares son siempre propensas a diferentes efectos perturbadores debido a la complejidad incontrolada de los equilibrios micelares. De este modo, la ECL inducida por electrones calientes, que no depende de las micelas tiene muchas ventajas cruciales sobre la ECL anódica. Se puede aplicar tanto a inmuno-métodos como a métodos de hibridación de ADN (véase, Blackburn, G., et al, 1991, Clin. Chem. 37: 1534-1539; Kenten, J., et al 1992, Clin. Chem. 33: 873-879). Los inmunoensayos y las aplicaciones de sonda de ADN o ARN por Roche Diagnostics Ltd. explotan partículas magnéticas por medio de las que la substancia marcadora se lleva sobre el electrodo de trabajo de oro (Massey; Richard J., et al. documento US 5746974; Leland; Jonathan K., et al. documento US 5705402). El manejo reproducible de partículas de látex magnéticas es sin embargo difícil de muchas maneras, por lo tanto, este método es útil sólo en costosos robots de laboratorio (por ejemplo, Elecsys 1010 y 2010) que tienen un sistema de manejo de líquidos complicado y preciso. Además, el electrodo de trabajo de oro masivo permanente necesita limpieza prolongada y pretratamiento entre cada análisis (Manual de servicio Elecsys, p. 70).

Aunque en muchos aspectos excelente, un inconveniente de la ECL inducida por electrones calientes en ensayos de bioafinidad es la necesidad de largo tiempo de incubación con el fin de conseguir las moléculas reaccionantes en equilibrio, que es necesario para optimizar la precisión analítica. Según la presente invención, una mejora significativa del rendimiento se puede adquirir colocando una película porosa delgada sobre el electrodo de trabajo, denominada aquí más adelante dispositivo de CIPF, tal como se describe en las reivindicaciones 1-10.

### Breve descripción de los dibujos

Fig.1. Un diagrama esquemático del dispositivo de película porosa/aislante/conductor (CIPF) según la invención. Las estructuras de electrodo pueden contener conductor (11), aislante (12) y película porosa (13). La estructura se denomina CIPF.

Fig. 2. Un modo práctico de construir una tira de ensayo para el lector de ECL catódica según el principio del CIPF. Los electrones calientes se inyectan a través de un chip de silicio (Si) cubierto por una película aislante. La figura también muestra la película porosa unida totalmente a un trineo deslizante. La estructura de la tapa deslizante y la tira de ensayo se construyen de modo que en la posición baja la película porosa está unida a la superficie del chip de Si. Cuando la tapa se desliza hacia arriba la película porosa se levanta de la superficie del cátodo y se coloca de nuevo contra la parte de brazo en la posición elevada. Un ejemplo de estructura de tira de ensayo (Fig. 2). La tira de ensayo contiene una tapa (1) móvil que cuando se mueve a lo largo del brazo (3) se levantará (9) y se bloqueará en su lugar en el mismo extremo del brazo. La muestra a analizar se añade a través de la abertura (2). La película porosa (5) está situada debajo de la abertura y la película se apoya contra el electrodo (6) de Si con tacos (8). Bajo el silicio, hay un conductor (7) metálico, del que sale una conexión (4) a la fuente de corriente externa.

Fig. 3. Estructuras de celda de medida de un lector de luminiscencia. Fig. 3A: la tira (4) de ensayo en la celda (1) está en la posición de medida. Un motor (3) de agitación está conectado a la parte superior de la celda que incluye también el contacto (5) en la tira de ensayo para la excitación eléctrica. El lavado se dispone a través de conectores (2). Fig. 3B: la celda (8) de medida tiene una construcción desechable. El lavado se dispone a través de conectores (2). La disolución de lavado/medida se lleva a la celda de medida a través del tubo (6) de acero conductor, que funciona también como ánodo. La aspiración de la disolución se lleva a cabo por medio de otro tubo (7). Los contactos eléctricos de la tira (4) de ensayo están situados en la parte superior de la tira.

Fig. 4. Montaje de un sistema de lavado de la celda de medida. Una bomba (1) peristáltica transfiere la disolución (5) de lavado a través de la tubería (2) dentro de la celda (4). La misma bomba peristáltica aspira desde la parte superior de la celda a través de otra tubería (3) con una mayor eficiencia de succión que la otra (2). La válvula (9) selecciona la aspiración de la celda desde la parte inferior o superior. Cuando se cierra la válvula (10) de la tubería más delgada, la celda se puede drenar desde el fondo de la celda. Cuando sea necesario la celda se puede lavar (6) ajustando la válvula (8).

Fig. 5. Celda de medida desechable ajustada a la tira de ensayo. Fig. 5A: el electrodo de silicio se ajusta a un marco (3) conductor con la substancia (2) eléctricamente aislante. Fig. 5B: muestra cómo se puede obtener luminiscencia (4) de todo el área del electrodo.

Fig. 6. Tira reactiva. En la Fig. 6A la tira de ensayo se ve desde la parte superior y en la Fig. 6B desde la parte inferior. El electrodo (1) de silicio se ajusta a la tira de ensayo con la substancia (2) eléctricamente aislante. Hay un

contacto eléctrico directo al cátodo (1) y ánodo (3) desde el lado posterior de la tira de ensayo.

- Fig. 7. Una tira de ensayo, en la que todos los reactivos necesarios están dispuestos en forma seca y en la que se controlan la puesta en marcha y la interrupción de la reacción de análisis. En la figura 7A, la tira de ensayo está lista para usar. En la parte inferior del marco (1), una película (2) porosa delgada contiene todos los reactivos necesarios en forma seca. La película porosa se encuentra sobre la superficie de silicio, pero no toca el electrodo. Se inserta una construcción de material (3) elástico debajo del marco y actúa como un resorte. Cuando se añade la muestra sobre la película (2) porosa, la muestra disuelve los reactivos secos. La reacción sobre la superficie del electrodo de silicio se inicia empujando el marco hacia abajo, cuando la película porosa se asienta sobre el silicio y la muestra se extiende sobre su superficie. Después de un tiempo deseado, el marco (1) se puede liberar de la posición hacia abajo y detener la reacción. En la Fig. 7b, el marco (1, 3) se empuja dentro de la tira de ensayo después de un tiempo de reacción fijo. El electrodo (4) de silicio está unido a la tira de ensayo con el material (6) eléctricamente aislante y el ánodo (5) funciona al mismo tiempo como barrera de un recipiente inferior. En la Fig. 7C, la tira de ensayo está en la etapa de lavado. Con el brazo (7) de lavado del electrodo de silicio se lava, si es necesario, antes de la medida de ECL.
- Fig. 8. Tira de ensayo multiparámetro. Varias zonas de reacción se pueden añadir a la tira de ensayo. Parte de ellas pueden funcionar como controles negativos y positivos.
- Fig. 9. Estabilidad de chips de Si durante un año como se mide por inmunoensayo heterogéneo de hCRP, con el dispositivo de CIPF y lector de luminiscencia. Las concentraciones de CRP eran (a) 0, (b) 10, (c) 30 y (d) 100 ng/ml.
- Fig. 10. El efecto del grosor de la capa de óxido de chips de Si con ECL catódica, (a) Tb (III) quelado con 2,6-bis[N,N-bis(aminometil)carboximetil]-4-benzoilfenol  $10^{-7}$  M (b) la disolución de control (tampón de medida).
- Fig. 11. Curva de calibración del luminóforo marcador de quelato de terbio y 2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol puro tal como se mide con lector de ECL y tira de ensayo (CIPF). La celda de medida se llenó con tampón de medida y luminóforo marcador.
- Fig. 12. Estructuras y espectros de ECL de diferentes luminóforos apropiados para el marcado de un anticuerpo (ANS 4-amino-1-naftalenosulfonato, Fmoc-OH = cloroformiato de 9-fluorenilmetilo hidrolizado, Tb (III)-L1 = Tb (III) quelado con 2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol, Ru(bpy) $_3^{2+}$  = quelato de rutenio (II) y tris(2,2'-bipiridina), Yb (III)-L1 = Yb (III) quelado con 2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol). Se puede concluir que todo el área espectral UV-VIS-NIR está operativo. Las medidas se realizaron con un dispositivo de CIPF y lector de luminiscencia.
- Fig. 13. Curva de calibración de inmunoensayo heterogéneo de hCRP (véase el Ejemplo 2).
- Fig. 14. Inmunoensayo heterogéneo de hCRP con muestras de suero, (véase el Ejemplo 3).
- Fig. 15. Inmunoensayo homogéneo de hCRP con disoluciones de muestra estándar (véase el Ejemplo 4).
- Fig. 16. Curva de calibración de inmunoensayo heterogéneo de hTSH, como se mide por las muestras estándar (véase el Ejemplo 5).
- Fig. 17. Curva de calibración de inmunoensayo heterogéneo de hTSH tal como se mide con muestras de suero. Se prepararon estándares de hTSH en suero (véase el Ejemplo 6).
- Fig. 18. Curva de calibración de inmunoensayo heterogéneo de hTSH con muestras de sangre entera. Se prepararon estándares de hTSH en muestra de sangre entera heparinizada (véase el Ejemplo 7). Las medidas se realizaron usando dispositivo de CIPF y lector de luminiscencia (Fig. 9, Ejemplo 2).
- Fig. 19. La Fig. 19A describe una aplicación de celdas de flujo de dispositivo de CIPF, en la que la reacción basada en afinidad se puede efectuar en una película porosa o en el cátodo de silicio. En la Fig. 19B, el lado (7) se separa de modo que la construcción es visualizable. La película (4) porosa actúa como transportador para el líquido. Además, diferentes reactivos se pueden secar sobre ella (por ejemplo, anticuerpo marcado). La medida de la ECL se puede hacer directamente a través de la película (4) porosa. La muestra se añade directamente a la película (4) porosa que permite que comience la inmunorreacción. Se añade suficiente líquido a la celda (6) para que se forme contacto electrolítico entre el ánodo (5) y el electrodo (3) de silicio. El lavado tiene lugar a través de la entrada (1) y la salida (2) y el líquido se mueve a lo largo de la película porosa. Una tapa con un agujero para la adición de la muestra puede estar sobre la cámara (6).
- Fig. 20. Una curva de calibración típica de inmunoensayo heterogéneo de hCRP medida con un dispositivo mostrado en la Fig. 15 (véase el Ejemplo 8).
- Fig. 21. Imagen de control de calidad de AFM del revestimiento del chip de Si por adsorción física con anticuerpo.
- Fig. 22. Imagen de la superficie de poliestireno obtenida con la medida de AFM. La rugosidad de la superficie impide el uso efectivo de AFM en el control del revestimiento (véase el Ejemplo 10).

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo analítico electroquimiluminiscente como se define en las reivindicación 1 adjunta, y un método correspondiente de analizar una muestra como se define en la reivindicación 6 adjunta.

5 Según la presente invención, diferentes análisis se pueden realizar con dispositivos simples y poco costosos igualmente bien que con los dispositivos complicados descritos anteriormente, cada vez que se realiza el inmunoensayo o hibridación de ADN reales con la película porosa en la superficie del electrodo de trabajo (dispositivo de CIPF). Entonces el dispositivo de medida y la celda de medida son suficientemente baratos para las necesidades de los análisis clínicos .

10 La película porosa quiere decir en esta invención una película porosa permeable a los líquidos que tiene un grosor menor de 100  $\mu\text{m}$ , que se fija sobre cátodo de ECL. El electrodo de ECL catódica, a diferencia del electrodo de ECL anódica, funciona claramente diferente de la electroquímica convencional porque el cátodo lleva en su superficie una película aislante delgada según la patente de EE.UU. 6645776 B (Kulmala et al.). La película porosa se encuentra sobre la película aislante de dicho cátodo. El electrodo según la invención contiene por lo tanto por lo menos dos  
15 películas, una película aislante eléctricamente no conductora y sobre ella una película porosa con un grosor de menos de 100  $\mu\text{m}$ . La película porosa es electrolíticamente conductora a diferencia de dicha película aislante. La película porosa es por lo tanto claramente diferente del material de electrodo descrito en la patente de EE.UU. 6645776 B. En las aplicaciones de ECL anódica (documento US 4280815 A, Technicon; 5324457 A, Univ Texas Instruments; 6090545 A, Meso Scale Technologies) se han aplicado previamente diferentes materiales porosos como electrodo mismo o como revestimiento del electrodo. El objeto de los materiales porosos en dichas  
20 invenciones no ha sido, sin embargo, similar a en la presente invención. Debido a que la ECL catódica funciona con un principio electroquímico diferente de la ECL anódica (entre otras cosas, la distancia de la zona de excitación desde el electrodo es diferente), la propia película porosa en la presente invención nunca funciona como un electrodo. Con la colocación de la película porosa sobre el electrodo, se encontrarán nuevas propiedades sorprendentes en comparación con las tecnologías de la técnica anterior. Además, una capa de muestra uniforme se  
25 puede extender rápidamente por la película porosa sobre el cátodo.

La presente invención describe el dispositivo de película porosa/aislante/conductor (CIPF) especialmente en el contexto de la ECL catódica. Se pueden excitar con él muy diferentes tipos de marcadores como se ejemplifica en la Fig. 8. El principio del dispositivo de CIPF se describe en la Fig. 1. El dispositivo se pone en estado operativo  
30 añadiendo una muestra líquida o tampón para conseguir un contacto líquido sobre la película porosa, desde la que la muestra o tampón se extiende sobre todo el electrodo de trabajo. Se encontró que el dispositivo funciona como un sistema de inmunoensayo sorprendentemente rápido. Sorprendentemente se encontró también que los marcadores podrían ser excitados en la distancia por debajo de 100  $\mu\text{m}$  en la película porosa. Según la presente invención, se pueden producir dispositivos sensores o sondas de CIPF que contienen electrodo de trabajo desechable de bajo coste y por consiguiente los electrodos de trabajo tradicionales de ECL se puede substituir por electrodos de trabajo desechables. Simultáneamente, se puede evitar, por ejemplo, la operación de limpieza y el equilibrio que requiere la robótica sofisticada para la manipulación de micropartículas.

Esta invención constituye una mejora significativa sobre la técnica anterior para los dispositivos y métodos destinados a los mercados POC haciendo posible la fabricación de ensayos rápidos cuantitativos baratos. Esto se  
40 consigue combinando el mecanismo de ECL y el principio de medida con diferentes películas porosas delgadas.

Se sabe en la técnica anterior que se pueden usar diferentes materiales porosos para el transporte y filtrado de líquidos en ensayos basados en inmunocromatografía (Hybritech Inc., véase Clinical Chemistry 31 (1985) 1427). Estos métodos, sin embargo, no son cuantitativos y no se usan en el contexto de la ECL catódica, cuyo principio es totalmente diferente de los de la electroquímica tradicional.

45 En sistemas microfluidísticos o en métodos que usan tamaños de volumen de microlitros, a menudo hay problemas de burbujas de aire, efectos perjudiciales de la difusión térmica, problemas causados por el flujo laminar, es decir, separación de los líquidos dentro del flujo, y fuerzas de superficie causadas por fenómenos capilares. En esta invención, se demostró un nuevo modo de emplear películas porosas delgadas, no sólo para filtración sino también como un equalizador homogéneo y extensor de flujo de líquido. Esto es posible de hacer, especialmente con  
50 facilidad con los electrodos de silicio liso de la ECL inducida por electrones. Además, el dispositivo de CIPF simplifica drásticamente los procedimientos de muestreo y manipulación de sangre entera en ensayos realizados por el método e instrumentos de detección de ECL. Usando las películas porosas en estos métodos microfluidísticos varios inconvenientes de la técnica anterior se pueden eliminar totalmente o disminuir significativamente. La invención comprende un equipo mediante el cual los analitos y otros reactivos se distribuyen por todo el electrodo de trabajo de ECL seguido de excitación eléctrica de tal modo que el conjunto de electrodo de trabajo montado se  
55 puede usar como un dispositivo de ensayo rápido basado en inmunoensayos y métodos de sonda de ADN.

El objetivo de la invención se alcanzó mediante el uso del dispositivos de CIPF con películas porosas delgadas con un grosor de menos de 100  $\mu\text{m}$  como equalizador homogéneo de los flujos de líquido y como un extensor del líquido de las celdas de flujo a través de celdas de microflujo o celdas de microcapa en los métodos de detección basados

en ECL de los ensayos bioafinidad, en el que las características del dispositivo son como se describen en las reivindicaciones 1-10. Esta invención se centra especialmente en los métodos y dispositivos mediante los que se puede realizar en la práctica la ECL catódica. Además, es especialmente característico de la invención que la excitación catódica ocurre en la proximidad del electrodo (el principio de ensayo de proximidad). La película porosa  
 5 ayudante se puede colocar ajustada al electrodo, lo que no es posible en otros métodos de detección. Alternativamente, la película porosa se puede llevar al electrodo para iniciar la reacción de bioafinidad y posteriormente retirarla antes de la medida de ECL. La medida se puede realizar, sin embargo, también directamente a través de ciertas películas porosas. La substancia marcadora se puede secar sobre la película porosa colocada en el electrodo o sobre la superficie del electrodo de trabajo. La unión líquida entre la película  
 10 porosa y el electrodo de trabajo es óptimamente menor de 100  $\mu\text{m}$ . La película porosa se puede unir de forma covalente o por adsorción directamente a las superficies por métodos conocidos en la técnica anterior (por ejemplo, en el producto de Schleicher & Schuell Ltd.), pero no en el contexto de su uso en ECL.

La realización principal de la invención es el electrodo de trabajo de ECL. El material de electrodo en ECL inducida por electrones calientes es un conductor cubierto por una película aislante delgada, cuyo material puede ser Al o Si según la patente de EE.UU. 6251690 (Kulmala et al.). Lo más preferentemente es silicio plano que se oxida de modo que está cubierto por una película aislante con un grosor de 1-10 nm, lo más preferible una película aislante con un grosor de 3-4 nm. El sustrato de silicio se puede, de otro modo, canalizar o de lo contrario la morfología de la superficie se puede modificar para mejorar el flujo de líquido o sus propiedades eléctricas. El tamaño del chip de silicio puede variar dependiendo del uso previsto y de si está destinado a medir uno o varios analitos en el mismo  
 15 tiempo. Típicamente, el tamaño del chip de silicio es 4x9 mm y grosor inferior a 1 mm. El chip de silicio está unido a una estructura de soporte, que puede tener diferentes formas dependiendo de los requisitos de tamaño y materiales del instrumento de medida en uso. Típicamente la estructura de soporte está hecha de plástico, que no es perjudicial para el medio ambiente y fácil de eliminar. Dependiendo de las propiedades de la película, la película porosa se extiende en forma húmeda o seca sobre el chip de silicio colocado en la superficie de la estructura de soporte.

Es característico de las películas porosas colocadas en la superficie del electrodo de la invención que sean microporosas y que los grosores sean menores de 100  $\mu\text{m}$ . Los materiales según la invención están disponibles de varias fuentes comerciales como Millipore, MSI, Sartorius, Pall, Sigma y DuPont. Las películas porosas pueden ser isotropas o anisotropas. Las tecnologías de producción varían y pueden incluir compresión o estirado, los poros se puede hacer por medios químicos o físicos o en el caso de las películas porosas anisotropas por transferencia de  
 20 fase. También se puede usar la sinterización de micropartículas. Los materiales apropiados de películas porosas se pueden elegir entre, pero no están limitados a, PTFE, poli(fluoruro de vinilideno), policarbonato, polisulfona, nylon y ésteres de celulosa. Tales películas y otras están disponibles de fuentes comerciales con diferentes tamaños de poro y grosores y diferentes propiedades quimicofísicas. Entre los materiales de fibra útiles, se pueden mencionar fibra de vidrio, papel de filtro, y textiles de filtro.

El uso de películas porosas en dispositivos de CIPF da ventajas significativas sobre la técnica anterior para ensayos de bioafinidad. Con películas porosas la muestra se puede extender uniformemente sobre el electrodo de trabajo revestido con anticuerpo. Las películas porosas funcionaron inesperadamente como ecualizador homogéneo de flujos de líquidos y prevención de la formación de burbujas en sistemas microfluídicos (problema especial de ECL), difusión térmica, efectos no deseados de fuerzas superficiales y flujos laminares y de este modo problemas  
 35 eliminados en las celdas de microflujo microfluídico o en celdas de microcapas.

En el caso de que la película porosa sea lo suficientemente delgada, menos de 100  $\mu\text{m}$  en los ensayos de bioafinidad basados en ECL, los compuestos que reaccionan también pueden ser llevados a la película porosa colocada sobre el electrodo de modo que la película porosa esté en un contacto líquido con la superficie del electrodo. Contra las consideraciones teóricas (véase, documento US 6251690, Kulmala S., et al. y otras  
 40 publicaciones), según la presente invención, los pulsos de excitación del electrodo pueden excitar moléculas marcadoras en la película porosa a significativamente mayor distancia de los electrodos de lo esperado hasta ahora, es decir, en la película porosa de grosor menor de 100  $\mu\text{m}$ . La superficie del electrodo se puede revestir por medios conocidos con anticuerpo o ADN y excitar las moléculas marcadoras unidas con pulsos eléctricos. En este caso la película porosa, usada para extender la muestra y los reactivos, se puede retirar, siempre que se desee, antes de la  
 45 medida.

La muestra del paciente (plasma, suero, sangre entera, líquido cerebral, orina, etc.) también se puede llevar a la película porosa, secar y almacenar en ella. Esto puede ser una ventaja excepcional de la presente invención, por ejemplo, para hacer más fácil el transporte de las muestras. La película porosa que contiene la muestra se puede insertar para que sea como la parte de funcionamiento normal del dispositivo de CIPF y la concentración del analito se puede medir como se describe en otro lugar en el contexto de la presente invención.  
 50

La superficie del electrodo o de la película porosa a colocar contra ella, se puede revestir con anticuerpos o antígenos por los métodos anteriormente conocidos que permiten alta densidad de antígenos o anticuerpos activos sobre la superficie. Según la presente invención, los electrodos o la superficie de la película porosa a colocar contra el electrodo se puede revestir con películas de Langmuir-Blodgett descritas en los Ejemplos.

Es ventajoso por razones de producción almacenar los dispositivos de CIPF secos. A continuación, los dispositivos  
 60

se llevan al estado funcional sólo mediante la adición de la muestra líquida o disolución tampón a la superficie de la película porosa que permite reacciones de bioafinidad en condiciones apropiadas entre la película porosa y el electrodo.

5 El dispositivo de CIPF descrito en la invención puede comprender, además de la estructura de soporte, película porosa, y el electrodo (CIPF), incluye otras partes y protecciones que hacen el dispositivo más práctico en el uso. Si se miden analitos de sangre entera, la retirada de las celdas sanguíneas también se puede hacer por medio de películas porosas específicas como se muestra en los Ejemplos. El dispositivo según esta invención contiene también la conexión eléctrica del electrodo de trabajo para las operaciones de excitación y de medida de luminiscencia. Es típico del dispositivo de CIPF que un gran número de ellos se pueda producir mediante líneas de producción automatizadas.

Los métodos de producción de los diferentes componentes individuales del dispositivo de CIPF y su montaje para obtener el dispositivo son básicamente conocidos en la técnica anterior.

15 Se usan preferentemente superficies lisas como materiales de electrodo de la presente invención. La calidad de revestimiento de los electrodos con materiales de bioafinidad es crucial para la función de los dispositivos de CIPF. El control de calidad se puede basar, por lo tanto, directamente en la extremadamente precisa microscopía túnel y/o de fuerza atómica. Esto se puede hacer por la observación directa de, por ejemplo, anticuerpos activos revestidos, lo que en la práctica es imposible con otros tipos de métodos de diagnóstico y, por lo tanto, la posibilidad de que el control de calidad sea una de las fortalezas fundamentales de esta invención y de este modo se cumplirá el criterio de calidad más fundamental de los métodos de diagnóstico. El generalmente usado revestimiento de poliestireno con anticuerpos no tiene la posibilidad de este tipo de control, porque la superficie de poliestireno después del moldeo por inyección es demasiado rugosa para la identificación de las moléculas sobre la superficie del material.

20 Los ensayos rápidos cuantitativos y las etapas precedentes de determinaciones como, por ejemplo, el pretratamiento necesario de muestras de sangre entera se pueden simplificar considerablemente con los métodos y dispositivos mostrados en esta invención. Por ejemplo, el tratamiento de heparina que previene la coagulación de la muestra de sangre entera no es necesario en el método. La película porosa para extender el analito también excluye las células sanguíneas del contacto con el electrodo y la película porosa con las celdas sanguíneas se puede retirar fácilmente dejando expuesto el electrodo revestido de bioafinidad. Naturalmente también se pueden medir con este dispositivo y método muestras de sangre entera tratadas con heparina.

30 El electrodo de trabajo (en ECL catódica Al, Si, etc.) o la película porosa delgada sobre la electrodo de trabajo en cuestión puede estar revestido con anticuerpos. Si la película porosa está revestida con anticuerpo/antígeno/ARN/ADN la medida se hará sin retirar la película porosa, pero si el electrodo de trabajo está revestido con los analitos que reconocen la biomolécula la película porosa también se puede retirar antes de la etapa de medida de ECL. La medida de ECL de la presente invención se lleva a cabo preferentemente con la electroquimiluminiscencia inducida por electrones calientes (US 6251690).

35 Hay varios enfoques alternativos para los dispositivos de CIPF según la invención dependiendo de la aplicación prevista. Según la presente invención, hay una tira de ensayo separada típica, a la que se añade analito. Se extiende la muestra por la película porosa a la superficie de la pieza revestida de anticuerpo del electrodo de silicio. La muestra disuelve la molécula de bioafinidad marcada seca sobre la película porosa. La película porosa se puede unir con una cinta a la parte de la tapa deslizante, que está sobre el electrodo de trabajo durante la etapa de pipeteo de la muestra y durante el tiempo de incubación seguido de deslizamiento antes de la etapa de lavado y medida. Hay una abertura con el tamaño del electrodo de trabajo en la cinta, de modo que la película porosa está pegada con cinta sólo de los bordes. Cuando la muestra se ha añadido al orificio de muestra, el anticuerpo marcado seco de la película porosa se disuelve y la inmunorreacción se inicia sobre la superficie del electrodo de trabajo revestida de anticuerpo. La película porosa funciona como un extensor homogéneo del líquido. También previene los problemas causados por las burbujas de aire y también elimina otros problemas anteriores en los sistemas microfluídicos. La tira de ensayo se transfiere al dispositivo de medida, en el que se consigue la reacción de bioafinidad con o sin agitación. La agitación se realiza por medio del motor de vibración eléctrico unido al cuerpo de la celda de medida de los instrumentos o se consigue una turbulencia por otros medios en el instrumento. Después de que se llega al equilibrio hasta el grado deseado, la tira de ensayo se transfiere a la celda de medida y al mismo tiempo la película porosa sobre el electrodo de trabajo se desliza hacia arriba cuando el electrodo de trabajo se expone para lavado y medida. En el sistema de ECL, el contraelectrodo puede ser una parte integral de la celda de medida. El volumen de la celda de medida puede ser 50-500 µl. Los inmunoensayos de bioafinidad heterogéneos implican la etapa de lavado de la tira de ensayo pero en los ensayos homogéneos solo la medida de ECL. La composición de las disoluciones de lavado y medida puede ser la misma. El lavado se puede realizar llenando y aspirando la celda de medida. El transporte de las disoluciones se puede implementar en el instrumento de medida por medio de una bomba. Después de las medidas, la celda se limpiará. Una válvula en el instrumento controla si hay un flujo dentro de la celda de tampón de lavado/medida o agua destilada. Los instrumentos de ECL de ensayo rápido portátiles más simples no implican manejo de líquidos por el instrumento sino que están implicados recipientes de disolución previstos en la tira de ensayo desechable misma.

60 La medida de ECL de un ensayo de bioafinidad, en el que una película porosa delgada (por ejemplo, nitrocelulosa)

se reviste/impregna con anticuerpo, se puede realizar también con el principio del dispositivo de CIPF pero a continuación se necesita una celda de medida modificada y tira de ensayo comparado con el modelo (dispositivo de reacción de película) descrito anteriormente. Debido a que expresamente la reacción tiene lugar en la película porosa, la tira de ensayo se construye de modo que hay una tapa abierta para la disposición del lavado de la película porosa y celda de medida de mayor tamaño, en la que se pueda insertar la tira de ensayo.

La construcción de la película de reacción descrita anteriormente del dispositivo de CIPF se puede aplicar también a equipos de laboratorio más complicados. El electrodo de trabajo se puede unir a una celda, como una celda de microflujo, y el ánodo puede ser un material revestido de material conductor en un lado como vidrio de ZnO o película de ITO o la estructura del ánodo puede ser del tipo de red, ejemplificada por una red de acero o solo alambre de acero delgado. La película porosa está situada entre los electrodos en forma libre o fija. Debido a que la película porosa y el contraelectrodo unido firmemente a ella excede de la longitud del electrodo de trabajo, el flujo a través de la celda se conseguirá conectando tuberías de flujo o recipientes de pipeteo de tamaño de microlitros al contraelectrodo perforado. Alternativamente, el dispositivo o sensor de CIPF total se puede moldear dentro de los canales de flujo de líquido en plástico equipado con conectores para inyecciones de muestra y lavado. La construcción del dispositivo puede incluir también contraelectrodos anódicos alrededor del electrodo de trabajo catódico. También el modo más favorable de extender la disolución de (muestra, marcador y lavado) es la película porosa entre los electrodos en el caso de ensayo heterogéneo. También se pueden realizar ensayos homogéneos con el método y dispositivo similar debido a que los lavados no son necesarios. Esto está basado en el hecho de que la ECL catódica excita solo los marcadores concentrados por la reacción de bioafinidad en la superficie del electrodo (denominado efecto de proximidad).

Los reactivos marcadores se pueden secar sobre la película porosa. Para secar marcadores de bioafinidad, el material de la película porosa puede ser cualquier película porosa con grosor menor de 100 µm ejemplificado por policarbonato o nitrocelulosa. Para el control de calidad del revestimiento de los electrodos de trabajo es favorable usar microscopía de fuerza atómica (AFM). Los electrodos de trabajo pueden estar revestidos de anticuerpos por adsorción física o por enlace covalente y también por la extensión del orden de las superficies de anticuerpos que incrementan los métodos de Langmuir-Blodgett (LB) y de Langmuir-Schaefer.

A continuación la invención se esclarecerá adicionalmente por medio de los diagramas y ejemplos no limitantes y figuras relacionadas con ellos.

Ejemplo 1. Preparación de los electrodos revestidos de película aislante de obleas de Si por oxidación térmica, corte y revestimiento con anticuerpo

La oxidación de obleas de Si. Las obleas (obleas de Si: resistividad 0,01-0,023 Ωcm, p<sup>++</sup> dopado con boro, orientación <100>, grosor 525 ± 25 µm, productor Okmetic Oyj) se lavaron con el lavado de RCA generalmente usado en la industria y se colocaron en un horno a 700°C, en el que la atmósfera contenía 95% de nitrógeno, y 5% de oxígeno. La temperatura se incrementó a 850°C y la presión parcial de oxígeno se incrementó: 90% de nitrógeno, 10% de oxígeno y se incubó durante el tiempo deseado. Las obleas se lavaron con flujo de nitrógeno puro durante 30 minutos. La temperatura se disminuyó de nuevo a 700°C en nitrógeno puro y las obleas se retiraron del horno.

Los siguientes resultados se obtuvieron con diferentes tiempos de oxidación:

Tiempo de oxidación (min)	Grosor (nm)
0 (*)	2,666
15	3,418
30	3,936
40	4,171
60	4.852
80	5,535
120	6,393
200	8,070
400	11,442

El grosor se midió por medio de un elipsómetro por el cambio de polarización de un haz láser. En el método con las películas delgadas el índice de refracción se fija y se usa para el óxido un valor típico de 1.465. Una cinta protectora de la superficie se fijó en el lado sin pulir de la oblea de Si. La oblea a cortar se unió a la base de corte y se cortó por

medio de una sierra de cuchilla de diamante controlada por ordenador con el tamaño necesario de las preformas de sensor de Si.

El revestimiento de anticuerpo se puede llevar a cabo, por ejemplo, de modo que la oblea cortada pero aún unida a la cinta protectora se colocará con la parte pulida hacia abajo para que flote sobre una disolución de revestimiento en un bol de plástico (disolución de revestimiento: base Trizma 50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%,  $\text{NaCl}$  al 0,9%, pH 7,8 con  $\text{HCl}$ , que contiene anticuerpo anti-CRP 7,0  $\mu\text{g/ml}$ ; Medix Biochemica Oy Ab anti-hCRP clon 6405, 1,0 mg/ml). El volumen de revestimiento era 50 ml/oblea o 4,5  $\mu\text{g}$  anticuerpo/ $\text{cm}^2$ . El revestimiento se dejó proseguir durante la noche en un espacio húmedo y a continuación la oblea se transfirió a una nueva disolución de saturación (base Trizma 50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%,  $\text{NaCl}$  al 0,9%, BSA al 0,1%, D-sorbitol al 6%,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,8 con  $\text{HCl}$ ) contenida en un bol y se dejó que prosiguiera la saturación durante la noche. Para el almacenamiento, las placas que contienen sensores de Si cortados y revestidos ya preparados se secaron a 30°C durante 2,5 h y se colocaron a continuación herméticamente cerrados con substancia de secado en un refrigerador. Cuando las tiras de ensayo se montan, las rodajas de Si se toman del almacenamiento, se retira la cinta protectora unida a la tira de ensayo (Fig. 2). La Fig. 9 muestra la estabilidad de almacenamiento de los dispositivos de CIPF revestidos de anticuerpo. El efecto del grosor de la capa de óxido en la señal de ECL se representa en la Fig. 10. La Fig. 11 muestra la dependencia de la concentración del marcador de quelato de terbio-2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol, tal como se mide libre en fase de disolución. La Fig. 12 muestra espectros de diferentes luminóforos marcadores útiles que demuestran que el área espectral total (UV-VIS-NIR) se puede usar con el dispositivo y método de ECL catódica.

Ejemplo 2. Inmunoensayo heterogéneo de CRP ejemplificado con disoluciones estándar y la tira de ensayo y celda de medida según las Figuras 1 y 2

Los ensayos de CRP se realizaron con chips de Si preparados según el Ejemplo 1. La construcción de las tiras de ensayo era como en la Fig. 1 y Fig. 2. Las tiras de ensayo que contienen película porosa deslizante se midieron con la celda y dispositivo como se muestra en la Fig. 3A. El inmunoensayo estaba basado en el uso de películas porosas combinado con la detección de ECL. Alternativamente, modificando ligeramente la tira de ensayo, era posible realizar la medida con la celda de medida desechable descrita en la Fig. 3B.

La película porosa unida a la parte de tapa deslizante de la tira de ensayo contenía marcador seco. La película porosa de policarbonato de medidas exteriores de 7,00 x 12,0 mm (grosor 6-11  $\mu\text{m}$ ,  $1 \times 10^5$ -  $6 \times 10^8$  agujeros/ $\text{cm}^2$ , Whatman) se insertó en el marco de la cinta del mismo tamaño (3M 465, cinta acrílica de dos lados sin material de refuerzo) que tiene una abertura del tamaño del chip de Si 4,00 x 9,00 mm. El secado del marcador en la película porosa era como sigue. La disolución que contiene el anticuerpo marcado (Medix Biochemica Oy Ab anti-hCRP clon 6404, 2,22 mg/ml) (base Trizma 50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%,  $\text{NaCl}$  al 0,9%, BSA al 0,5%, gammaglobulina bovina al 0,05%, Tween al 0,01%,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM, pH 7,7 con  $\text{HCl}$ , que contiene marcador de quelato Tb-2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol 0,074 mg/ml) se pipeteó (0,5  $\mu\text{g}$ ) y se secó en forma de una gota con diámetro de 2 mm sobre el centro de la película porosa (12,0 x 7,00 mm). El secado se dejó proseguir a temperatura ambiente durante la noche.

Las muestras estándar de inmunoensayo (concentraciones de CRP 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0, 100,0, 300,0, 1000,0, 3000,0 ng/ml) se prepararon en un tubo de ensayo diluyendo disolución estándar de CRP (Scripps, cat. No. C0124, 2,37 mg/ml de CRP) con disolución de dilución (base Trizma 50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%,  $\text{NaCl}$  al 0,9%, BSA al 0,5%,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM, pH 7,7 con  $\text{HCl}$ ). Unos 3,5  $\mu\text{l}$  de muestra se pipetearon horizontalmente sobre la película porosa sobre la tapa de la tira de ensayo (Fig. 1), en el que la muestra disolvió el marcador seco. La tira se transfirió al instrumento de medida en posición vertical y la muestra se dejó incubar con el Si revestido bajo la película porosa durante 5 min agitando con el motor de vibración localizado en la parte de la cubierta de la celda de medida. Después de la incubación la película porosa con su marco se alejó deslizando del Si mientras que la tira de ensayo se movía a la celda de lavado/medida. La celda se llenó 4 veces y se aspiró 3 veces con disolución de lavado/medida combinada ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,1%, Tween 20 al 0,003%, pH 7,9 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Después del último llenado, la ECL ( $f = 10\text{Hz}$ ,  $Q = 20 \mu\text{As}$ , tiempo de pulso 250  $\mu\text{s}$ , 60 pulsos,  $U = 25 \text{V}$ ) se midió con el instrumento de luminiscencia descrito en el documento US 6251690. Después de la medida la celda se aspiró y se retiró la tira de Si. La celda se lavó 3 veces con llenado de drenaje antes de la siguiente tira de Si. El último llenado se realizó con agua destilada. La disposición de lavado de la celda se muestra en la Fig. 4. La curva estándar de inmunoensayo de CRP se muestra en la Fig. 13.

Ejemplo 3. Medida del quelato de Tb en la celda de medida que comprende ánodo alrededor del cátodo de silicio

En la disposición experimental de la Fig. 5A el electrodo de silicio se unió con cinta al fondo del pocillo y se llenó hasta la superficie con adhesivo que se polimeriza con UV (Loctite 322 o EPO-TEK OG 142). Después de la polimerización se retiró la cinta. La celda se llenó con la disolución de lavado/medida mencionada en el Experimento 2, en el que la concentración de la disolución de quelato de Tb era de  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. Se midió la ECL ( $f = 20 \text{Hz}$ ,  $I = 316 \text{mM}$ , tiempo de pulso 500  $\mu\text{s}$ ,  $U = 67 \text{V}$ ) y se tomaron fotografías con una cámara digital. Se recogieron diez pulsos para obtener la fotografía. La Fig. 5B muestra que la luminiscencia proviene de toda el área del electrodo.

Ejemplo 4. La unidad de electrodo de la figura 3 se puede conectar a una base de plástico que facilita el contacto

eléctrico fácil a ambos electrodos. La tira de ensayo se muestra en las Figuras 6A y 6B. Se puede construir con el mismo principio también la tira de ensayo según el Ejemplo 2, que se muestra en la Fig. 7. Por consiguiente, mediante la adición de unidades de electrodo individuales a la tira se puede construir tira de ensayo por medio de la que se pueden realizar muchos ensayos simultáneamente. Parte de los ensayos pueden funcionar como control negativo o positivo. Tal tira de ensayo se muestra en la Fig. 8.

#### Ejemplo 5. Inmunoensayo heterogéneo de CRP con muestras de suero

Muestras de suero conocidas (medidas turbidimétricamente en un laboratorio acreditado) con concentraciones de CRP de 133.000, 37.000, 13.000, 7.000, 234 ng/ml se midieron por inmunoensayo de ECL después de diluir. Las muestras se diluyeron cien veces con disolución de dilución (base Trizma 50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%, NaCl al 0,9%, BSA al 0,5%,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1mM, pH 7,7 ajustado con HCl) y se midieron como se muestra en el Ejemplo 2. La curva de muestra de suero resultante se muestra en la Fig. 14.

#### Ejemplo 6. Inmunoensayo homogéneo de CRP con disoluciones estándar

Un inmunoensayo homogéneo de CRP se realizó con el dispositivo de CIPF basado en la detección de ECL usando disoluciones estándar como en el Ejemplo 2, con una modificación que, después de la incubación y después de que la tira de ensayo se empujara hacia abajo dentro de la celda de medida, no hubo lavado sino que la celda de medida se llenó por medio de una bomba con disolución de medida y la medida se realizó directamente. Los resultados del inmunoensayo homogéneo se muestran en la Fig. 15.

#### Ejemplo 7. Inmunoensayo heterogéneo de TSH con muestras estándar

El Inmunoensayo heterogéneo de hTSH se realizó prácticamente de la misma manera como se muestra en el Ejemplo 2 con CRP. Se prepararon tiras de ensayo con chips de Si como en el Ejemplo 1. La composición de la disolución de revestimiento con anticuerpo de chips de Si era de MES 0,1 M,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,03 M, citrato de K 0,5 mM, glutaraldehído al 0,025%, gammaglobulina bovina al 0,05% que contiene 6,87 mg/ml de anticuerpo (MIT0406 MOAB anti hTSH Medix Biotech Inc. USA) y la de la disolución de saturación base Trizma 50 mM, BSA al 0,1%,  $\text{NaN}_3$  al 0,1%, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5 ajustado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Además, el anticuerpo marcado (anti-hTSH monoclonal, clon 5404, 5,5 mg/ml, Medix Biochemica Oy Ab), que se marcó con quelato de Tb y 2,6-bis-[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol se secó en la parte de película porosa de la tira de ensayo como se describe anteriormente.

Las muestras estándar (concentraciones de TSH 0,1, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0, y 100,0 mUI/l) se prepararon en tubos de ensayo diluyendo disolución estándar de TSH (Wallac, kit hTSH DELFIA, 324 mUI/ml TSH) con disolución de dilución (base Trizma 50 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%, NaCl al 0,9%, BSA al 0,5%,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM, pH 7,7 ajustado con HCl). Los lavados y la medida se realizaron como se muestra en el Ejemplo 2, excepto que el tiempo de incubación era de 15 min con agitación continua. La curva estándar de inmunoensayo heterogéneo de hTSH se muestra en la Fig. 16.

#### Ejemplo 8. Inmunoensayo heterogéneo de TSH con muestras de suero

El inmunoensayo heterogéneo de hTSH se efectúa prácticamente de la misma manera que el ensayo de CRP en el Ejemplo 2. Los chips de Si se prepararon como en el Ejemplo 1. La composición de la disolución de revestimiento de anticuerpo de los chips de Si era MES 0,1 M,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,03 M, citrato de K 0,5 mM, glutaraldehído al 0,025%, gammaglobulina bovina al 0,05% que contiene 6,87 mg/ml de anticuerpo (anti-hTSH Medix Biotech Inc. USA) y la de la disolución de saturación de base Trizma 50 mM, BSA al 0,1%,  $\text{NaN}_3$  al 0,1%, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5 ajustado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . También el anticuerpo marcado (anti-hTSH, Medix Biochemica Oy Ab) que se marcó con quelato de Tb-2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol se secó en la película porosa de dispositivo de CIPF como se muestra anteriormente.

Los estándares de suero (concentraciones de TSH 1,0, 3,0, 10,0, 30,0, y 100,0 mUI/l) se prepararon por dilución de la disolución estándar de TSH (Scripps Laboratories, Inc., San Diego, USA) con suero. La concentración de TSH en suero era de 0,45 mUI/l. Los lavados y la medida se realizaron como se muestra en el Ejemplo 2, excepto que el tiempo de incubación fue de 15 min con agitación continua. La curva estándar de inmunoensayo de hTSH se muestra en la Fig. 17.

#### Ejemplo 9. Inmunoensayo heterogéneo de TSH con muestras de sangre entera

El inmunoensayo heterogéneo de hTSH se efectuó prácticamente de la misma manera que en el Ejemplo 7. Los estándares de sangre entera (concentraciones de TSH 1,0, 3,0, 10,0, y 30,0 mUI/l) se prepararon diluyendo disolución estándar de TSH (Scripps Laboratories, Inc., San Diego, USA) con sangre entera heparinizada. La concentración de TSH de la sangre entera era de 0,5 mU/L. Los lavados y la medida se realizaron como en el Ejemplo 5. La curva estándar del inmunoensayo de hTSH de sangre entera se presenta en la Fig. 18.

Ejemplo 10. Inmunoensayo de CRP sobre película porosa de nitrocelulosa revestida con anticuerpo usando cátodos de Si

5 Se revistió película de nitrocelulosa porosa (7x4 mm, Schleicher & Schuell, 12  $\mu\text{m}$ ) con anticuerpo anti-CRP (10  $\mu\text{g/ml}$ ) mediante la incubación en disolución tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%, NaCl al 0,9%) a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la nitrocelulosa se lavó con disolución de saturación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%, NaCl al 0,9%, BSA al 0,1%, D-sorbitol al 6%,  $\text{CaCl}_2$  1 mM) y finalmente la película porosa se mantuvo en esta disolución de saturación a temperatura ambiente durante la noche. Después de la saturación, la película porosa se secó sobre papel de filtro.

10 La película porosa de nitrocelulosa revestida de anticuerpo se unió a la celda de flujo cambiada al dispositivo (Fig. 19) y se le añadieron 50  $\mu\text{l}$  de CRP estándar. Después de la incubación (5 min) la película porosa se lavó en la celda con 1 ml de disolución de lavado/medida (tampón de borato 50 mM, pH 7,9,  $\text{NaN}_3$  al 0,1%, Tween 20 al 0,003%) y se añadió sobre ella 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo marcado con quelato de Tb. Después de la incubación (5 min) la película porosa se lavó con 1 ml de disolución de lavado/medida. Después de lavar se midió la ECL en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado/medida ( $f = 5 \text{ Hz}$ ,  $Q = 20 \mu\text{As}$ , tiempo de pulso 250  $\mu\text{s}$ , 500 pulsos,  $U = 34,8 \text{ V}$ ). Una curva estándar típica se muestra en la Fig. 20.

15 Ejemplo 11. Revestimiento del electrodo con películas de Langmuir-Blodgett (LB) y examen molecular de las superficies

20 El experimento se realizó con la cubeta de Langmuir ordinaria. Se midió con exactitud la tensión superficial de 0,2 mN/m por el método de Wilhelmy-placa. La preparación de películas de proteína se realizó según Nagagawa T. (1991) Thin Solid Films, 202, 151 y Owaku, K., (1989) Thin Solid Films 180, 61. Las películas de proteína preparadas se transfirieron a placas de electrodo por el método de Langmuir-Schaefer. La proteína usada en el revestimiento era un anticuerpo monoclonal de ratón para antígeno superficial B de la hepatitis. Se formaron películas de LB para el límite agua/aire usando tampón Tris-HCl (10 mM, pH 8,2) y polietilenimina alquilada (Aldrich, Alemania).

25 Se crearon imágenes de túnel y de fuerza atómica de las superficies revestidas de LB con el instrumento Nanoscope II FM (Digital Instruments). El instrumento funciona con corriente constante (túnel) o desviación constante (fuerza atómica). Las imágenes, que eran estables por lo menos 30 min, se registraron por filtrado y por transformada de Fourier 2D. Se observaron patrones redondos de tamaño de 25 x 15 nm que se identificaron como anticuerpos. Se estimó que la densidad superficial era  $1 \times 10^{15}$  moléculas/ $\text{m}^2$ . Se muestran resultados comparativos en las Figuras 21 y 22.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo analítico electroquimiluminiscente, que comprende un electrodo de trabajo, y una estructura,
- 5 en la que:
- el material del electrodo de trabajo es un conductor o un semiconductor (11) muy dopado, que está cubierto con una capa (12) de aislante eléctrico, cuya separación de bandas es mayor o igual a 5 eV,
- el electrodo de trabajo está hecho de silicio o aluminio y la superficie del silicio o aluminio contiene una capa de óxido como capa (12) de aislante eléctrico,
- 10 el grosor de la capa (12) de aislante eléctrico es de 1 a 10 nm,
- el electrodo de trabajo está adaptado para servir como cátodo del dispositivo,
- el dispositivo está adaptado de modo que se puedan aplicar pulsos de excitación a la muestra a analizar, con lo que la muestra da una señal de luminiscencia que es proporcional a la cantidad del analito en cuestión,
- caracterizado por
- 15 el electrodo de trabajo del dispositivo que está apoyado en la estructura, por medio de la que el electrodo de trabajo se puede conectar a la electrónica de excitación de un instrumento de medida de luminiscencia,
- una película (13) porosa mecánicamente retirable sobre el electrodo de trabajo, siendo la película (13) porosa permeable a los líquidos y teniendo un grosor de 1 a 100  $\mu\text{m}$ , y
- una unión líquida de menos de 100  $\mu\text{m}$  que existe entre la película (13) porosa y el electrodo de trabajo,
- 20 estando adaptado el dispositivo de modo que la muestra y otros reactivos que se van a llevar a la película (13) porosa y/o cátodo puedan reaccionar entre sí.
2. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el grosor de la película (13) porosa sobre el electrodo de trabajo es 1-20  $\mu\text{m}$  y la película (13) y electrodo están en contacto por medio de una unión de disolvente durante la reacción de bioafinidad y durante una medida de electroluminiscencia.
- 25 3. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la superficie del electrodo de trabajo o la película (13) porosa sobre el electrodo de trabajo, o su conjunto, están revestidos con moléculas de bioafinidad adaptadas para unirse a las moléculas a analizar deseadas.
4. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que moléculas que reaccionan específicamente sobre el dispositivo se han almacenado en estado sólido o amorfo sobre las superficies del dispositivo antes del procedimiento de medida.
- 30 5. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que:
- el dispositivo es un dispositivo de tira de ensayo,
- el electrodo de trabajo forma la base estructural del dispositivo de tira de ensayo,
- el electrodo de trabajo y/o película (13) porosa está revestido con un bioadsorbente,
- 35 la película (13) porosa que contiene una biomolécula marcada seca está adaptada para ser puesta en contacto con el electrodo de trabajo.
6. Un método para analizar una muestra con un dispositivo analítico electroquimiluminiscente de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
- el electrodo de trabajo que sirve como cátodo del dispositivo,
- 40 llevar una muestra sobre la película (13) porosa y hacer reaccionar la muestra con otros reactivos llevados a la película (13) porosa y/o el cátodo,
- aplicar pulsos de excitación a la muestra, con lo que la muestra da una señal de luminiscencia que es proporcional a la cantidad del analito en cuestión.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el grosor de la película (13) porosa sobre el electrodo de trabajo es 1-20  $\mu\text{m}$  y la película (13) y electrodo están en contacto por medio de una unión de disolvente durante una
- 45

reacción de bioafinidad y durante una medida de electroluminiscencia.

8. El método de la reivindicación 6, en el que el método comprende retirar la película (13) porosa antes de llevar a cabo la medida de luminiscencia.

5 9. El método de la reivindicación 6, que comprende la etapa de almacenar moléculas que reaccionan específicamente sobre el dispositivo en estado sólido o amorfo sobre las superficies del dispositivo antes del procedimiento de medida.

10 10. El método de la reivindicación 6, en el que el dispositivo es un dispositivo de tira de ensayo, el electrodo de trabajo forma una base estructural del dispositivo de tira de ensayo, el electrodo de trabajo y/o la película porosa están revestidos con un bioadsorbente, la película (13) porosa contiene una biomolécula marcada seca, comprendiendo el método:

poner en contacto la película (13) porosa que contiene la biomolécula marcada seca con el electrodo de trabajo,

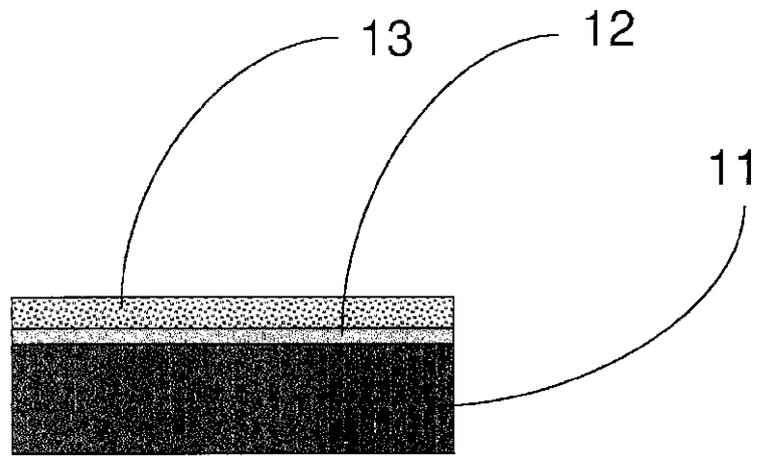
llevar una muestra y/o una disolución tampón a la película (13) porosa para iniciar una reacción de bioafinidad,

permitir que prosiga la reacción de bioafinidad,

detener la reacción de bioafinidad,

15 retirar la película (13) porosa del electrodo de trabajo, y

hacer la medida con un instrumento de electroluminiscencia.



**Fig. 1**

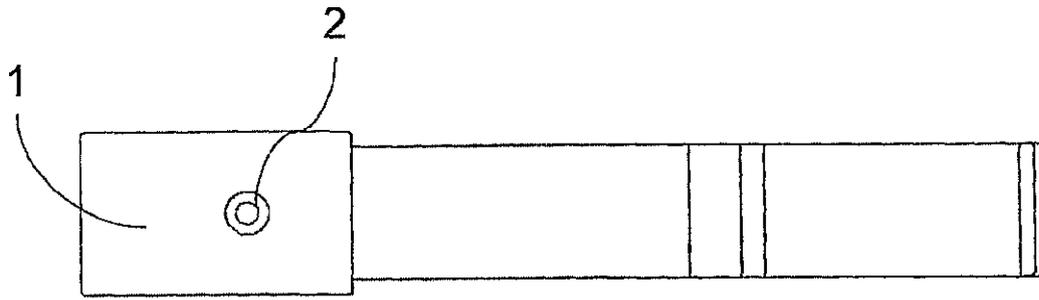


Fig. 2A

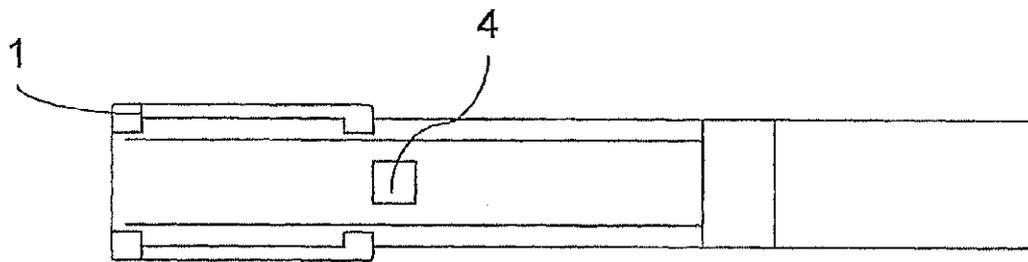


Fig. 2B

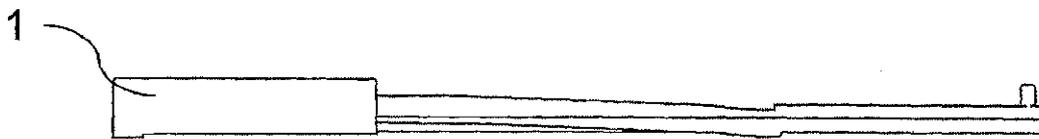


Fig. 2C

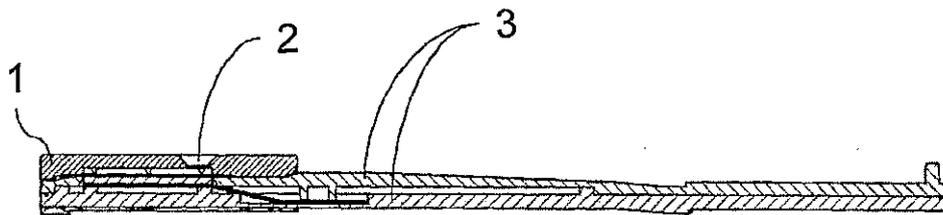


Fig. 2D

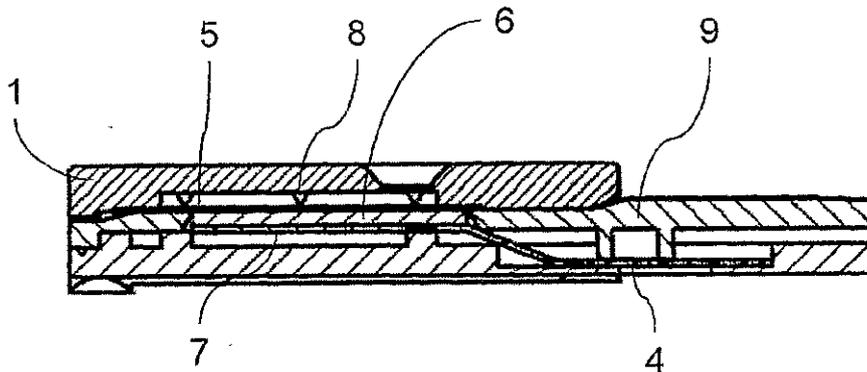
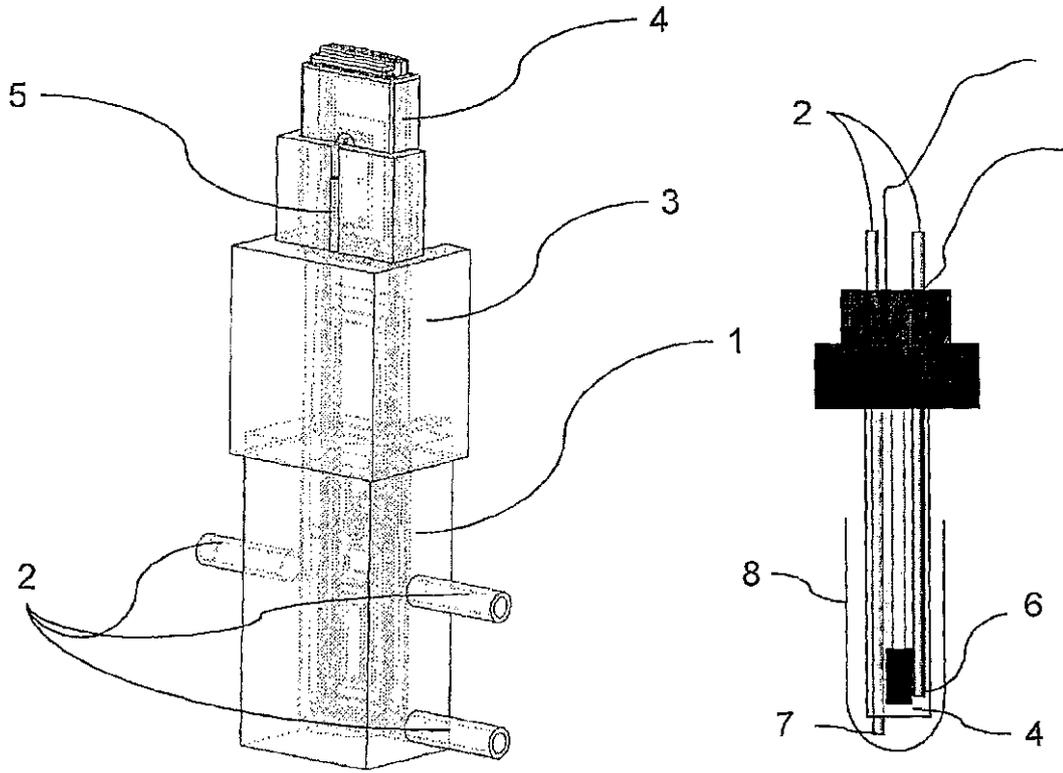
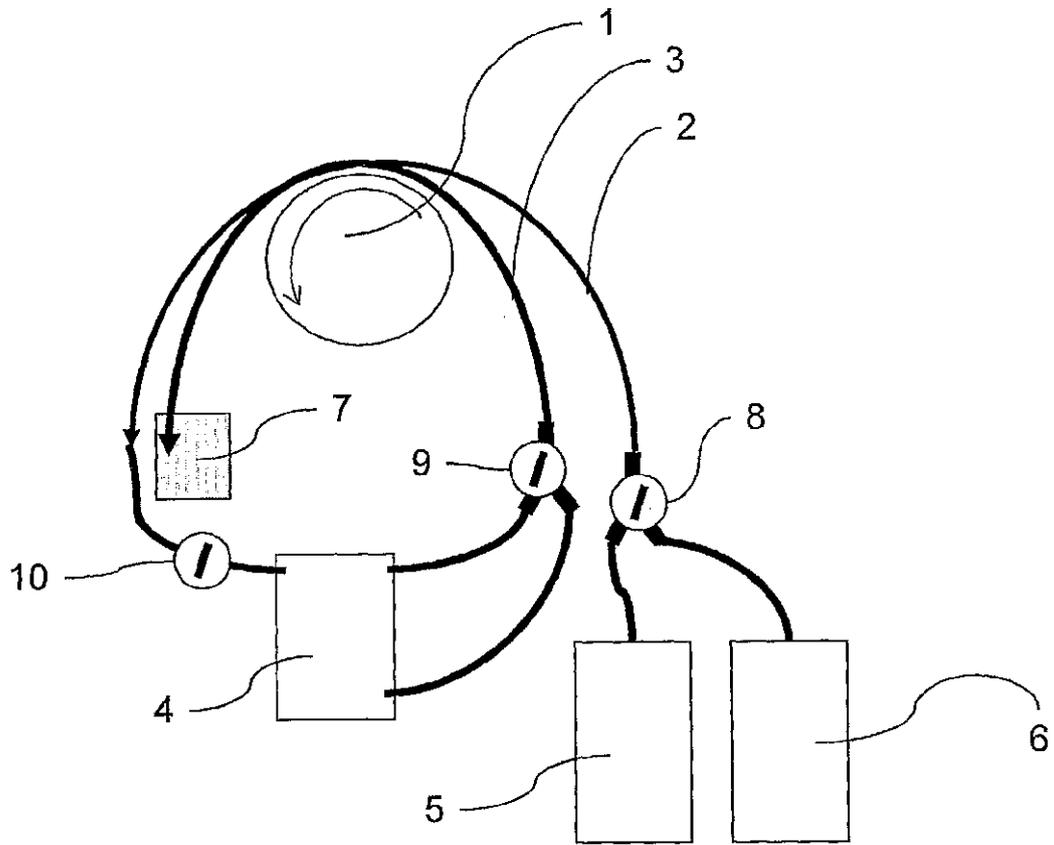


Fig. 2E

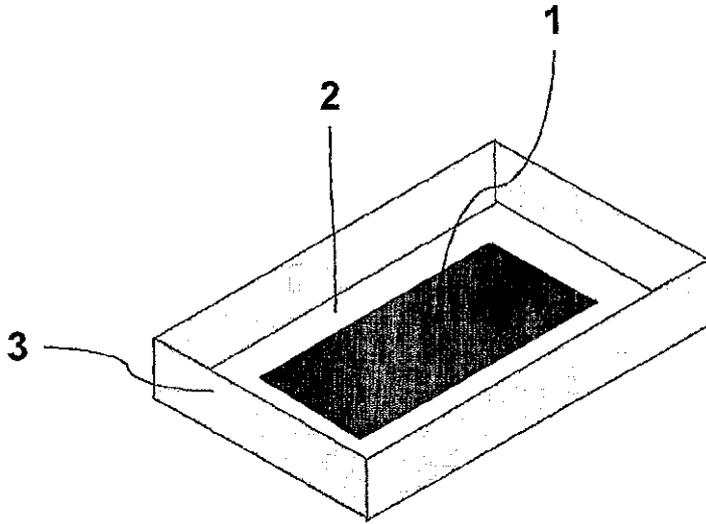


**Fig. 3A**

**Fig. 3B**



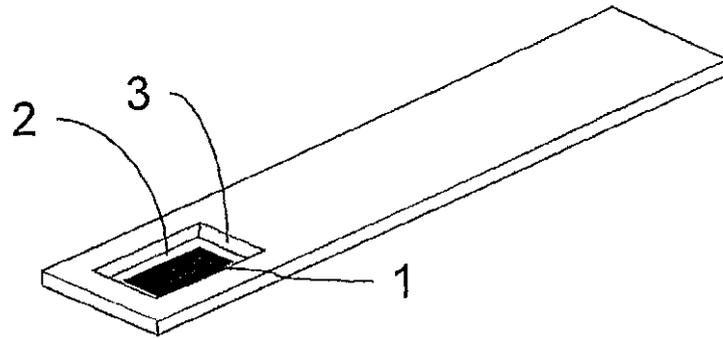
**Fig. 4**



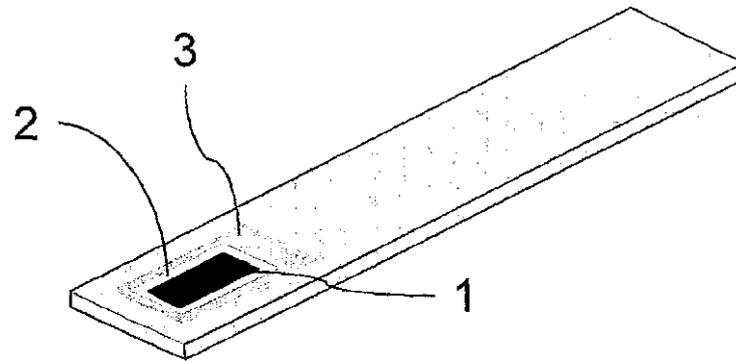
**Fig. 5A**



**Fig. 5B**



**Fig. 6A**



**Fig. 6B**

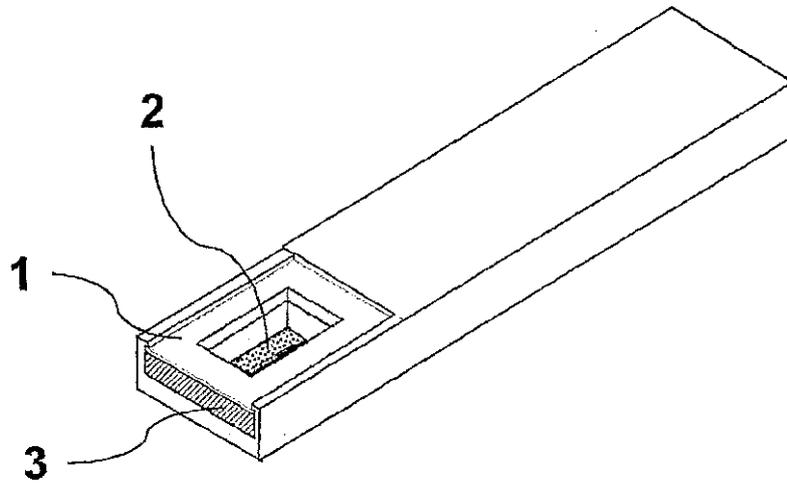


Fig. 7A

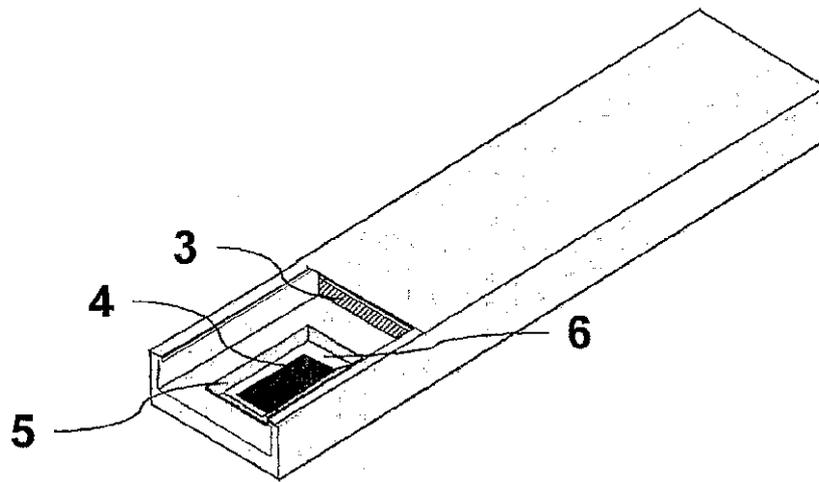


Fig. 7B

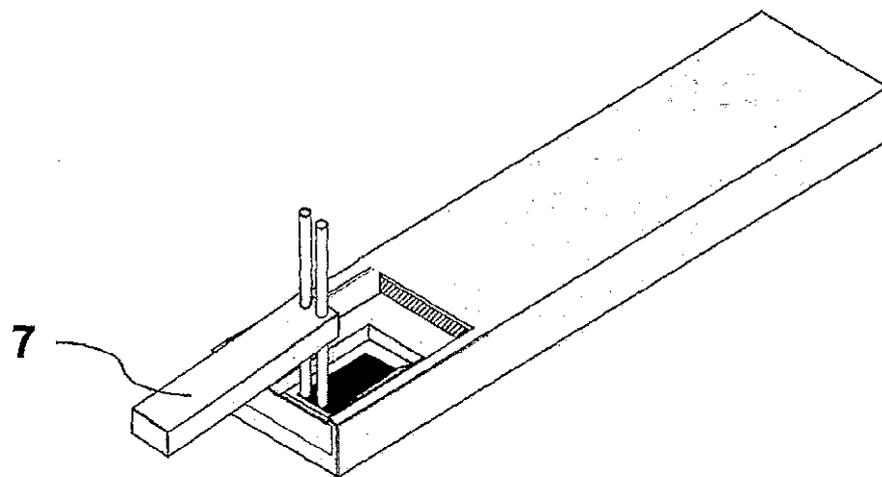
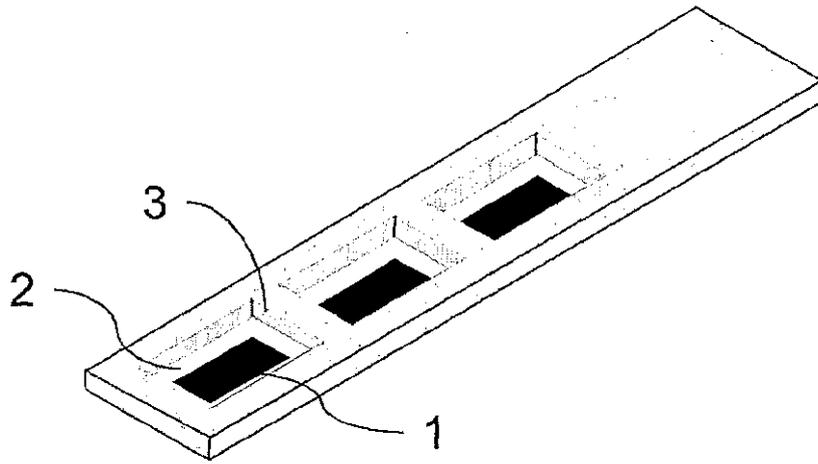
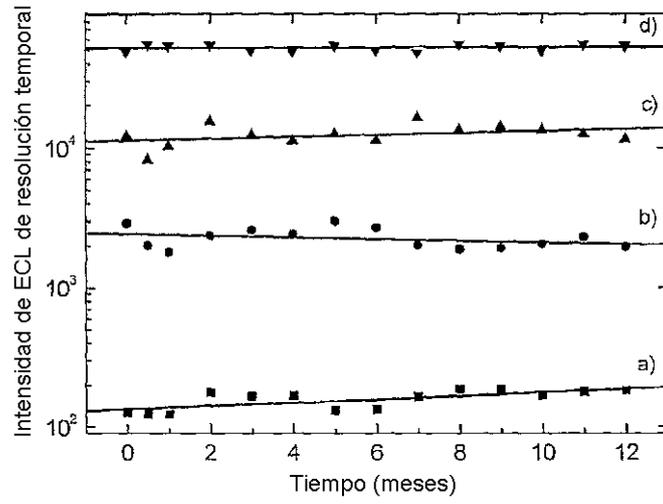


Fig. 7C



**Fig. 8**



**Fig. 9**

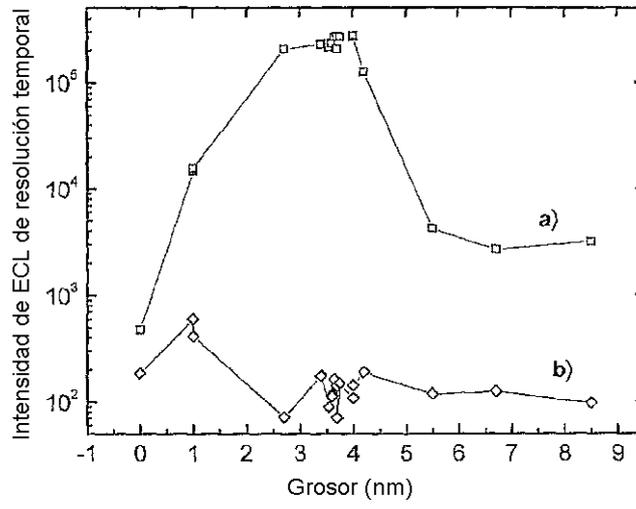
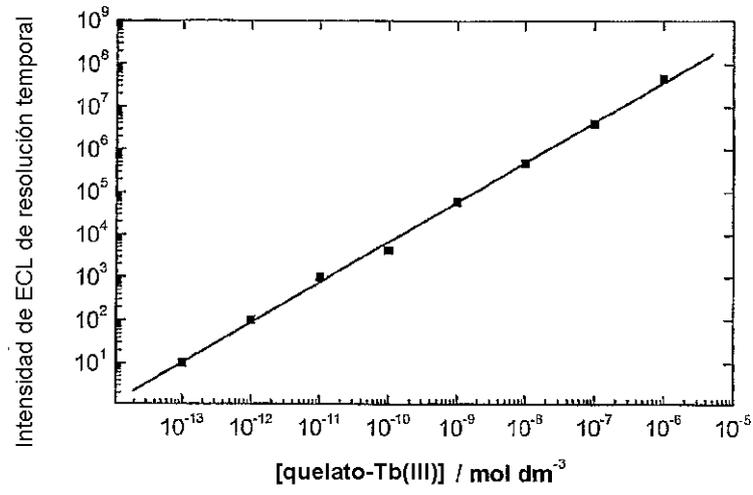


Fig. 10



**Fig. 11**

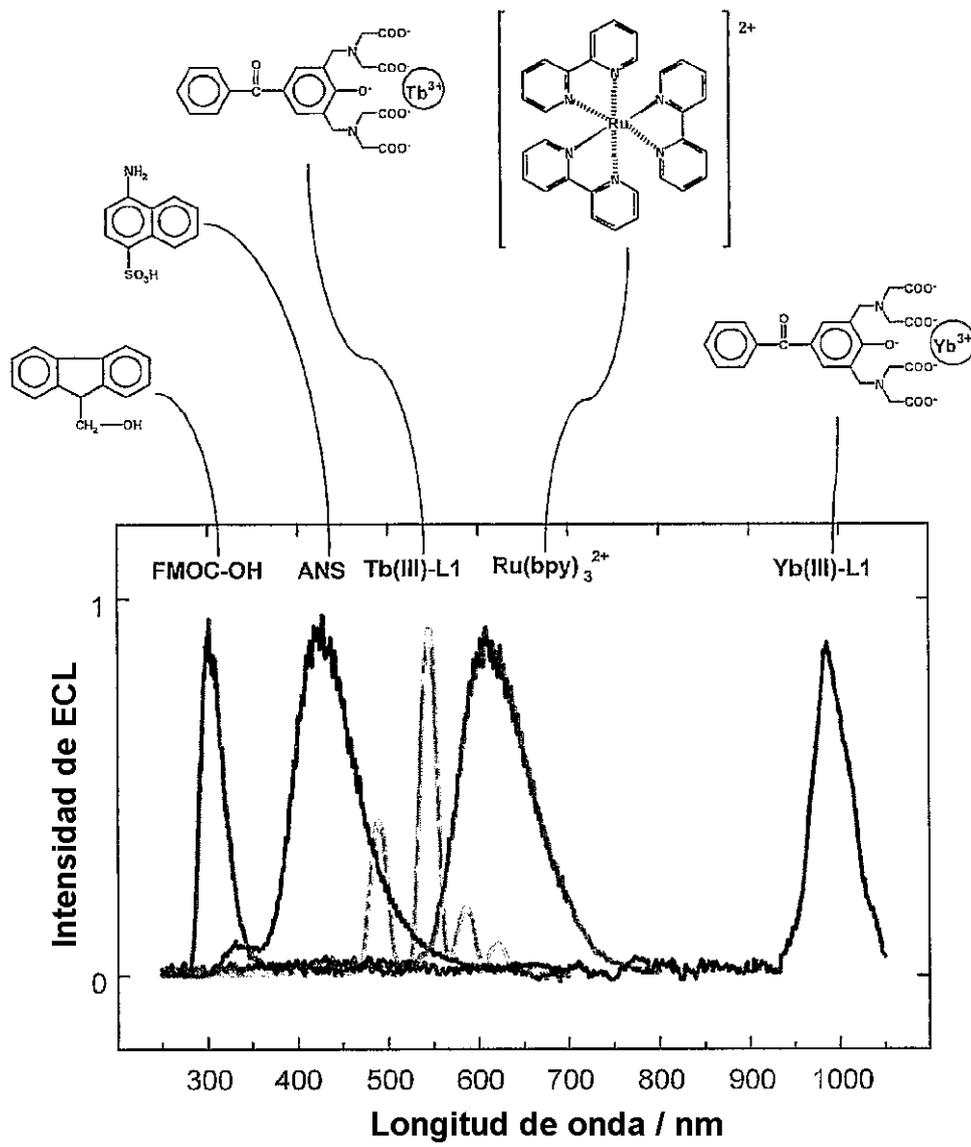
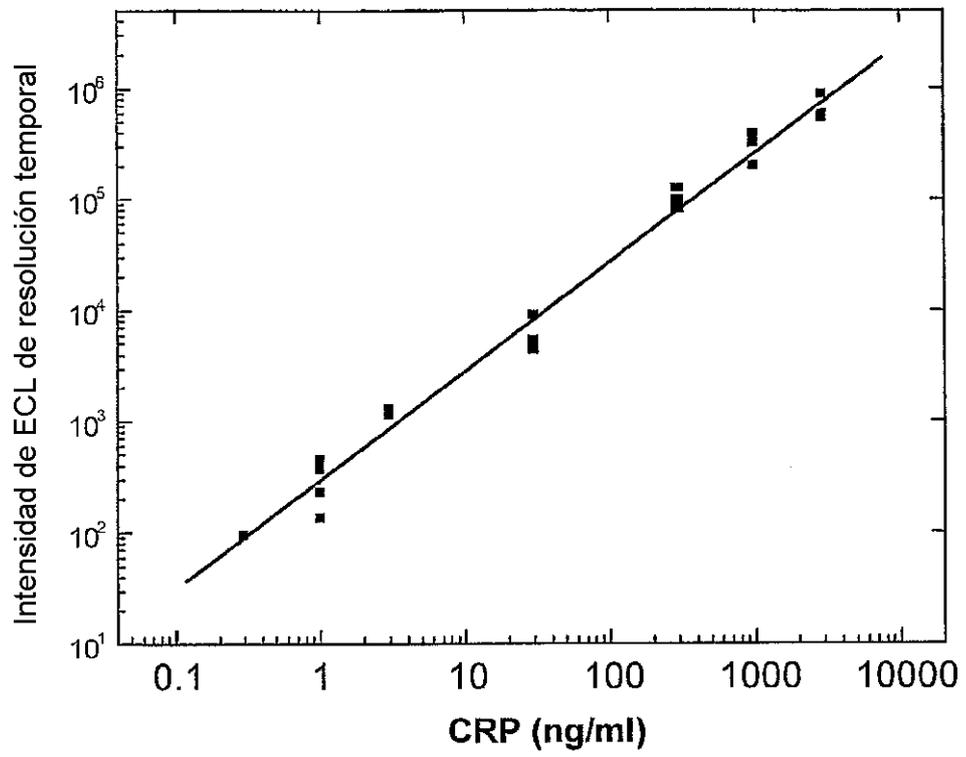
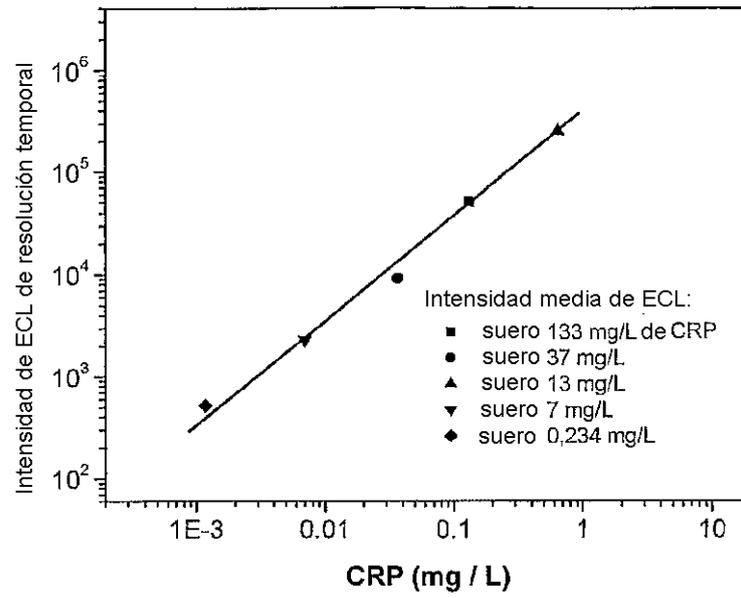


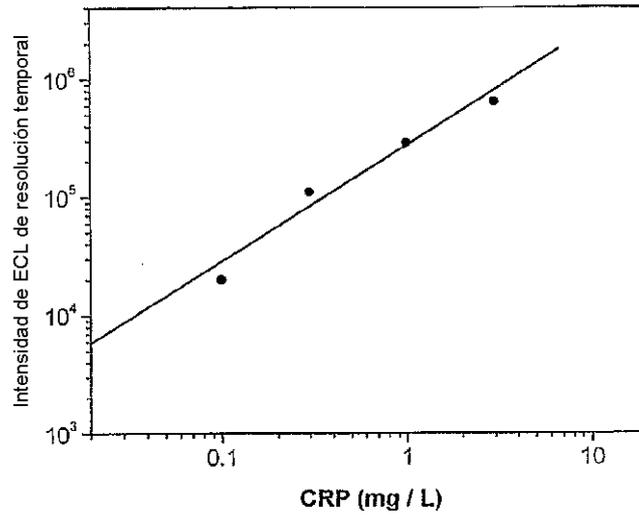
Fig. 12



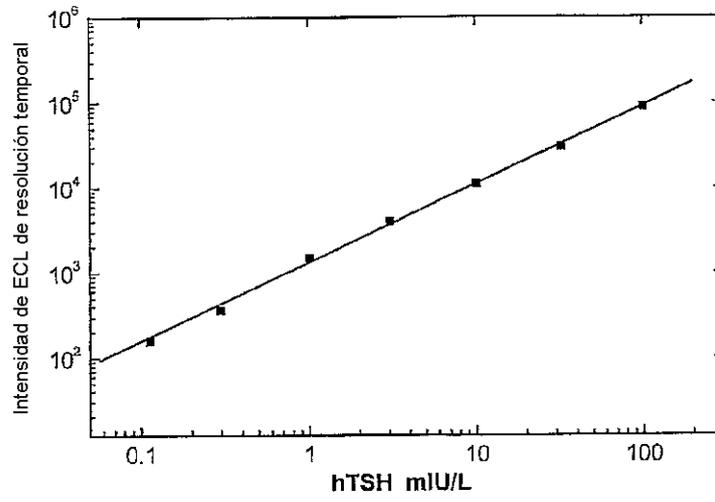
**Fig. 13**



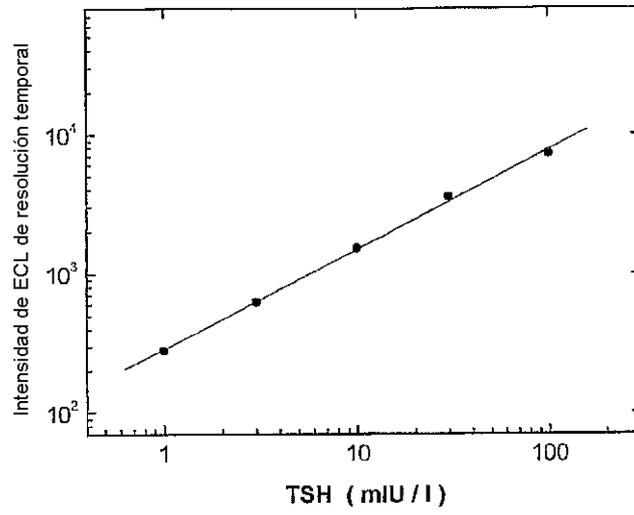
**Fig. 14**



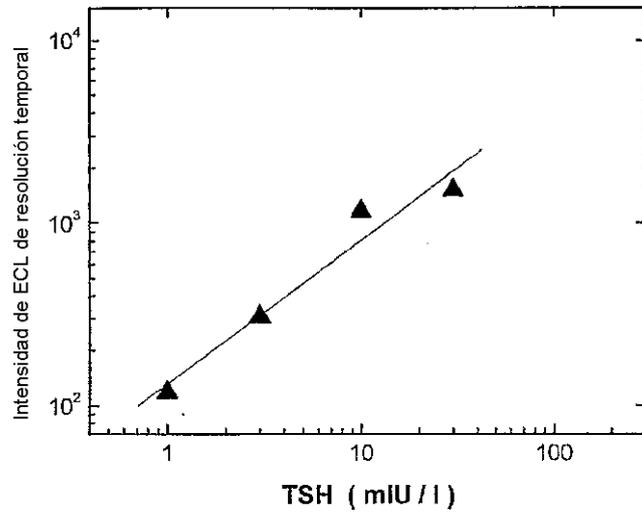
**Fig. 15**



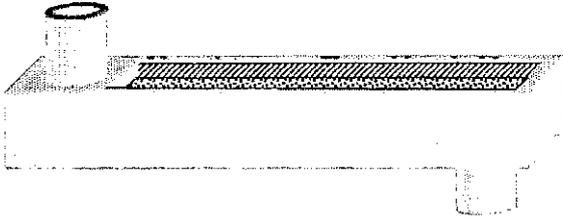
**Fig. 16**



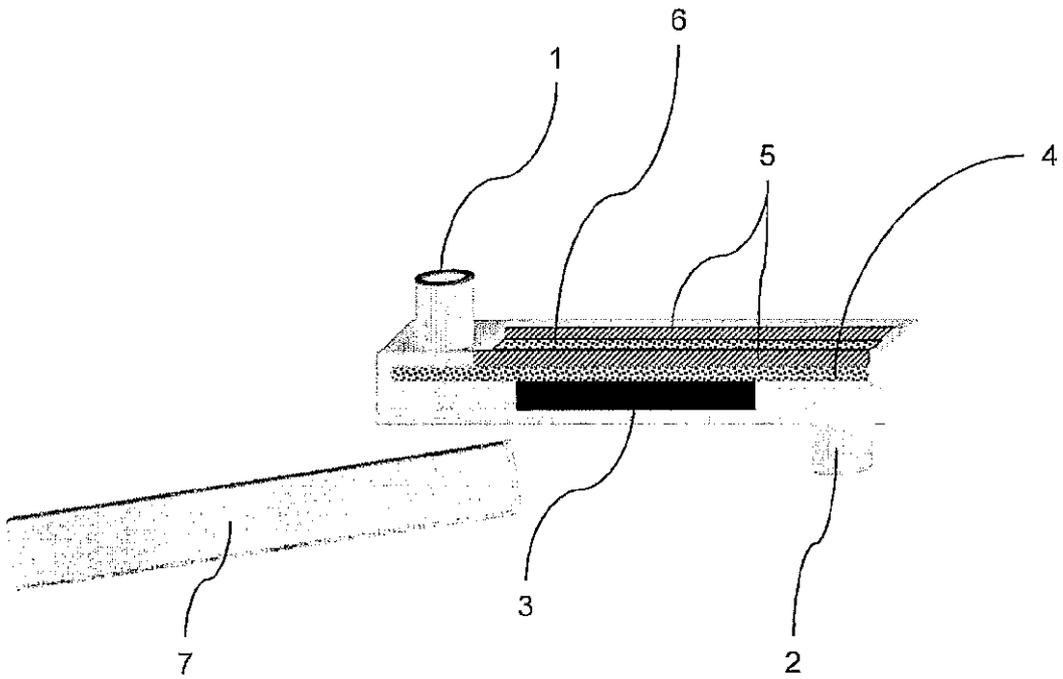
**Fig. 17**



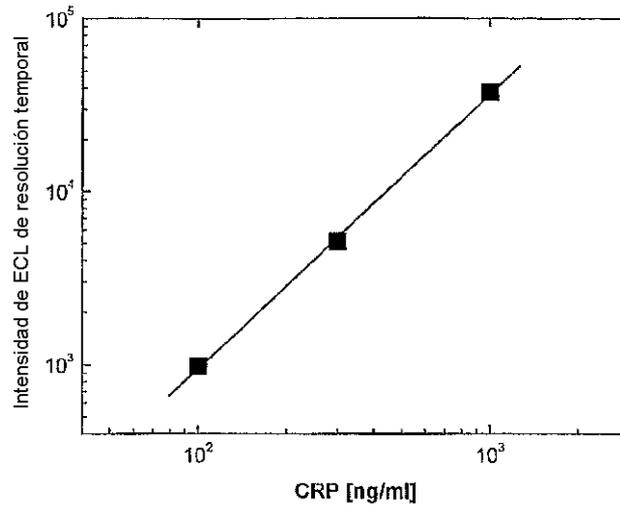
**Fig. 18**



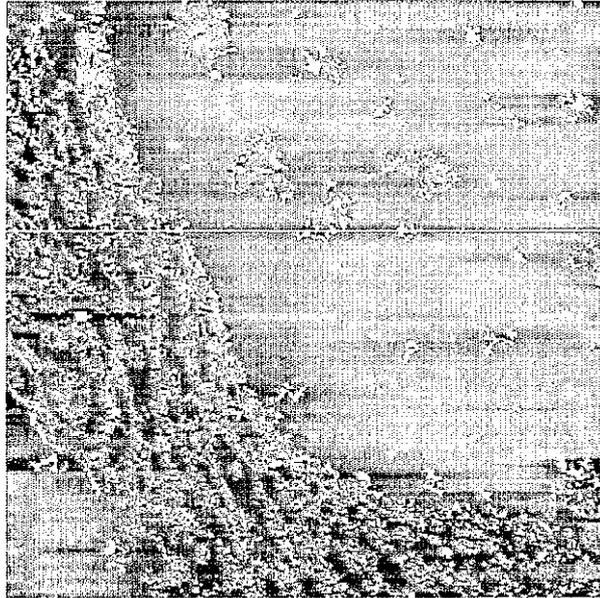
**Fig. 19A**



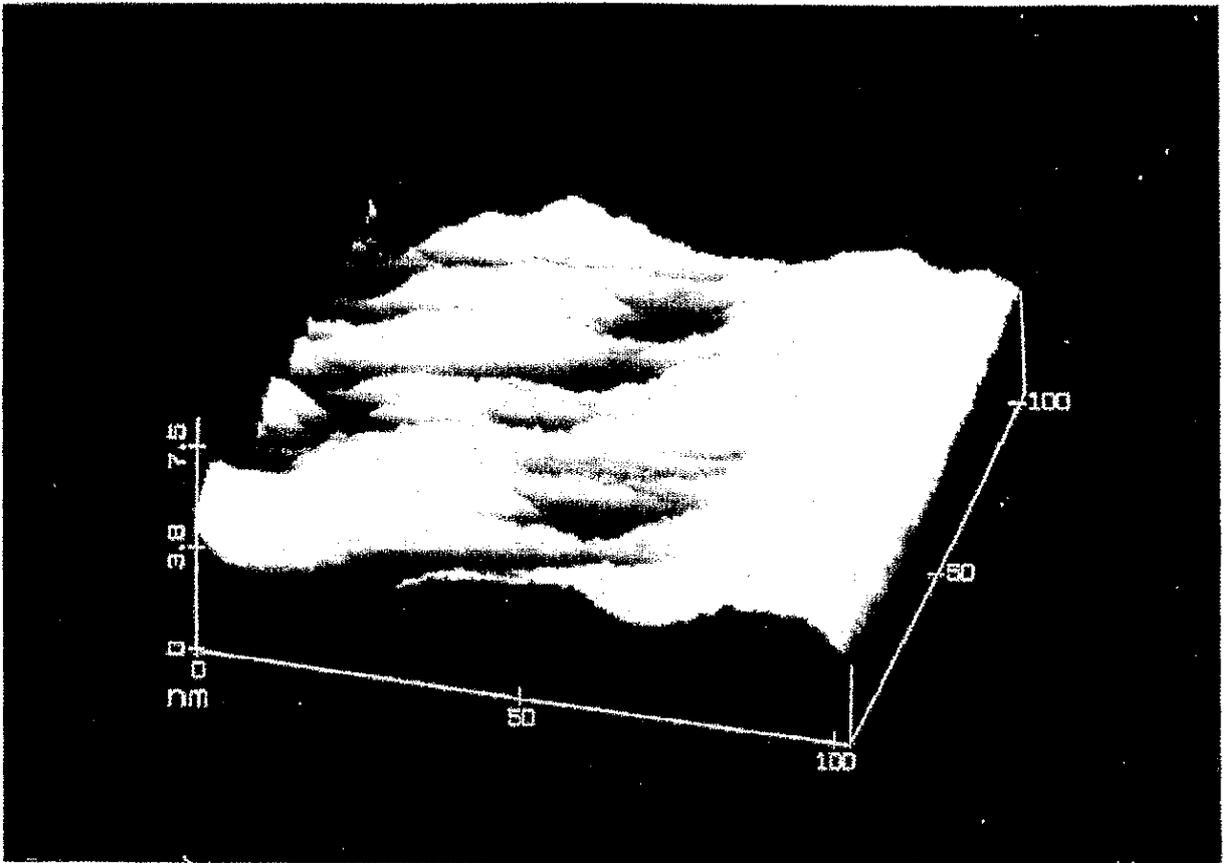
**Fig. 19B**



**Fig. 20**



**Fig. 21**



**Fig. 22**