(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 572 879**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06846006 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 1963853**

(54) Título: **Módulos de ensayo que tienen reactivos de ensayo y métodos para preparar y usar los mismos**

(30) Prioridad:

21.12.2005 US 752745 P
21.12.2005 US 752513 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2016

(73) Titular/es:

MESO SCALE TECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
9238 GAITHER ROAD
GAITHERSBURG, MD 20877, US

(72) Inventor/es:

GLEZER, ELI, N.;
JEFFREY-COKER, BANDELE;
DEBAD, JEFF, D.;
KUMAR, SUDEEP, M.;
SIGAL, GEORGE;
SPIELES, GISBERT;
TSIONKSY, MICHAEL y
WARNOCK, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 572 879 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

Módulos de ensayo que tienen reactivos de ensayo y métodos para preparar y usar los mismos

La invención se refiere a placas de ensayo de múltiples pocillos, métodos para realizar un ensayo y un método para preparar una placa de ensayo de múltiples pocillos. Más particularmente, los ensayos pueden ser ensayos químicos, bioquímicos y/o biológicos. En estos módulos se pueden incorporar reactivos secos y/o en estos métodos se pueden usar reactivos secos.

Se han desarrollado numerosos métodos y sistemas para realizar ensayos químicos, bioquímicos, y/o biológicos. Estos métodos y sistemas son esenciales en una diversidad de aplicaciones que incluyen diagnósticos médicos, ensayos en alimentos y bebidas, control ambiental, preparación de control de calidad, descubrimiento de fármacos, e investigación científica básica.

Dependiendo de la aplicación, es deseable que los métodos y sistemas de ensayo tengan una o más de las siguientes características: i) alto rendimiento, ii) alta sensibilidad, iii) rango dinámico grande, iv) alta precisión y/o exactitud, v) bajo coste, vi) bajo consumo de reactivos, vii) compatibilidad con la instrumentación existente para manipulación y procesamiento de muestras, viii) periodo de tiempo corto hasta el resultado, ix) capacidad de multiplexación, y x) insensibilidad para agentes que interfieren y matrices de muestra complejas. En muchas aplicaciones también es deseable que estos tipos de beneficios de rendimiento se consigan con formatos de ensayo que son fáciles de realizar, son susceptibles de automatización, y/o usan reactivos secos estables. Hay un valor sustancial para nuevos métodos sistemas de ensayo con estas características.

Una diversidad de enfoques se han desarrollado para proporcionar reactivos para ensayos en forma estable seca. El documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.413.732 describe ciertas esferas de reactivo seco que son capaces de disolverse en una solución.

El documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.429.026 describe ciertos inmunoensayos que usan reactivos secos y detección de fluorescencia en tiempo resuelto. Un anticuerpo de captura se inmoviliza en la superficie de un pocillo de microtitulación. Una capa de aislamiento que contiene carbohidrato y/o proteína se seca en la parte superior del anticuerpo de captura en la parte inferior del pocillo. Un anticuerpo etiquetado se añade en un pequeño volumen y se secan en la parte superior de la capa de aislamiento. El anticuerpo se etiqueta con un quelato de lantánido que se puede detectar usando técnicas de fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFIA). Para comenzar el inmunoensayo, se añade una muestra y un tampón de ensayo común. Después de permitir que las reacciones del anticuerpo se produzcan, el pocillo se lava varias veces, se añade un tampón de aumento para DELFIA, y se realiza una medida del tiempo de vida de fluorescencia.

La Publicación U.S. 2003/0108973 describe un inmunoensayo de tipo sándwich que usaba un tubo de ensayo que contiene una mezcla liofilizada que comprende un anticuerpo de captura inmovilizado en perlas de poliestireno magnetizables de 2,8 μm y un anticuerpo de detección etiquetado con una etiqueta electroquimioluminiscente. La mezcla también podría incluir agentes de bloqueo para reducir la unión no específica del anticuerpo de detección a las perlas durante el proceso de liofilización. La adición de muestra que contiene el analito de interés dio como resultado la formación de complejos de tipo sándwich en las perlas. Una suspensión de perlas se aspiro a continuación en una celda de flujo reutilizable en la que se recogieron en un electrodo se analizaron usando técnicas de detección de electroquimioluminiscencia (ECL).

El documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.673.533 de Wohlstadter *et al.,* describe un inmunoensayo de tipo sándwich basado en ECL que usar reactivos secos. Un anticuerpo de captura se inmovilizó en un electrodo compuesto. Los otros reactivos usados en el ensayo se secaron en la superficie del electrodo mediante adición y liofilización de una solución que contenía un anticuerpo de detección unido a una etiqueta de ECL, fosfato, tripropilamina, albúmina de suero bovino, sacarosa, cloroacetamida, y TRITON X-100. Los inmunoensayos se realizaron añadiendo una muestra a los reactivos ecos en los electrodos, incubando las soluciones y aplicando un potencial al electrodo para inducir ECL. No era necesaria etapa de lavado.

Una diversidad de técnicas se han desarrollado para aumentar el rendimiento del ensayo. El uso de placas de ensayo de múltiples pocillos (también conocidas como placas de microtitulación o microplacas) permite el procesamiento y análisis paralelo de múltiples muestras distribuidas en múltiples pocillos una placa. Las placas de ensayo de múltiples pocillos pueden tomar una diversidad de formas, tamaños y figuras. Por conveniencia, han aparecido algunos patrones para instrumentación usados para procesar muestras para ensayos de alto rendimiento. Las placas de ensayo de múltiples pocillos por lo general se fabrican con tamaños y formas convencionales, y tienen disposiciones de los pocillos convencionales. Las disposiciones de los pocillos incluyen las encontradas en las placas de 96 pocillos (matriz de pocillos de 12 x 8), placas de 384 pocillos (matriz de pocillos de 24 x 16), y placas de 1536 pocillos (matriz de pocillos de 48 x 32). La Sociedad para Identificación Sistemática Biomolecular ha publicado especificaciones de microplacas recomendadas para una diversidad de formatos de placa (véase http://www.sbsonline.org).

Las publicaciones U.S. 2004/0022677 y 2005/0052646 de las Solicitudes U.S. 10/185.274 y 10/185.363, respectivamente, de Wohlstadter *et al.* describen soluciones que son útiles para realizar ensayos de ECL singleplex y multiplex en un formato de placa de múltiples pocillos. Estas incluyen placas que comprenden una parte superior de la placa con agujeros con salida que forman las paredes de los pocillos y la parte inferior de la placa sellado frente a la parte superior de la placa para formar la parte inferior de los pocillos. La parte inferior de la placa tiene capas de patrón conductor que proporcionan los pocillos con superficies de electrodo que actúan tanto como soportes de fase sólida para reacciones de unión así como electrodos para inducir ECL. Las capas conductoras también pueden incluir contactos eléctricos para aplicar energía eléctrica a las superficies del electrodo.

El documento US 2004/0189311 A1 desvela cartuchos de ensayo y métodos de uso de cartuchos de ensayo.

A pesar de tales métodos y sistemas conocidos para la realización de ensayos, se necesitan módulos de ensayo mejores para realizar ensayos químicos, bioquímicos, y/o biológicos.

La invención se refiere a módulos de ensayo (por ejemplo, placas de ensayo, cartuchos, o placas de ensayo de múltiples pocillos, recipientes de reacción, etc.), que tienen reactivos de ensayo cargados previamente en los pocillos, cámaras o regiones de ensayo del módulo de ensayo. Estos reactivos de ensayo se pueden almacenar en un estado seco. Además, los módulos de ensayo pueden comprender materiales desecantes para mantener estos reactivos de ensayo en un estado seco estable. Se proporciona un método para preparar tales módulos y métodos de ensayo para usar los módulos de ensayo en ensayos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una placa de ensayo de múltiples pocillos como se define en la reivindicación 1.

Opcionalmente, la superficie de unión se puede seleccionar para que sea adecuada para uso como un electrodo en un ensayo electroquímico o ensayo de electroquimioluminiscencia. Además, las superficies de unión se pueden revestir con una capa protectora reconstituible. El reactivo seco puede ser un reactivo de detección etiquetado. Una superficie de unión puede estar situada en la parte inferior del pocillo y el reactivo seco reconstituible puede estar situado en una pared del pocillo y, opcionalmente, en una repisa de almacenamiento de reactivo definida en la pared. Como alternativa, tanto la superficie de unión como el reactivo seco reconstituible se pueden situar en regiones que no se superponen de la superficie inferior del pocillo. En un ejemplo no reivindicado, el reactivo seco reconstituible es una cápsula independiente.

La placa de ensayo de múltiples pocillos puede comprender adicionalmente un analito de control de ensayo seco reconstituible que puede tener afinidad de unión hacia el reactivo de captura inmovilizado y/o, si estuviera presente, el reactivo de detección etiquetado. El analito de control puede tener afinidad hacia reactivos de captura inmovilizados y/o reactivos de detección etiquetados dentro del pocillo, pero puede estar presente en una forma no unida que no está en contacto con la superficie de unión o reactivo de detección etiquetado.

La placa de ensayo de múltiples pocillos puede comprender adicionalmente uno o más reactivos de captura inmovilizados adicionales. El reactivo de captura y los reactivos de captura adicionales forman patrones en la superficie de unión para formar una matriz de dominios de unión en la superficie de unión. Estos dominios de unión/reactivos de captura pueden diferenciarse en la especificidad o afinidad hacia patrones de unión. Además, los pocillos pueden contener una pluralidad de diferentes reactivos de detección etiquetados secos reconstituibles que se diferencia en la especificidad o afinidad hacia patrones de unión.

Se desvela una placa de múltiples pocillos que comprende al menos un pocillo que tiene (1) una superficie de unión que tiene un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma y (2) al menos un reactivo seco adicional, en la que al menos un reactivo seco adicional no está en contacto con la superficie de unión. La placa de múltiples pocillos puede tener una superficie de electrodo con una superficie de unión incorporada en al menos un pocillo de la placa de múltiples pocillos.

Las placas de múltiples pocillos, descritas anteriormente, se pueden usar en métodos para realizar ensayos que comprenden añadir muestra a uno o más de los pocillos de una placa que comprende reactivos de captura inmovilizados y reactivos de detección etiquetados secos reconstituibles, reconstituir materiales secos reconstituibles en estos pocillos para formar una mezcla(s) de reacción, incubar la mezcla(s) de reacción en condiciones que estimulan la unión de dichos reactivos de captura y detección a sus correspondientes compañeros de unión, y medir la formación de complejos que comprenden los reactivos de captura inmovilizados y reactivos de unión etiquetados. Mediante la elección apropiada de reactivos de captura y detección, estos métodos pueden incluir métodos de ensayo de unión de tipo sándwich y métodos de ensayo de unión competitiva.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para preparar una placa de ensayo de múltiples pocillos como se define en la reivindicación 9.

El método también puede incluir la distribución de un reactivo de protección en la superficie de unión y el secado del reactivo de protección para formar una capa protectora seca reconstituible en la superficie de unión. Por ejemplo, el

reactivo de protección se distribuye y se seca antes de distribuir el reactivo líquido que comprende un reactivo de detección etiquetado.

La superficie de unión puede estar en una superficie de la parte inferior del pocillo y el reactivo líquido se puede distribuir y secar en una superficie de la parte inferior del pocillo que no se superpone o en una pared del pocillo. Opcionalmente, la pared comprende una repisa de almacenamiento de líquido y el reactivo líquido (i) se distribuye y se seca en la repisa o (ii) se distribuye en la pared en una posición por encima de la repisa de modo que el reactivo líquido que fluye por la pared se recoge y posteriormente se seca en la repisa.

Los métodos para preparar placas pueden comprender adicionalmente la inmovilización de uno o más reactivos de captura adicionales para formar una matriz de dominios de unión en la superficie de unión que se diferencian en su especificidad o afinidad hacia compañeros de unión. De forma análoga, el reactivo líquido puede comprender uno o más reactivos de detección etiquetados adicionales que se diferencian en su especificidad o afinidad hacia compañeros de unión. Además, el método puede incluir la distribución y secado de un reactivo líquido adicional que comprende un analito de control de ensayo con afinidad de unión hacia el reactivo de captura o de detección etiquetado, siendo el reactivo líquido adicional distribuido y secado de modo que no se pone en contacto con los reactivos de captura o de detección etiquetados.

En un ejemplo no reivindicado, la distribución y secado de un reactivo líquido que comprende un reactivo de detección etiquetado se omiten y se añade un reactivo de detección etiquetado seco reconstituible en forma independiente, por ejemplo, como una pastilla independiente. Preferentemente, antes de añadir el reactivo de detección, un reactivo de protección se distribuye y se seca en la superficie de unión para formar una capa protectora reconstituible. El método también puede incluir la inmovilización de uno o más reactivos de captura adicionales para formar una matriz de dominios de unión en dicha superficie de unión que se diferencian en su especificidad o afinidad hacia compañeros de unión. De forma análoga, el reactivo seco reconstituible puede comprender uno o más reactivos de detección etiquetados adicionales que se diferencian en su especificidad o afinidad hacia compañeros de unión. Además, el método puede incluir la adición al pocillo de un reactivos eco independiente adicional que comprende un analito de control de ensayo que tiene afinidad de unión hacia los reactivos de captura y/o detección.

Se desvela una placa de múltiples pocillos que comprende un cuerpo de la placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que incluye: a) una pluralidad de pocillos de primer reactivo que contienen un primer reactivo seco reconstituible y b) una pluralidad de pocillos del segundo reactivo que contienen un segundo reactivo seco, en la que, el primer y segundo reactivos son reactivos emparejados para realizar un ensayo. Se desvela un método para realizar ensayos en estas placas que comprende: a) añadir una muestra a uno de los pocillos de primer reactivo, a) reconstituir reactivos de detección etiquetados secos reconstituibles en el pocillo del primer reactivo para formar una mezcla de reacción, c) transferir una alícuota de la mezcla de reacción a uno o más de los pocillos del segundo reactivo, y d) incubar la mezcla de reacción en el pocillo(s) del segundo reactivo para realizar dicho ensayo en dicha muestra. La placa de ensayo de múltiples pocillos puede ser capaz de dividirse en una pluralidad de conjuntos de pocillos que consisten en un pocillo del primer reactivo y uno o más pocillos del segundo reactivo y el método puede comprender adicionalmente la repetición del proceso de (a)-(d) para cada conjunto de pocillos.

Los pocillos del primer reactivo se pueden colocar en un patrón de dos dimensiones regular y dichos pocillos del primer reactivo tienen suelos de pocillos y paredes de pocillos, teniendo las paredes del pocillo superficies de pared interna y superficies de pared externa. Además, los pocillos del segundo reactivo pueden tener suelos del pocillo y paredes del pocillo, estando las paredes del pocillo definidas por superficies de pared externa de los pocillos de detección y por elementos de resalte que conectan las superficies de la pared externa de pocillos de detección adyacentes. Opcionalmente, los pocillos del primer reactivo tienen perímetros de abertura del pocillo que son redondos y/o los pocillos del primer reactivo se colocan en una matriz cuadrada de 8 x 12.

Se desvela una placa de ensayo de múltiples pocillos que comprende un cuerpo de placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que incluye: a) una pluralidad de pocillos de detección, comprendiendo cada pocillo de detección una superficie de unión que tiene un reactivo de captura inmovilizado en la misma y b) una pluralidad de pocillos de reconstitución de reactivo, comprendiendo cada pocillos de reconstitución de reactivo un reactivo de detección etiquetado reconstituible, en la que, al menos un pocillo de detección y un pocillo de reconstitución de reactivo comprenden reactivos de captura y detección emparejados para medir un analito de interés. Opcionalmente, la superficie de unión se puede seleccionar para que sea adecuada para uso como un electrodo en un ensayo electroquímico o de electroquimioluminiscencia. Los pocillos de detección y de reconstitución de reactivo se pueden agrupar en una pluralidad de conjuntos de ensayo que consisten en un pocillo de reconstitución de reactivo y uno o más pocillos de detección, el pocillo de reconstitución de reactivo y los pocillos de detección dentro de un conjunto que comprende reactivos de captura y detección emparejados para medir un analito de interés. Estos como justos pueden consistir en un pocillo de reconstitución de reactivo y un pocillo de detección.

La placa de múltiples pocillos con un pocillo de detección y pocillos de reconstitución de reactivo puede incluir:

a) una pluralidad de pocillos de detección, en la que dichos pocillos de detección,

i) tienen suelos de pocillo y paredes de pocillo, teniendo dichas paredes del pocillo superficies de pared interna y superficies de pared externa,
ii) se colocan en un patrón de dos dimensiones regular, y
iii) comprenden, en una superficie interna de cada uno de dichos pocillos de detección, una superficie de unión que tiene un reactivo de captura inmovilizado en la misma matriz;

b) una pluralidad de pocillos de reconstitución de reactivo, en la que dichos pocillos de reconstitución de reactivo

i) se colocan en un patrón de dos dimensiones regular, estando dichas paredes del pocillo definidas por superficies de pared externa de dichos pocillos de detección y por elementos de resalte que conectan las superficies de la pared externa de pocillos de detección adyacentes, y
ii) comprenden, en cada pocillo de reconstitución de reactivo, un reactivo de detección etiquetado seco reconstituible.

Opcionalmente, los pocillos de detección tienen perímetros de abertura del pocillo que no tienen ángulos o curvas de reentrada (por ejemplo, perímetros redondos) y los pocillos de reconstitución de reactivo tienen perímetros de abertura del pocillo con ángulos o curvas de reentrada.

Los pocillos de detección o de reconstitución de reactivo de las placas de múltiples pocillos con pocillos de detección y pocillos de reconstitución de reactivo pueden comprender adicionalmente un analito de control de ensayo seco reconstituible. Los pocillos de detección también pueden comprender uno o más reactivos de captura inmovilizados adicionales. Los reactivos de captura se modelan para formar una matriz modelada de dominios de unión en la superficie de unión que se diferencia en la especificidad o afinidad hacia patrones de unión. Además, el reactivo seco reconstituible puede comprender adicionalmente uno o más reactivos de detección etiquetados adicionales, diferenciándose el reactivo de detección y los reactivos de detección adicionales en la especificidad o afinidad hacia compañeros de unión.

Se desvela un método para realizar ensayos en placas de múltiples pocillos con pocillos de detección y pocillos de reconstitución de reactivo. El método puede comprender a) añadir una muestra a uno de los pocillos de reconstitución de reactivo, a) reconstituir reactivos de detección etiquetados secos reconstituibles en el bolsillo de reconstitución para formar una mezcla(s) de reacción, c) transferir una alícuota de la mezcla de reacción a uno o más pocillos de detección, c) incubar la mezcla de reacción en el pocillo(s) de detección en condiciones que estimulan la unión de los reactivos de captura y detección a sus correspondientes compañeros de unión, y d) medir la formación de complejos que comprenden los reactivos de captura inmovilizados y el reactivo de unión etiquetado. Opcionalmente, la placa de ensayo de múltiples pocillos se puede dividir en una pluralidad de conjuntos de pocillos que consiste en un pocillo del primer reactivo y uno o más pocillos del segundo reactivo y el método comprende adicionalmente la repetición del proceso de (a)-(d) para cada uno de dicho conjunto de pocillos.

Se desvela una placa de ensayo de múltiples pocillos que comprende un cuerpo de la placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que tiene suelos de pocillo y paredes de pocillo que se extienden desde dichos suelos hasta una altura h_w por encima de dichos suelos, dándose forma a dichas paredes para proporcionar elementos de repisa a una altura h_s en la que $0 < h_s < h_w$. Los pocillos se pueden colocar en formatos de placa de múltiples pocillos que incluyen matrices de 4 x 6, 8 x 12, 16 x 24, y 32 x 48 de pocillos colocados en matrices cuadradas. h_s puede ser mayor o igual que 0,02 h_w, 0,05 h_w o 0,1 h_w pero menor o igual que 0,1 h_w, 0,25 h_w o 0,5 h_w. h_s puede ser mayor o igual que aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,5 mm, o 1 mm pero menor o igual que aproximadamente 1 mm, 2 mm, o 5 mm. Los elementos de repisa se pueden usar para contener reactivos secos. Por lo tanto, se desvela una placa con reactivos secos reconstituibles en las repisas.

Se desvela un método para preparar placas para uso en un ensayo que comprende distribuir un reactivo líquido en un pocillo de una placa de múltiples pocillos que tiene un elemento de repisa y secar el reactivo para formar un reactivo seco reconstituible, en el que el reactivo se distribuye y se seca en la repisa o se distribuye en la pared por encima de la repisa y se seca de modo que el reactivo líquido que fluye se recoge y se seca en la repisa.

El cuerpo de la placa puede ser una parte moldeada por inyección de una pieza. El cuerpo de la placa puede comprender una parte superior de la placa que tiene una pluralidad de agujeros con salida que definen las paredes del pocillo y una parte inferior de la placa que se cierra herméticamente frente a dicha parte superior de la placa y define los suelos del pocillo. Opcionalmente, la parte inferior de la placa proporciona superficies de electrodo conductoras que están expuestas al volumen interior de los pocillos que se pueden usar como electrodos en ensayos electroquímicos o ensayos de electroquimioluminiscencia.

Se desvela una placa de múltiples pocillos que comprende

a) un cuerpo de la placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que incluye:

i) una pluralidad de pocillos de ensayo que comprenden un reactivo de ensayo seco; y
ii) una pluralidad de pocillos con desecante que comprenden un desecante, y

b) un cierre de placa sellado frente a dicho cuerpo de la placa, aislando de ese modo dicha pluralidad de pocillos del entorno externo.

Opcionalmente, la placa se coloca de modo que los pocillos están en una disposición convencional de pocillos (por ejemplo, matrices de 4 x 6, 8 x 12, 16 x 24 o 32 x 48 de pocillos colocados en una matriz cuadrada). Algunas configuraciones adecuadas de los pocillos de ensayo incluyen, pero no se limitan a, pocillos con reactivos secos (por ejemplo, reactivos de captura y/o detección) como se ha descrito anteriormente. De forma ventajosa, los pocillos con desecante pueden estar conectados con conductos de secado a los pocillos de ensayo, permitiendo los conductos la difusión del vapor de agua de los pocillos de ensayo a los pocillos con desecante pero asciende intersección con los pocillos a una altura en el pocillo de ensayo por encima de la posición del reactivo de ensayo seco. Tales conductos se pueden proporcionar mediante sellado del cierre de la placa frente a canales rebajados en la superficie superior del cuerpo de la placa que conectan los pocillos de ensayo a pocillos con desecante. Los pocillos de dicha placa pueden dividir en una pluralidad de paneles de ensayo que comprenden al menos un pocillo de ensayo y al menos un pocillo con desecante. Los pocillos en un panel de ensayo están interconectados a través de conductos de secado pero no están conectados a los pocillos en otros paneles de ensayo. Un panel de ensayo puede comprender un pocillo de ensayo y un pocillo con desecante.

El pocillo de ensayo puede comprender una superficie de unión que tiene un reactivo de captura inmovilizado en la misma y un reactivo de detección etiquetado seco reconstituible. El pocillo de ensayo puede comprender adicionalmente uno o más reactivos de captura inmovilizados adicionales, formando el reactivo de captura y reactivos de captura adicionales una matriz configurada de dominios de unión en dicha superficie de unión, diferenciándose los dominios de unión en la especificidad o afinidad hacia compañeros de unión. Además, el reactivo seco reconstituible puede comprender adicionalmente uno o más reactivos de detección etiquetados adicionales, diferenciándose el reactivo de detección y reactivos de detección adicionales en la especificidad o afinidad hacia compañeros de unión. Opcionalmente, la superficie de unión es adecuada para uso común electrodo en un ensayo de electroquimioluminiscencia.

El cuerpo de la placa puede ser una parte moldeada por inyección de una pieza. Como alternativa, el cuerpo de la placa puede comprender una parte superior de la placa que tiene una pluralidad de agujeros con salida que definen las paredes del pocillo y una parte inferior de la placa que se cierra herméticamente frente a dicha parte superior de la placa y define los suelos del pocillo. Dichos agujeros con salida y la parte inferior de la placa se pueden definir todos los pocillos o solamente en una parte de los pocillos, por ejemplo, solamente dichos pocillos de ensayo o solamente dichos pocillos con desecante. La parte inferior de la placa puede proporcionar, opcionalmente, superficies de electrodo conductoras que están expuestas al volumen interior de los pocillos.

Se desvela una placa de múltiples pocillos que comprende

a) un cuerpo de la placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que contiene un reactivo de ensayo seco, comprendiendo dicho cuerpo de la placa una parte superior de la placa que tiene una pluralidad de agujeros con salida que definen paredes del pocillo y la parte inferior de la placa que se cierra herméticamente frente a dicha parte superior de la placa y define los suelos del pocillo,
b) un cierre de placa sellado frente a dicho cuerpo de la placa, aislando de ese modo dicha pluralidad de pocillos del entorno externo, y
c) un material desecante.

Opcionalmente, la placa se coloca de modo que los pocillos están en una disposición convencional de pocillos (por ejemplo, matrices de 4 x 6, 8 x 12, 16 x 24 o 32 x 48 de pocillos colocados en una matriz cuadrada). Opcionalmente, la parte inferior de la placa puede proporcionar superficies de electrodo conductoras que están expuestas al volumen interior de los pocillos. Algunas configuraciones adecuadas de pocillos de ensayo incluyen, pero no se limitan a, pocillos con reactivos secos (por ejemplo, reactivos de captura y/o detección) como se ha descrito anteriormente. El desecante puede está contenido en el cierre de la placa, una capa de junta entre el cierre de la placa y la parte superior de la placa, la parte superior de la placa, una capa de junta entre la parte superior de la placa y la parte inferior de la placa y/o la parte inferior de la placa. Por ejemplo, el desecante puede estar impregnado en estos componentes o en un revestimiento en estos componentes, etc. Como alternativa, el cuerpo de la placa puede definir uno o más pocillos adicionales que contienen el desecante.

El pocillo de ensayo puede comprender una superficie de unión que tiene un reactivo de captura inmovilizado en la misma y un reactivo de detección etiquetado reconstituible seco. Opcionalmente, la superficie de unión es adecuada para uso como un electrodo en ensayos electroquímicos o de electroquimioluminiscencia. El pocillo de ensayo puede comprender adicionalmente uno o más reactivos de captura inmovilizados adicionales, formando el reactivo de captura y reactivos de captura adicionales una matriz configurada de dominios de unión en dicha superficie de unión que se diferencia en la especificidad o afinidad hacia patrones de unión. Además, el reactivo seco reconstituible puede comprender adicionalmente uno o más reactivos de detección etiquetados adicionales, diferenciándose el reactivo de detección y reactivos de detección adicionales en la especificidad o afinidad hacia compañeros de unión.

La presente invención se describirá a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas enumeradas a continuación.

Las Figuras 1a-1e muestran vistas esquemáticas no a escala de varias realizaciones de pocillos de placa de múltiples pocillos que incluyen reactivos secos.
Las Figuras 2a-2j muestran esquemáticas vistas superiores y en sección transversal no a escala de varias realizaciones de pocillos con elementos de repisa que incluyen salientes (Figuras 2a-2f), puentes (Figuras 2g-2h) y tabiques (Figuras 2i-2j) que se pueden usar para soportar reactivos secos.
Las Figuras 3a-3c muestran ilustraciones esquemáticas de placas de múltiples pocillos que tienen pocillos de detección y pocillos de reconstitución de reactivo.
Las Figuras 4a-4b muestran esquemáticas vistas superiores y en sección transversal de una realización de una placa que tiene pocillos de detección y pocillos de reconstitución de reactivo, estando los pocillos de reconstitución de reactivo situados en espacios intersticiales entre los pocillos de detección.
Las Figuras 5a-5f muestran vistas esquemáticas de placas de múltiples pocillos 500 (Figuras 5a-5b), 520 (Figuras 5c-5d) y 540 (Figuras 5e-5f) que tienen pocillos de ensayo y pocillos con desecante.
La Figura 6 es una vista esquemática de las piezas de una realización de una placa de ensayo de múltiples pocillos.
Las Figuras 7a-7c muestran tres vistas esquemáticas de una placa de múltiples pocillos que está configurada para realizar ensayos de electroquimioluminiscencia multiplexados basados en matriz.
La Figura 8 muestra una realización de una placa de pocillos cuadrada con salientes de reactivo seco y siete aplicaciones puntuales por pocillo.
La Figura 9 muestra una realización de una placa de pocillos cuadrada con salientes de reactivo seco, siete aplicaciones puntuales por pocillo, y conductos de secado entre padres de pocillos adyacentes.
La Figura 10 muestra el efecto de la incorporación de pocillos con desecante en placas de ensayo en la estabilidad de reactivos secos almacenados en las placas.

Los inventores describen módulos de ensayo (por ejemplo, placas de ensayo, cartuchos, placas de ensayo de múltiples pocillos, recipientes de reacción, etc.) que tienen reactivos de ensayo cargados previamente en las paredes, cámaras o regiones de ensayo del módulo de ensayo. En ciertas realizaciones, estos reactivos de ensayo se almacenan en un estado seco. Además, los módulos de ensayo pueden comprender materiales desecantes para mantener los reactivos de ensayo en un estado seco. Los módulos de ensayo cargados previamente con los reactivos de ensayo pueden aumentar en gran medida la velocidad y reducir la complejidad de las medidas del ensayo a la vez que mantienen una estabilidad excelente durante el almacenamiento. Los inventores también describen métodos para preparar tales módulos de ensayo y métodos para usarlos módulos de ensayo en ensayos.

Los reactivos de ensayo seco pueden ser cualquier reactivo de ensayo que se pueda secar y a continuación reconstituirse antes de su uso en un ensayo. Estos incluyen, pero no se limitan a, reactivos de unión útiles en ensayos de unión, enzimas, sustratos enzimáticos, colorantes indicadores y otros compuestos reactivos que se pueden usar para detectar un analito de interés. Los reactivos de ensayo también pueden incluir sustancias que no están directamente implicadas en el mecanismo de detección, sino que desempeñan un papel auxiliar en un ensayo incluyendo, pero no limitado a, agentes de bloqueo, agentes estabilizantes, detergentes, sales, tampones de pH, conservantes, etc. Los reactivos pueden estar soportados en fases sólidas que incluyen las superficies de repisas (por ejemplo, cámaras, canales, celdas de flujo, pocillos, etc.) en los módulos de ensayo o las superficies de coloides, perlas, u otros soportes de partículas. En un ejemplo no reivindicado, los reactivos pueden estar presentes en forma libre. En ciertas organizaciones, está incluido un reactivo seco (por ejemplo, un reactivo seco reconstituible) que comprende fosfato de amonio como un componente tampón, comprende otras sales de amonio, y/o comprende menos de aproximadamente un 1 % (p/p) de iones de sodio o de potasio.

Muchas de las realizaciones se describirán en el contexto de placas de múltiples pocillos que albergan y reactivos de captura y detección secos para ensayos de unión en los que los reactivos de captura y detección se almacenan en la placa de una manera que les impide entrar en contacto entre sí. Pero para el experto en la materia será evidente que tales realizaciones se pueden aplicar de manera más general para el almacenamiento de cualquier número de diferentes reactivos de ensayo seco (tanto si son reactivos de unión, inmovilizados o no, etiquetados o no, etc.) de una manera que evita que entren en contacto entre sí antes de su uso. De forma análoga, aunque muchas de las figuras usan un símbolo "Y" para representar reactivos o reactivos de unión, el uso de este símbolo no se debería interpretar como una limitación de estos reactivos a anticuerpos a menos que se indique de forma específica. También será evidente que las realizaciones se pueden aplicar de manera más general para reactivos de ensayo almacenados en otros tipos de módulos de ensayo en repisas distintas de los pocillos (por ejemplo, cámaras, canales, celdas de flujo, etc.).

La expresión "reconstituible seco" se puede usar para hacer referencia a reactivos secos como en reactivos secos reconstituibles con reactivos etiquetados de detección o capas protectoras reconstituibles secas, etc. Esta terminología se usa para hace referencia a reactivos secos que se reconstituyen mediante la adición de una muestra o disolvente para formar una solución o suspensión. Preferentemente, son solubles en agua o se pueden reconstituir de otro modo mediante la adición de una muestra acuosa. En comparación, un reactivo "inmovilizado", como se usa el término en el presente documento, se refiere al reactivo que normalmente permanecerá en una superficie después

de la adición de una muestra durante la realización de un ensayo, aunque puede haber condiciones específicas que se pueden usar para disociarlo activamente de la superficie.

Algunos reactivos secos reconstituibles se pueden preparar *in situ* en un compartimiento de un módulo de ensayo (por ejemplo, en el pocillo de una placa de ensayo de múltiples pocillos). A modo de ejemplo, un volumen de un reactivo líquido se puede distribuir en el pocillo u otra repisa y secar (por ejemplo, por secado al aire, secado al vacío, liofilización, etc.) para formar el reactivo seco reconstituible. Mediante la adición de un pequeño volumen que permanece confinado en una superficie separada de la repisa (por ejemplo, una ubicación separada en la parte inferior o en la pared de un pocillo), el reactivo seco resultante puede permanecer de manera confinado de manera fija en esa ubicación. Como alternativa, se puede añadir un volumen que es suficiente para extenderse a través de la superficie de la parte inferior o para llenar el compartimiento/pocillo con el fin de formar una capa de reactivo seco sobre las superficies en contacto. En un ejemplo no reivindicado, los reactivos secos reconstituibles se pueden preparar fuera del módulo de ensayo y se añaden a una repisa del módulo (por ejemplo, un pocillo de una placa de múltiples pocillos) en forma seca (por ejemplo, como un polvo seco o como una pastilla seca independiente). En el presente documento, pastilla se refiere a un objeto seco contiguo tal como un comprimido prensado seco o una perla seca liofilizada (al igual que en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.413.732).

Algunas realizaciones incluyen o emplean reactivos de unión secos que son útiles en la realización de ensayos de unión. Algunos reactivos de unión que se pueden usar en los módulos de ensayo y métodos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, receptores, ligandos, haptenos, antígenos, epítopos, mimítopos, aptámeros, compañeros de hibridación, y agentes de intercalado. Algunas composiciones de reactivo de unión adecuadas incluyen, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, esteroides, hormonas, lípidos, polisacáridos y combinaciones de los mismos. Se ha demostrado que algunos ácidos nucleicos y proteínas (en particular, anticuerpos) son especialmente útiles en ensayos de unión. El experto en la materia será capaz de identificar reactivos de unión apropiados para una aplicación específica. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye moléculas intactas de anticuerpo (incluyendo anticuerpos híbridos ensamblados por reasociación *in vitro* de subunidades de anticuerpo), fragmentos de anticuerpo y construcciones de proteína recombinante que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo (tal como se describe, por ejemplo, en Porter y Weir, J. Cell. Physiol., 67 (Supl. 1): 51-64, 1966 y Hochman *et al.,* Biochemistry 12: 1130-1135, 1973). El término también incluye moléculas de anticuerpo intacto, fragmentos de anticuerpo y construcciones de anticuerpo que se han modificado químicamente, por ejemplo, mediante la introducción de una etiqueta. Como se usa en el presente documento, el término ácido nucleico se aplica generalmente para incluir no solamente ADN y ARN sino también análogos (tales como ácidos nucleicos peptídicos o ácidos nucleicos unidos a fosforotioato vinculado) que pueden participar en reacciones de hibridación de Watson-Crick o Hoogstein específicas con secuencias de ADN o ARN y también incluye ácidos nucleicos y análogos que se han modificado químicamente, por ejemplo, mediante la introducción de una etiqueta.

La expresión "reactivo de captura" se usa en el presente documento para hacer referencia a reactivos que están inmovilizados en la superficie para formar una superficie de unión para su uso en un ensayo de unión en fase sólida de unión. Los módulos y métodos de ensayo también pueden usar o incluir otro reactivo de unión, "el reactivo de detección", cuya participación en las reacciones de unión en la superficie de unión se puede medir. Los reactivos de detección se pueden medir mediante la medida de una característica intrínseca del reactivo tal como color, luminiscencia, radiactividad, campo magnético, carga, índice de refracción, masa, actividad química, etc. Como alternativa, el reactivo de detección se puede etiquetar con una etiqueta detectable y medir mediante la medida de una característica de la etiqueta. Algunos marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, etiquetas seleccionadas entre el grupo que consiste en etiquetas de electroquimioluminiscencia, etiquetas luminiscentes, etiquetas fluorescentes, etiquetas fosforescentes, etiquetas radiactivas, etiquetas enzimáticas, etiquetas electroactivas, etiquetas magnéticas y etiquetas de dispersión de luz.

Algunos ensayos que se pueden realizar incluyen "ensayos de tipo sándwich" que usan un reactivo de captura inmovilizado y un reactivo de detección que se puede unir de forma simultánea a un analito de interés con el fin de tener el efecto de secuestrar el reactivo de detección en la superficie de unión. Por lo tanto, la presencia del analito se puede medir mediante la medida de la acumulación de reactivo de detección en la superficie. Algunos ensayos también pueden incluir "ensayos competitivos" que i) usan un reactivo de captura inmovilizado que compite con un analito para unirse a un reactivo de detección o ii) un reactivo de detección que compite con un analito para unirse a un reactivo de captura inmovilizado. En el caso del ensayo competitivo, la presencia de analito conduce a una disminución que se puede medir en la cantidad de reactivo de detección en la superficie de unión.

Los reactivos de captura o de detección se pueden unir directamente a (o competir con) un analito de interés o pueden interactuar indirectamente a través de uno o más ligandos de unión. Por consiguiente, los reactivos de ensayo secos pueden incluir tales ligandos de unión. A modo de ejemplo, se pueden usar estreptavidina o avidina como reactivos de captura o de detección mediante el uso de de reactivos de unión etiquetados con biotina que se unen o que compiten con el analito de interés. De forma análoga, algunos anticuerpos anti-hapteno se pueden usar como reactivos de captura o de detección mediante el uso de reactivos de unión etiquetados con hapteno que se unen o que compiten con el analito de interés. En otro ejemplo, algunos anticuerpos anti-especie o receptores de Fc (por ejemplo, Proteína A, G o I) se usan como reactivos de captura o de detección a través de su capacidad para unirse a anticuerpos específicos de analito. Tales técnicas están bien establecidas en la técnica de ensayos de unión

y un experto habitual en la técnica será capaz de identificar fácilmente ligandos de unión adecuado para una aplicación específica.

Ciertas realizaciones de los módulos/placas de ensayo incluyen un reactivo de captura inmovilizado en una superficie del módulo/placa para formar una superficie de unión. La inmovilización se puede realizar usando técnicas de inmovilización bien establecidas en la técnica de ensayos de unión en fase sólida, tales como las técnicas que se han establecido para la realización de ensayos de ELISA o ensayos de unión basados en matriz. En un ejemplo, los reactivos de unión se pueden adsorber de forma no específica en una superficie de un pocillo de una placa de múltiples pocillos. La superficie puede estar sin tratar o puede haber experimentado tratamiento (por ejemplo, tratamiento con un plasma o un polímero cargado) para mejorar las propiedades de absorbancia de la superficie. En otro ejemplo, la superficie puede tener una funcionalidad química activa que permite la unión covalente de reactivos de unión. Después de inmovilizar el reactivo, la superficie puede, opcionalmente, entrar en contacto con un reactivo que comprende un agente de bloqueo para bloquear sitios no revestidos en la superficie. Para la realización de mediciones multiplexadas, se pueden usar superficies de unión con matrices de diferentes reactivos de captura. Una diversidad de técnicas para formar matrices de reactivos de captura están bien establecidas en la actualidad en la técnica de ensayos basados en matriz.

Las superficies de unión están, opcionalmente, revestidas con una capa protectora seca reconstituible. La capa protectora se puede usar para estabilizar una superficie de unión, para evitar que una superficie de unión entre en contacto con reactivos de detección durante la preparación o almacenamiento, o simplemente como una ubicación para almacenar reactivos de ensayo, tales como reactivos de unión, reactivos de bloqueo, tampones de pH, sales, detergentes, correactivos de electroquimioluminiscencia, etc. Los estabilizantes que se pueden encontrar en la capa protectora incluyen, pero no se limitan a, azúcares (sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, etc.), polisacáridos y polímeros de azúcar (dextrano, FICOLL, etc.), polímeros (polietilenglicol, polivinilpirrolidona, etc.), osmolitos zwitteriónicos (glicina, betaína, etc.) y otros osmolitos estabilizantes (trimetilamina-N-óxido, etc.). Los agentes de bloqueo son materiales que evitan la unión no específica de los componentes del ensayo, en especial los reactivos de detección, a las superficies de unión e incluyen proteínas (tales como albúminas de suero, gamma globulinas, inmunoglobulinas, leche en polvo o caseína purificada, gelatina, etc.), polímeros (tales como óxido de polietileno y óxido de polipropileno) y detergentes (por ejemplo, algunas clases de detergentes no iónicos o agentes tensioactivos se conocen por los nombres comerciales de BRIJ, TRITON, TWEEN, THESIT, LUBROL, GENAPOL, PLURONIC, TETRONIC, y SPAN). En ciertas realizaciones, se incluye una capa protectora que comprende fosfato de amonio como un componente de taponamiento, comprende otras sales de amonio, y/o comprende menos de un 1 % o un 0,1 % (p/p) de iones de sodio o de potasio.

Una realización es una placa de múltiples pocillos que comprende al menos un pocillo que tiene (1) un primer reactivo de ensayo en seco y (2) un segundo reactivo de ensayo seco, en la que uno o ambos de dichos primer y segundo reactivos secos es un reactivo seco reconstituible y en la que dicho primer y segundo reactivos secos no entran en contacto entre sí. El pocillo puede incluir adicionalmente uno o más reactivos secos adicionales. Estos pueden incluir uno o más reactivos secos reconstituibles adicionales que no entran en contacto con el primer y/o segundo reactivos secos. La realización también incluye métodos para la realización de ensayos en estas placas para un analito de interés que comprende la adición de muestras líquidas a uno o más pocillos de una placa, la reconstitución de reactivos secos reconstituibles en los pocillos y la medida de una señal de ensayo dependiente del analito para medir analito en la muestra. El experto en la materia será capaz de seleccionar fácilmente los reactivos y la metodología de detección para medir una gran diversidad de analitos basándose en el conocimiento en la técnica de ensayo. Las señales detectables que se pueden medir incluyen, pero se limitan a, absorbancia óptica, fotoluminiscencia (por ejemplo, fluorescencia), quimioluminiscencia, corriente o potencial eléctricos, actividad catalítica, actividad química, dispersión de luz, aglutinación, radiactividad, electroquimioluminiscencia, magnetismo, cambios en el índice de refracción, y otras señales que se han usado en medidas de ensayo.

Otra realización es una placa de múltiples pocillos que comprende al menos un pocillo que tiene (1) una superficie de unión que tiene un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma y (2) al menos un reactivo seco adicional, en la que al menos un reactivo seco adicional es un reactivo seco reconstituible que no está en contacto con la superficie de unión. La placa de múltiples pocillos puede tener una superficie del electrodo con una superficie de unión incorporada en al menos un pocillo de la placa de múltiples pocillos.

Las Figuras 1a-1e muestran vistas esquemáticas sin escala de varias realizaciones del pocillo 100 de una placa de múltiples pocillos. El pocillo está definido por el suelo del pocillo 120 y paredes del pocillo 110. El suelo 120 y las paredes 110 pueden estar formados por un material contiguo individual o pueden ser componentes separados (por ejemplo, una parte superior de la placa y la parte inferior de la placa) que se acoplan en conjunto. El pocillo 100 también contiene un primer reactivo seco 130 situado en el suelo 120 que, como se muestra, puede ser uno o más reactivos de captura que están inmovilizados en el suelo 120 para formar una superficie de unión. El primer reactivo seco 130 puede incluir una pluralidad de reactivos de captura inmovilizados (por ejemplo, los reactivos 130a, 130b, y 130c) que forman patrones en una pluralidad de dominios de unión separados (por ejemplo, una matriz). De forma ventajosa, los reactivos/dominios de unión pueden tener diferente afinidad o especificidad hacia compañeros de unión; tales dominios de unión se pueden usar para realizar medidas basadas en matriz multiplexada. Una capa protectora reconstituible 140 cubre el reactivo seco 130. La capa protectora 140 se puede omitir, por ejemplo,

cuando no es necesaria para separar físicamente los reactivos 130 y 150. El pocillo 100 también comprende un segundo reactivo seco 150 que es un reactivo seco reconstituible. El segundo reactivo seco 150 puede comprender un reactivo de detección tal como el reactivo de detección etiquetado 160. Opcionalmente, el segundo reactivo seco 150 comprende una pluralidad de reactivos de detección que se diferencian en la afinidad por especificidad hacia compañeros de unión. El pocillo 100 también puede incluir un, opcional, reactivo seco reconstituible 170 adicional que comprende un analito de control de ensayo 180 (como se muestra en las Figuras 1c-1e). También se muestra el cierre de la placa 190. El cierre de la placa 190, que se puede omitir, se cierra herméticamente frente a la superficie superior de las paredes 110 para proteger los reactivos secos del entorno.

La Figura 1a muestra una realización en la que el primer reactivo seco 130 se reviste con capa protectora reconstituible 140. El segundo reactivo seco 150 está formando capas en la capa protectora 140 que evita que el segundo reactivo seco 150 entre en contacto con la primera capa de reactivo seco 130. En un ejemplo de esta realización, el segundo reactivo seco 150 se deposita distribuyéndolo en forma líquida en la capa protectora 140; la capa protectora 140 se elige para que tenga un espesor o masa suficientes de modo que pueda adsorber este líquido sin permitirle que entre en contacto con el reactivo seco 130. A continuación, el líquido se seca para formar el segundo reactivo seco 150. En un ejemplo alternativo, la capa protectora 140 se introduce en forma líquida y se congela en el pocillo para formar una primera capa congelada. El reactivo 150 se introduce a continuación en forma líquida y se congela como una segunda capa congelada sobre la primera capa congelada. La liofilización de las dos capas congeladas proporciona la estructura de reactivo seco en capas.

La Figura 1b muestra una realización en la que los reactivos 130 y 150 están ambos situados de forma fija en regiones del suelo 120 que no se superponen. Los reactivos secos adicionales, tales como reactivos de control de ensayo (no se muestran), se podría situar en otras regiones del suelo 120 que no se superponen. La localización de los reactivos en las regiones seleccionadas del suelo 120 se puede realizar usando técnicas convencionales de deposición o distribución de reactivos formando patrones. Opcionalmente, el suelo 120 tiene dominios relativamente hidrófilos rodeados por áreas relativamente hidrófobas de modo que los volúmenes apropiados de agentes distribuidos en los dominios hidrófilos se extenderán a límites definidos determinados por las áreas hidrófobas. En esta y otras realizaciones en las que los reactivos secos reconstituibles se sitúan en una superficie, la superficie se puede tratar previamente con agentes de bloqueo para prevenir la adsorción de los reactivos a las superficies y/o puede incluir agentes de bloqueo en la composición de reactivo.

La Figura 1c muestra una realización en la que el segundo reactivo seco 150 está situado de forma fija, ,1 o más pastillas de reactivo, en las paredes 110. Las pastillas se pueden formar, por ejemplo, distribuyendo una o más góticas del reactivo (en forma líquida) en las paredes 110 disecando las para formar las pastillas de reactivo seco. La Figura 1c también muestra el reactivo seco 170 adicional opcional con analito de control 180 situados de forma fija en otra región de las paredes 110 que no se superponen. La Figura 1d muestra una realización que es como la mostrada en la Figura 1c excepto en que los reactivos 150 y 170 están sentados en la repisas 115 en las paredes 110. Los reactivos secos 150 y 170 se pueden formar a partir de reactivos líquidos mediante la distribución y secado de los mismos en 20 repisas 115 o distribuyéndolos sobre las repisas 115 de modo que fluyen por las paredes 110 en las repisas 115 en las que se secan. Como alternativa, de acuerdo con un ejemplo no reivindicado, las pastillas de reactivo seco independientes se pueden colocar en las repisas 115.

Por último, la Figura 1e muestra una realización en la que el reactivo 150 y el reactivo opcional 170 son pastillas de reactivos secos independientes. También se incluyen las formas de realización del pocillo 100 en el que existe cierta combinación de reactivos secos reconstituibles en el suelo del pocillo, paredes del pocillo, repisas del pocillo, y/o, en un ejemplo no reivindicado, en forma independiente. En realizaciones alternativas, se usa alguna combinación de reactivos secos reconstituibles independientes localizado de forma fija.

Como se muestra en las realizaciones en la Figura 1, las placas de múltiples pocillos incluyen las que tienen pocillos con múltiples reactivos secos, físicamente distintos. De forma análoga, para realizar diferentes ensayos en diferentes pocillos, puede haber diferentes reactivos secos en diferentes pocillos. Puede ser deseable, por ejemplo para fines de control de calidad, asegurarse de que los reactivos secos correctos están presentes en los pocillos de una placa. Por consiguiente, los reactivos secos pueden incluir indicadores (tales como colorantes o fluoróforos) que se pueden usar en la inspección óptica de las placas. Mediante el uso de diferentes indicadores distinguibles en diferentes reactivos secos, es posible inspeccionar ópticamente una placa para asegurarse de que los reactivos correctas están en los lugares apropiados en los pocillos apropiados de una placa.

La Figura 2 muestra vistas esquemáticas no a escala de varias formas de pocillos que tienen elementos de repisa en los que se pueden mantener y secar reactivos líquidos. La Figura 2a es una sección transversal de un pocillo 200 que muestra la parte inferior del pocillo 200 y la pared del pocillo 210, teniendo la pared del pocillo salientes tales como los salientes 230 y 235 que puede soportar reactivos secos. El saliente 230 tiene un ángulo que es sustancialmente 900 o inferior a 900 con respecto a la pared directamente por encima del saliente de modo que un volumen apropiado de reactivos se puede distribuir en el saliente 230 y acumular en el saliente 230 sin exceso de flujo en la parte inferior del pocillo 200. Los salientes también pueden tener características adicionales para ayudar a contener reactivos tales como la patilla 240 en el saliente 235.

Los elementos de repisa tales como el saliente 235 pueden estar situados a cualquier altura (h_s) por encima de la parte inferior del pocillo 240 (hb = 0) y por debajo de la altura del pocillo (h_w). En algunas realizaciones, h_s es mayor o igual que 0,02 h_w, 0,05 h_w o 0,1 h_w pero menor o igual que 0,1 h_w, 0,25 h_w o 0,5 h_w. En otras realizaciones, h_s es mayor o igual que aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,5 mm, o 1 mm pero menor o igual que aproximadamente 1 mm, 2 mm, o 5 mm. A través de la selección apropiada de altura de la repisa y volúmenes de muestra/reactivos añadidos durante el transcurso de un ensayo, puede ser posible controlar el orden o el momento de las reacciones del ensayo. En un ejemplo, la altura de la repisa y volumen de la muestra se eligen de modo que la adición de la muestra al pocillo proporciona una altura de líquido que entra en contacto los reactivos en la parte inferior del pocillo y también reconstituye reactivos en una o más repisas. Como alternativa, la altura de la repisa se puede elegir de modo que la adición de volumen definido de un primer líquido entra en contacto con reactivos secos en el fondo del pocillo (para reconstituir de reactivos reconstituibles en la parte inferior y/o permitir que las reacciones evolucionen implicando reactivos almacenados en la parte inferior), pero no llega a la altura de una o más repisas. Las reacciones que implican reactivos en las repisas estantes pueden comenzar en un momento posterior mediante la adición de un volumen suficiente de un segundo líquido de modo que el nivel de líquido alcance la altura de las repisas con el fin de reconstituir el reactivo seco en las repisas. En la realización de un ensayo, la muestra a medir puede ser el primer líquido, segundo líquido o ambos.

Las Figuras 2b-2f muestran vistas superiores de varias realizaciones del pocillo 200 y muestran que las aberturas del pocillo pueden tener una diversidad de formas que incluyen, pero no se limitan a, cuadrada (Figuras 2b-2d) y redonda (Figuras 2e-2f). Además, los elementos de repisa se pueden extender alrededor del perímetro del pocillo al igual que en las Figuras 2b y 2e o puede haber uno o más elementos de repisa aislados que sumamente se extienden parcialmente alrededor del pocillo al igual que en las Figuras 2c-2d y 2f. Un pocillo también puede incluir una pluralidad de elementos de repisa a diferentes alturas dentro de un pocillo. Las Figuras 2g-2h muestran vistas en sección transversal y superior, respectivamente, de un pocillo 290 en el que se proporciona un elemento de repisa mediante el puente 250 que se extiende a través del pocillo. Las Figuras 2i-2j muestran vistas en sección transversal y superior, respectivamente de un pocillo 295 en el que un elemento de repisa está proporcionado por un tabique 260 que se extiende verticalmente desde un área de la parte inferior del pocillo 220.

Se proporciona una placa de múltiples pocillos que comprende un cuerpo de la placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que incluye: a) una pluralidad de pocillos de primer reactivo que contienen un primer reactivo seco reconstituible y b) una pluralidad de pocillos del segundo reactivo que contienen un segundo reactivo seco (que puede ser un reactivo seco reconstituible o un reactivo inmovilizado), en la que, el primer y segundo reactivos son reactivos emparejados para realizar un ensayo (es decir, ambos se usando en la realización de un ensayo de interés). En un ejemplo no reivindicado, los reactivos pueden estar situados en una diversidad de lugares con los pocillos tales como la parte inferior del pocillo, paredes del pocillo, en elementos de repisa, como pastillas libres o polvos, etc. Se proporciona un método para realizar ensayos en estas placas que comprende: a) añadir una muestra a uno de los pocillos de primer reactivo, a) reconstituir reactivos de detección etiquetados secos reconstituibles en el primer pocillo de reactivo para formar una mezcla de reacción, c) transferir una alícuota de la mezcla de reacción a uno o más de los pocillos del segundo reactivo, y d) incubar la mezcla de reacción en los segundos pocillos de reactivo para realizar dicho ensayo en dicha muestra. En una realización, la placa de ensayo de múltiples pocillos se puede dividir en una pluralidad de de conjuntos de pocillos que consiste en un pocillo del primer reactivo y uno o más pocillos del segundo reactivo y el método comprende adicionalmente la repetición del proceso de (a)-(d) para cada conjunto de pocillos.

La Figura 3a es una ilustración esquemática (no a escala) de una realización que muestra vistas en sección transversal de dos pocillos de una placa de múltiples pocillos 300. El pocillo 302 es un pocillo de reconstitución reactivo que comprende uno o más reactivos secos reconstituibles que puede incluir un reactivo de detección etiquetado (tal como el reactivo seco 350 que comprende el reactivo de detección etiquetado 360) o un analito de control de ensayo (tal como el reactivo seco 370 que comprende el analito de control de ensayo 380). Estos reactivos secos pueden incluir componentes de reactivo adicionales tales como agentes de bloqueo, estabilizantes, conservantes, sales, tampones de pH, detergentes, reactivos de unión, correactivos de ECL y similares. En un ejemplo no reivindicado, reactivos pueden estar situados en las partes inferiores del pocillo, ubicaciones específicas en las partes inferiores del pocillo, en las paredes del pocillo así, elementos de precisa o pueden estar independientes (de acuerdo con la discusión de Figuras 1 y 2). El pocillo 301 es un pocillo de detección que comprende además uno o más reactivos secos que pueden incluir reactivos secos reconstituibles o un reactivo seco inmovilizado. Como se muestra, el pocillo 301 comprende reactivos de captura inmovilizados 330 que forman patrones en tres dominios de unión 330a, 330b, y 330c para formar una superficie de unión. El pocillo 301 también comprende una capa protectora reconstituible 340 que se puede omitir. En una realización de un ensayo, la muestra se añade al pocillo con reactivo de reconstitución en el que se reconstituyen los reactivos secos reconstituibles. La muestra se transfiere a continuación al pocillo de detección en el que se realiza la medida de ensayo. Como alternativa, se puede usar un tampón de reconstitución para reconstituir los reactivos en el pocillo con reactivo de reconstitución; el tampón de reconstitución se combina a continuación con la muestra en el pocillo de detección. La Figura 3a también muestra el cierre de la placa 390 que se cierra herméticamente frente a las aberturas de los pocillos 301 y 302 a través de los contenidos de los pocillos del entorno.

Los pocillos de detección y de reconstitución de reactivo en una placa de múltiples pocillos se pueden agrupar en una pluralidad de conjuntos de ensayo que consiste de un pocillo con reactivo de reconstitución de reactivo y uno o más pocillos de detección, el pocillo de reconstitución de reactivo y los pocillos de detección dentro de un conjunto que comprende reactivos de captura y detección emparejados para medir un analito de interés. La Figura 3b muestra una disposición en la que un conjunto tiene un pocillo de reconstitución de reactivo 302 y tres pocillos de detección 301. Durante un ensayo, una muestra añadida al pocillo 302 se puede distribuir a continuación entre los tres pocillos de detección 301 asociados para realizar múltiples replicados o, en el que los pocillos de detección contienen diferentes reactivos, ensayos diferentes múltiples. La Figura 3c muestra una disposición en la que un conjunto tiene un pocillo de reconstitución de reactivo 302 y un pocillo de detección 301.

Los pocillos de reactivo de reconstitución y los pocillos de detección pueden ser similares en tamaño y forma o pueden tener diferentes tamaños y/o formas. En alguna realización, los pocillos en una placa de múltiples pocillos convencionales se dividen entre los dos tipos de pocillos. La Figura 4 muestra vistas esquemáticas no a escala de una disposición alternativa de pocillos. La Figura 4a muestra una vista superior de la placa de múltiples pocillos 400 que tiene pocillos de detección 440 que se colocan en un patrón de dos dimensiones regular y que tiene paredes de pocillos de detección 430 con superficies de pared interna y superficies de pared externa. La placa de múltiples pocillos también tiene pocillos de reconstitución de reactivo 460 en espacios intersticiales entre pocillos de detección. Los pocillos de reconstitución de reactivo 460 tienen paredes del pocillo que están definidas por la superficies externas del pocillo de paredes del pocillo de detección 430 y elementos de resalte 450 que conectan las superficies externas de las paredes del pocillo 430 de pocillos de detección adyacentes (y, en la parte más externa de los pocillos, mediante la superficie interna de la pared del marco de la placa 410). Como se muestra, a los pocillos de detección se les puede dar forma para que no tengan curvas ni ángulos de reentrada (es decir, apuntando hacia adentro) mientras que los pocillos intersticiales pueden tener curvas y/o ángulos de reentrada. La Figura 4b muestra una vista en sección transversal a lo largo de la línea de puntos de la Figura 4a y muestran las superficies de la parte inferior de los dos tipos de pocillos (que pueden estar a diferentes alturas en el cuerpo de la placa). La placa 400 se puede formar a partir del material contiguo individual. En una realización alternativa, la placa 400 está formada a partir de una parte superior de la placa 405 y una parte inferior de la placa 420 que están emparejados a lo largo de la línea de puntos mostrada en la Figura 4b. De forma ventajosa, la disposición básica de las matrices de pocillos redondos con pocillos intersticiales definidos por las paredes del pocillo y elementos de resalte es una característica común de muchas placas de 96 pocillos moldeadas por inyección y las partes superiores de la placa y permite que estos componentes se usen para formar placas de reactivo seco como se muestra en la Figura 4.

Se proporciona una placa de múltiples pocillos que comprende a) un cuerpo de placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma que incluye: i) una pluralidad de pocillos de ensayo que comprenden un reactivo de ensayo seco; y ii) una pluralidad de pocillos con desecante que comprenden un desecante, y b) un cierre de placa sellado frente a dicho cuerpo de la placa aislando de ese modo dicha pluralidad de pocillos del entorno externo. En alguna realización, los pocillos de ensayo comprenden los reactivos necesarios para la realización de un ensayo en el pocillo de ensayo. También se incluyen realizaciones en las que los pocillos con desecante están conectados mediante conductos de secado con los pocillos de ensayo, permitiendo los conductos la difusión de vapor de agua de los pocillos de ensayo a los pocillos con desecante pero haciendo intersección con los pocillos a una altura en el pocillo de ensayo por encima de la ubicación del reactivo de ensayo seco. Además de placas de múltiples pocillos que contienen reactivos secos y desecantes, las propias placas (es decir, sin reactivos secos ni desecantes), en particular, se proporcionan placas que tienen elementos de conducto o canal (por ejemplo, como se muestra en la Figura 5 que se describe a continuación) que son adecuados para conectar conjuntos de pocillos con desecante y de ensayo con reactivos secos.

La Figura 5 muestra vistas esquemáticas sin escala de una placa de múltiples pocillos 500 que tiene pocillos de ensayo 501 y pocillos con desecante 502 (el desecante y los reactivos secos no se muestran). La Figura 5a es una vista superior que muestra las paredes del pocillo 510 y los conductos 508 que conectan los pocillos con desecante con uno (por ejemplo, como en la fila A) o más pocillos de ensayo (por ejemplo, como en la fila B). La Figura 5b vuestra vista en sección transversal a lo largo de la línea de puntos en la Figura 5a y junto con la Figura 5a muestra cómo se pueden formar los conductos 508 mediante cierre hermético del cierre de la placa 515 frente a canales en la superficie de la parte superior del cuerpo de la placa. El cierre de la placa 515 se cierra herméticamente frente a estos canales y las partes superiores de los pocillos para formar conjuntos de ensayo y pocillos con desecante que están interconectados por conductos pero están aislados del entorno y de otros conjuntos de pocillos. Por consiguiente, uno o más conjuntos de pocillos pueden estar sin cerrar herméticamente y se pueden usar en un ensayo y el conjunto de pocillos restantes se mantendrán en un entorno protegido ambientalmente seco. La placa 500 se puede formar a partir del material contiguo individual. En una realización alternativa, la placa 500 se forma a partir de una parte superior de la placa 505 y una parte superior de la placa 512 que están emparejadas a lo largo de la línea de puntos mostrada en la Figura 5b, la parte inferior de la placa 512 definiendo el suelo de al menos algunos de los pocillos.

Los pocillos de ensayo o conjuntos de pocillos en la placa 500 pueden incluir uno o más de cualquiera de los pocillos que contienen reactivo seco descritos anteriormente, por ejemplo, en las descripciones de las Figuras 1-4 y pueden incluir tanto pocillos de detección como pocillos de reconstitución de reactivo. Los desecantes usados en el pocillo con desecante se pueden seleccionar a partir de materiales desecantes conocidos que incluyen, pero no se limitan

a, sílice, alúmina activada, arcillas activadas, tamices moleculares y otras zeolitas, sales higroscópicas (por ejemplo, sulfato cálcico anhidro, sulfato de magnesio, sulfato sódico, hidróxido sódico y cloruro de litio), soluciones higroscópicas (por ejemplo, soluciones concentradas de cloruro de litio) y materiales reactivos en agua, tales como pentóxido de fósforo. En algunas realizaciones, el desecante está presente como un polvo seco libre o material granular. En otras realizaciones, el desecante está presente como una pastilla seca, por ejemplo un comprimido prensado o un material polimérico impregnado con desecante. En otras realizaciones, el desecante está contenido en una bolsa o contenedor permeable al vapor de agua (por ejemplo, como en bolsas de sílice comerciales). De forma ventajosa, el desecante en forma de pastilla o contenedores embasados previamente se pueden "ajustar a presión" en los pocillos con desecante para evitar el movimiento en el pocillo durante su transporte o uso.

Las Figuras 5c-5d muestran vistas superior y en sección transversal de una realización de una placa de múltiples pocillos 520 con pocillos de ensayo y con desecante. La placa 520 tiene pocillos de ensayo 521 (que pueden contener reactivos de ensayos secos) que se colocan en un patrón de dos dimensiones regular y que tienen paredes del pocillo de ensayo 523 con superficies de pared interna y superficies de pared externa. También tiene pocillos con desecante 522 en espacios intersticiales entre pocillos de detección (como alternativa, los pocillos 521 se usan como pocillos con desecante y los pocillos 522 se usan como pocillos de ensayo). Los pocillos con desecante 522 tienen paredes del pocillo que están definidas por la superficies externas del pocillo de las paredes del pocillo de detección 523 y elementos de resalte 525 que conectan las superficies externas de las paredes del pocillo 523 de pocillos de ensayo adyacentes (y, en la parte más externa de los pocillos, mediante la superficie interna de la pared del marco de la placa 526). Los canales 524 con muescas en la parte superior de las paredes del pocillo 523 proporcionan, cuando se emparejan con un cierre de la placa, rutas para que el vapor de agua se desplace desde los pocillos de ensayo a los pocillos con desecante. Como se muestra, a los pocillos de ensayo se les debe dar forma para que no tengan curvas ni ángulos de reentrada (es decir, que apuntan hacia dentro) mientras que los potrillos intersticiales pueden tener curvas y/o ángulos de reentrada. La Figura 5d muestra una vista en sección transversal a lo largo de la línea de puntos en la Figura 5c y muestra del cierre de la placa 527 que está emparejado con la parte superior de la placa para formar conjuntos de ensayo y pocillos con desecante que están conectados a través de los conductos 524 pero aislados de otros pocillos y del entorno. La placa 520 se puede formar a partir del material contiguo individual. En una realización alternativa, la placa 520 se forma a partir de una parte superior de la placa 528 y una parte inferior de la placa 529 que están emparejadas a lo largo de la línea de puntos mostrada en la Figura 5d.

La Figura 5e muestra una vista esquemática de otra realización de una placa de múltiples pocillos con pocillos de ensayo (que pueden contener reactivos secos) y pocillos con desecante y muestra una placa 540 con pocillos de ensayo 541 y pocillos con desecante 543 que están conectados en conjuntos de pocillos a través de los canales 542 en el cuerpo de la placa. La placa de múltiples pocillos 540 es muy análoga a la de la realización de la placa 500 representada en las Figuras 5a-5b excepto en que en la placa 540, los pocillos con desecante 542 son mucho más profundos y más pequeños en área que los pocillos de ensayo lo que permite una mayor parte de la huella a dedicar a los pocillos usados en las medidas del ensayo. La Figura 5f muestra una vista en sección transversal a lo largo de la línea de puntos en la Figura 5e y también muestra un cierre de la placa 544 que se cierra herméticamente frente a la parte superior de la placa para formar conjuntos de ensayo y pocillos conectados con desecante. La placa 540 se puede formar a partir de un material contiguo individual. En una realización alternativa, la placa 540 se forma a partir de una parte superior de la placa 545 y una parte inferior de la placa 546 que se emparejan a lo largo de la línea de puntos mostrada en la Figura 5f, la parte inferior de la placa 546 también definiendo el suelo de los pocillos de ensayo 541.

La Figura 6 es una vista esquemática del despiece de las piezas de una realización de una placa de ensayo de múltiples pocillos. La placa de ensayos de múltiples pocillos 600 comprende una parte superior de la placa 610 con sujetos con salida 615 que definen las paredes de los pocillos. La parte superior de la placa 610 se cierra herméticamente frente a la parte inferior de la placa 620 a través de la junta 625 de modo que la parte inferior de la placa 620 define la superficie inferior de los pocillos. Opcionalmente, la parte superior de la placa 610 se cierra herméticamente directamente a la parte inferior de la placa 620 y la junta 625 se omite. De cierre hermético se puede conseguir a través de técnicas de sellado tradicionales tales como adhesivos, soldadura con disolvente, sellado por calor, soldadura sónica y similares. En otra realidad opcional, la parte superior de la placa 610 define totalmente los lados y la parte inferior de los pocillos y la parte inferior de la placa 620 y la junta 625 se pueden omitir. Los contenidos de los pocillos, que pueden incluir pocillos configurados para contener reactivos seco y/o desecante como se ha descrito anteriormente, se pueden proteger del entorno exterior mediante el cierre de la placa con 630 cierre hermético (por ejemplo, a través de técnicas de sellado tradicionales) a la parte superior de la placa 610 directamente o a través de la junta 635 opcional.

Los componentes de la placa 600 se pueden preparar a partir de la diversidad de diferentes materiales que incluyen, pero no se limitan a, plásticos, metales, cerámicas, cauchos, vidrios o combinaciones de los mismos. De acuerdo con los requisitos de la técnica de detección en particular usada con las placas, algunos de los componentes o todos los componentes se pueden seleccionar para que sean transparentes, coloreados, opacos, o altamente dispersantes de la luz. En una realización, la parte superior de la placa 610 es un plástico moldeado por inyección tal como poliestireno moldeado por inyección, polipropileno, o copolímero de olefina cíclica (COC). Opcionalmente, uno o más de los componentes se pueden preparar o pueden comprender (por ejemplo en forma de un revestimiento) un material que tenga una baja tasa de transmisión del vapor de agua, por ejemplo, una tasa de

transmisión de vapor de agua inferior a 1 g/m^2 al día a través de un espesor de 100 um. Algunos materiales de baja transmisión de vapor de agua incluyen, pero no se limitan a, vidrio, metales o películas metálicas (por ejemplo, películas de aluminio), COC, cloruro de polivinilideno (PvDC), polipropileno, policlorotrifluoroetileno (PCTFE), y polímeros de cristal líquido (LCP).

La placa 600 puede incluir pocillos con desecante como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, o además, el desecante se pueden incorporar directamente en la parte superior de la placa 610, parte inferior de la placa 620, cierre de la placa 630, junta 625 y/o junta 635. Por ejemplo, el documento de patente U.S. 6.174.952 de Hekal *et al.,* describe mezclas de polímeros que contienen desecante que se pueden moldear, fundir en revestimientos, o formar en películas, láminas, perlas o gránulos.

En algunas realizaciones, la parte inferior de la placa 620 tiene características que facilitan la formación de patrones de reactivos en la parte inferior de los pocillos (por ejemplo, formación de patrones de características hidrófilas rodeados por áreas hidrófobas) y/o capas conductoras que proporcionan electrodos que están expuestos a los volúmenes interiores de los pocillos de la placa 600 de modo que se pueden realizar ensayos luminiscencia electroquímica o inducida por electrodo (por ejemplo, ensayos de electroquimioluminiscencia). La parte inferior de la placa 620 también puede incluir contactos de electrodo para permitir que un instrumento externo aplique potencial/corriente eléctrica a los electrodos. Algunos enfoques, configuraciones y composiciones adecuados para características, capas conductoras y contactos de electrodos de este tipo incluyen las que se describen las Publicaciones U.S. 2004/0022677 y 2005/0052646 de Wohlstadter *et al.* Alguna instrumentación y métodos adecuados que se pueden usar para realizar medidas de ECL módulos de ensayo incluyéndose se describen en las Publicaciones U.S. 2004/0022677 y 2005/0052646 de las Solicitudes U.S. 10/185.274 y 10/185.363, respectivamente; la Publicación U.S. 2003/0113713 de la Solicitud U.S. 10/238.391; la Publicación U.S. 2005/0142033 de la Solicitud U.S. 10/980.198; y la Solicitud U.S. 11/_, _ presentada de forma simultánea de Clinton *et al.,* titulada "Aparatos, Métodos y Reactivos de Ensayo".

La Figura 7 proporciona ilustraciones esquemáticas de una realización específica que incluye algunos de los conceptos de la invención de soldados anteriormente en el contexto de una placa de múltiples pocillos configurará para realizar ensayos de electroquimioluminiscencia multiplexados basados en matriz. La Figura 7a muestra una sección de la placa de múltiples pocillos 700 que tiene una pluralidad de pocillos de ensayo 710 que puede comprender reactivos secos y una pluralidad de pocillos con desecante 720 que puede comprender un desecante. Los canales 725 en la superficie superior de la placa 700 unen cada pocillo con desecante con un pocillo de ensayo. Opcionalmente, los pocillos con desecante 720 y los canales 725 se omiten. Los pocillos de ensayo 710 tienen salientes 712 que se pueden usar para soportar un reactivo seco reconstituible (por ejemplo, reactivos ecos que comprenden controles de ensayo y/o reactivos de detección etiquetados con ECL). Algunos pocillos de ensayo también tienen superficies de electrodo de trabajo 714 que están cubiertos con capaz de dieléctrico que forman patrones 716 para exponer una pluralidad de superficies de electrodo expuestas o "aplicaciones puntuales" (mostradas como círculos dentro del pocillo). Además, se proporcionan contraelectrodos 718 para proporcionar un circuito electroquímico completo. Opcionalmente, la superficie de la capa de dieléctrico 716 es hidrófoba con respecto a la superficie del electrodo 714 de modo que pequeños volúmenes de reactivos que forman patrones en las aplicaciones puntuales se pueden mantener limitados en las aplicaciones puntuales. Las diferentes aplicaciones puntuales pueden tener diferentes reactivos de captura inmovilizados en las mismas para formar una superficie de unión con una matriz de dominios de unión que se diferencia en la especificidad o afinidad hacia compañeros de unión (por ejemplo, analitos de interés). Como alternativa, algunas de las aplicaciones puntuales pueden tener reactivos secos reconstituibles limitados en las mismas que, por ejemplo, pueden contener controles de ensayo y/o reactivos de detección etiquetados con ECL. El pocillo de ensayo puede comprender adicionalmente una capa protectora reconstituible sobre la superficie de unión.

La Figura 7b proporciona es una vista en sección transversal de un despiece de las piezas a lo largo de la línea de puntos en la Figura 7a e ilustra un enfoque para formar las capas de electrodo/dieléctrico en los pocillos de ensayo 710. La placa de múltiples pocillos comprende una parte superior de la placa 730 que define los pocillos con desecante 720 y tiene agujeros con salida que definen las paredes de los pocillos de ensayo 710 y los salientes 712. La parte superior de la placa 730 también tiene canales 725 que forman conductos entre pocillos de ensayo 710 y los pocillos con desecante 720 cuando al cierre de la placa 750 se cierra herméticamente frente a la superficie superior de la parte superior de la placa 730. En un ejemplo no limitante, la parte superior de la placa 730 es una pieza moldeada por inyección moldeada a partir de un plástico con baja transmisión de vapor de agua. En otro ejemplo no limitante, al cierre de la placa 750 es una película que se puede sellar con calor que comprende una lámina de plástico o un metal (por ejemplo, aluminio) con baja transmisión de vapor de agua.

La Figura 7b también muestra la parte inferior de la placa 740 que se sella herméticamente frente a la parte superior de la placa 730 y define la parte inferior de los pocillos de ensayo 710. La parte inferior de la placa 740 comprende el sustrato 715 que soporta capas conductoras que forman patrones que proporcionan los electrodos 714 y 718. La capa de dieléctrico 716 que forma patrones en los electrodos definen los sitios del electrodo expuesto. Una diversidad de materiales se puede usar para proporcionar el sustrato y las capas de conductor y de dieléctrico (véanse, por ejemplo, las Publicaciones U.S. 2004/0022677 y 2005/0052646). En un ejemplo a la limitante, el sustrato es una película de plástico (hecha de, por ejemplo, un poliéster tal como MYLAR, cloruro de polivinilo, o un

material de baja transmisión de vapor de agua tal como COC), las capas conductoras son tintas conductoras serigrafiadas (por ejemplo, tintas de carbono serigrafiadas) y la capa de dieléctrico es una tinta aislante serigrafiada. En la Figura 7b también se muestran contactos de electrodo 780 y 785 que son capas conductoras en la parte inferior del sustrato 714 que proporcionan conectividad (por ejemplo, a través de agujeros con salida conductores en el sustrato 715 a los electrodos 714 y 718. Los contactos del electrodo también se pueden proporcionar mediante tintas conductoras serigrafiadas que durante la impresión pueden hacer que los agujeros se rellenen con el sustrato 715 para proporcionar también los agujeros con salida conductores. De forma ventajosa, los agujeros con salida conductores se pueden situar directamente por debajo de las paredes del pocillo para limitar la transmisión de vapor de agua a través de los agujeros. Además, una capa de sellado de la parte inferior 790 opcional se puede cerrar herméticamente a la parte inferior del sustrato 715. La capa de sellado de la parte inferior 790 está formada por un material de baja transmisión de vapor de agua y cubre la mayor parte de la superficie de la parte inferior del sustrato 715 excepto para aberturas definidas en la capa de sellado 790 que se colocan con el fin de permitir que un instrumento de lectura de la placa entre en contacto con los contactos de electrodo 780 y 785.

La Figura 7c muestra una lista en ángulo más detallada de una realización de la placa 700 y muestra pastillas con desecante 722 que se ajustan por presión en pocillos con desecante 720.

Se puede someter a ensayo una diversidad de muestras que pueden contener un analito o actividad de interés. En un ejemplo, una muestra se introduce en una placa de ensayo o uno o más pocillos de una placa de ensayo que tienen reactivos secos reconstituibles cargados previamente en los mismos, reconstituyendo de ese modo esos reactivos de ensayo y una señal de ensayo se mide para medir (de forma cuantitativa o cualitativa) la cantidad de analito en la muestra. Los reactivos pueden incluir una sustancia luminiscente, electroquimioluminiscente, quimioluminiscente, y/o activa para redox. Por consiguiente, la señal del ensayo es preferentemente una señal luminiscente o electroquímica. Algunos formatos de ensayo que se pueden realizar incluyen métodos homogéneos y heterogéneos.

Los ensayos que se pueden realizar incluyen formatos que usan soportes de fase sólida para acoplar la medida de un analito o actividad a la separación de reactivos etiquetados en partes soportadas en fase de solución y fase sólida. Los ejemplos incluyen ensayos de unión en fase sólida que miden la formación de un complejo de un material y su compañero de unión específico (uno del parque se está inmovilizando, o capaz de ser inmovilizado, en el soporte en fase sólida), la formación de complejos de tipo sándwich (incluyendo un reactivo de captura que está inmovilizado, o es capaz de ser inmovilizado, en el soporte en fase sólida), la competición de los competidores por un compañero de unión (estando el compañero de unión o uno de los competidores inmovilizados, o capaz de ser inmovilizado, en el soporte en fase sólida), la escisión enzimática o química de una etiqueta (o material etiquetado) de un reactivo que está inmovilizado, o es capaz de ser inmovilizado en un soporte en fase sólida y la unión enzimática o química de una etiqueta (o material etiquetado) a un reactivo que está inmovilizado o es capaz de ser inmovilizado en un soporte en fase sólida. La expresión "capaz de ser inmovilizado" se usa en el presente documento para hacer referencia a la unión de reactivos que pueden participar en reacciones en solución y ser capturados posteriormente en una fase sólida durante o antes de la detección. Por ejemplo, el reactivo se puede capturar usando un compañero de unión específico del reactivo que está inmovilizado en la fase sólida. Como alternativa, el reactivo está unido a un resto de captura y un compañero de unión específico del resto de captura a está inmovilizado en la fase sólida. Algunos ejemplos de pares de resto de captura-compañero de unión útiles incluyen biotina-estreptavidina (o avidina), anticuerpo-hapteno, receptor-ligando, ácido nucleico - ácido nucleico complementario, etc.

En ensayos realizados en soportes en fase sólida, la cantidad de analito o actividad se puede determinar midiendo la cantidad de etiqueta en el soporte en fase sólida y/o en solución usando i) una técnica selectiva de superficie, ii) una técnica selectiva de solución y/o iii) después de separación de las dos fases. En métodos de electroquimioluminiscencia, el soporte en fase sólida también puede ser el electrodo de trabajo usado para inducir electroquimioluminiscencia a partir de etiquetas unidas a la fase sólida. Los métodos de electroquimioluminiscencia pueden incluir lavado para retirar reactivos etiquetados con electroquimioluminiscencia no unidos antes de la adición de un correactivo de ECL (por ejemplo, aminas terciarias tales como tripropilamina o ácido piperazin-1,4-bis(2-etanosulfónico)) y aplicación de un potencial para inducir ECL a partir de etiquetas unidas. Como alternativa, debido a la selectividad de la superficie de las medidas de electroquimioluminiscencia, el método se puede realizar sin lavado. De forma ventajosa, en ensayos sin lavado, el correactivo de ECL se puede añadir previamente a pocillos de ensayo en forma de un reactivo seco reconstituible o capa protectora.

Otra realización se refiere a kits para uso en la realización de ensayos that que comprenden los módulos de ensayo/placas de múltiples pocillos. El kit puede incluir uno o más reactivos adicionales en uno o más recipientes que incluyen, pero no se limitan a, calibradores de ensayo, controles de ensayo, diluyentes de ensayo, correactivos de ECL, y tampones de lavado.

De acuerdo con una realización, el kit comprende uno o más de los componentes de ensayo en uno o más pocillos de la placa, preferentemente en forma seca. En una realización preferente con el kit comprende una placa de ensayo que tiene una unión inmovilizada en uno o más electrodos de trabajo dentro de un módulo de ensayo y uno o más reactivos de ensayo adicionales depositados en forma de una perla seca, gránulo o una pastilla directamente en el

pocillo, preferentemente en una posición separada de forma espacial desde un electrodo de trabajo, o como alternativa depositados en uno o más pocillos intersticiales. Preferentemente, los kits no contienen ningún líquido nos pocillos.

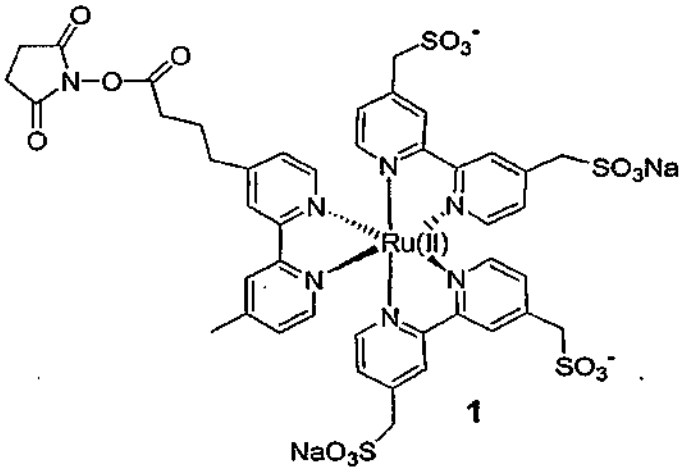
Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos e instrumentación que entran dentro del alcance de la presente invención. Por supuesto, no se deben considerar en modo alguno limitantes de la invención. Un experto habitual en la materia puede realizar numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención sin experimentación excesiva.

Materiales y Métodos

Anticuerpos de Detección Etiquetados

Los anticuerpos de detección etiquetados se etiquetaron con éster de SULFO-TAG NHS (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), una sustancia electroquimioluminiscente basada en un derivado sulfonado de rutenio-tris-bipiridina (compuesto 1 dibujado a continuación). Los anticuerpos etiquetados se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño sobre SEPHADEX G-50 (Pharmacia).



Pastillas de Anticuerpo de Detección Liofilizado

Las pastillas que comprenden uno o más anticuerpos de detección etiquetados se formaron a partir de una solución que contenía 1 μg/ml de cada uno de los anticuerpos etiquetados, albúmina en suero bovino al 2 % y sacarosa al 20 % en una solución salina campanada con fosfato. Las gotitas congeladas de esta solución se formaron distribuyendo 20 μl en nitrógeno líquido. Las gotitas congeladas se transfirieron a bandejas de aluminio refrigeradas (≤ 78 ºC) que se colocaron en los estantes de un liofilizador ADVANTAGE XL (Virtis). Los estantes del liofilizador se enfriaron previamente a < -45 ºC antes de la introducción de las bandejas de aluminio y se usó una pasta conductora para mejorar la transferencia de calor entre los estantes y las bandejas que contenían las perlas. En un protocolo de liofilización habitual, la cámara del liofilizador se evacuó y la temperatura del estanque se aumentó lentamente a -30 ºC, -20 ºC, -15 ºC y por último a +20 ºC (condiciones ambientales) durante el transcurso de aproximadamente 24 horas. La temperatura se mantuvo en cada uno de estos niveles durante el tiempo suficiente para permitir el equilibrio mientras se controlaba la presión de la cámara a 1,33 Pa. Las valoraciones de Karl Fisher de perlas liofilizadas por lo general mostraban contenidos de agua inferiores a un 4 % en peso. El contenido de agua se podría reducir a menos de un 2 % prolongando el almacenamiento en presencia de un desecante.

Placas de Múltiples Pocillos para Medidas de Electroquimioluminiscencia

Las medidas de electroquimioluminiscencia se realizaron usando placas de múltiples pocillos diseñadas especialmente que tienen integrados electrodos de tinta de carbono serigrafiados para realizar medidas de electroquimioluminiscencia (placas MULTI-ARRAY o MULTI-SPOT, Meso Scale Discovery, una división de Meso Scale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD). Una capa de dieléctrico que forma patrón sobre el electrodo de trabajo en la parte inferior de cada pocillo expone una o más regiones o "aplicaciones puntuales" en el electrodo de trabajo. En algunos experimentos, las superficies del electrodo se trataron con un plasma de oxígeno antes de inmovilizar los anticuerpos en las mismas. Diferentes anticuerpos de captura se inmovilizaron en las diferentes aplicaciones puntuales mediante microdistribución formando patrones de soluciones de los anticuerpos sobre las aplicaciones puntuales usando un distribuidor de nanolitros (Bio-Dot, Inc.). Los volúmenes distribuidos en las aplicaciones

puntuales se seleccionaron de manera que se propagaban a los límites definidos por las capas de dieléctrico pero permanecían confinados en las aplicaciones puntuales, lo que permite la inmovilización de cada anticuerpo (mediante adsorción pasiva) en una región definida del electrodo de trabajo; si las superficies de del electrodo no estaban tratadas con plasma, se añadía una pequeña cantidad de detergente TRITON X-100 a las soluciones de formación aplicaciones puntuales para mejorar la difusión. Se permitió que la adsorción evolucionara durante al menos 2 horas tras lo cual las placas se lavaron con un tampón de lavado estabilizante (sacarosa al 2 %, fosfato de amonio dibásico 185 mM, fosfato de amonio monobásico 13 mM, TWEEN 20 al 0,1 %, y conservante KATHON CG/ICP II), se secó, y se almacenó en presencia de un desecante. Mediante el control de la cantidad de tampón de lavado que queda en los pocillos antes de secar (por lo general entre 5-20 *µl),* las películas de sacarosa de diferentes espesores se pudieron dejar sobre las superficies del electrodo de trabajo.

Instrumento de Medida de Electroquimioluminiscencia

La electroquimioluminiscencia se indujo y se midió en las placas MULTI-SPOT usando un lector Sector® Imager 6000 lector o un lector de Sector® 400 PR (ambos de Meso Scale Discovery, una división de Meso Scale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD). El instrumento Sector® Imager 6000 aplica potenciales eléctricos a los electrodos de trabajo en la placa e imágenes de ECL resultante. Los algoritmos de análisis de imágenes se emplean para distinguir y cuantificar la luz emitida desde cada aplicación puntual en un pocillo. El instrumento Sector® PR 400 aplica potencial eléctrico a los electrodos de trabajo en una columna de la placa de una vez. Una matriz de fotodiodos se usa para medir la ECL emitida desde los pocillos en la columna.

EJEMPLO 1. Detección de Citoquina Multiplexada Usando Anticuerpos de Detección Etiquetados en Perlas Liofilizadas

Las placas MULTI-SPOT de unión elevada que tienen una matriz de 7 aplicaciones puntuales de anticuerpos de captura contra siete diferentes citoquinas humanas (TNF-*α*, IL1-*β*, IL2, IL-5, IL6, IL8, IL12, y GM-CSF) y perlas liofilizadlas que contienen anticuerpos de detección etiquetados contra las mismas siete citoquinas se prepararon como se ha descrito anteriormente. En cada pocillo se puso una perla y las placas se almacenaron en presencia de desecante hasta su uso. Se realizaron ensayos de citoquinas multiplexada mediante la introducción de soluciones de citoquina (40 *µl* por pocillo preparada en medio de cultivo celular RPMI suplementado con suero de ternera fetal 10 %) de concentraciones definidas previamente en los pocillos de la placa e incubando durante 2 horas a temperatura ambiente en una agitador de placas. MSD® READ BUFFER P (Meso Scale Discovery), una solución que contiene un correactivo ECL de terciaria amina, se añadió a concentración 2x a los pocillos (110 *µl*/pocillo) y la placa se analizó en un instrumento Sector® Imager6000. Las señales resultantes de cada aplicación puntual mostraban buena linealidad para las siete citoquinas entre 10 y 10.000 pg/ml. Las desviaciones estándar de las señales por lo general eran inferiores a un 10 % de las señales promedio. Las señales de fondo y las sensibilidades calculadas eran similares a las obtenidas cuando los anticuerpos se añadían a los pocillos como soluciones líquidas.

EJEMPLO 2. Medidas de Citoquina Usando un Anticuerpo de Detección Etiquetado que se Seca en una Capa Protectora que Cubre una Superficie de Captura

Este ensayo usó una placa MULTI-ARRAY para aplicación puntual pequeña con una sola aplicación puntual por pocillo. La aplicación puntual tratada, como se describe en la sección de Materiales y Métodos con una solución que contiene un anticuerpo de captura TNF-α anti-humano para inmovilizar el anticuerpo en la superficie de la aplicación puntual. A continuación, el pocillo se llenó con 75 *µl* de 4x MSD® READ BUFFER P que se suplementó con FICOLL al 7 % (un polímero de sacarosa hidrófilo altamente ramificado), y la placa se enfrió hasta congelación y se liofilizó durante una noche para proporcionar una capa de "torta" protectora en la parte inferior del pocillo. Una gotita pequeña (35 nl) de una solución concentrada de un anticuerpo de detección TNF-α anti-humano etiquetado se distribuyó en la superficie de la torta. A continuación, la placa se secó al vacío durante 5 minutos y se almacenó en presencia de desecante hasta su uso. Los ensayos se realizaron mediante la adición de 150 *µl* a los pocillos de soluciones que contenían concentraciones determinadas previamente de TNF-α humano en medio de cultivo celular RPMI suplementado con suero de ternera fetal al 10 % y agitando durante dos horas. A continuación, la placa se analizó en un instrumento Sector® Imager 6000. Los límites de detección calculados de 5-6 pg/ml son comparables con los observados en ensayos sin lavado usando soluciones de anticuerpo de detección líquidas.

EJEMPLO 3. Medidas de Citoquina Usando un Anticuerpo de Detección Etiquetado que se Seca en los Lados de los Pocillos de una Placa de Múltiples Pocillos

Este ensayo usó una placa MULTI-ARRAY para aplicación puntual pequeña con una sola aplicación puntual por pocillo. La aplicación puntual se revistió, como se describe en la sección de Materiales y Métodos con un anticuerpo de captura TNF-α anti-humano. Las gotitas (1 *µl)* de una solución de 24 *µ*g/ml del anticuerpo de detección en sacarosa al 4,8 % se distribuyeron en las paredes interiores de los pocillos y se permitió que secaran. Las placas se almacenaron en presencia de desecante hasta uso en un ensayo. El protocolo de ensayo implicaba la adición de 80 *µl* de una solución de TNF-µ a cada pocillo, agitando la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavando la placa, añadiendo 150 *µl* de 1x MSD® READ BUFFER T (Meso Scale Discovery) y analizando la plata en un instrumento Sector® Imager 6000. Las placas se almacenaron durante 18 días a temperatura ambiente o a 4 ºC

dando límites de detección que eran inferiores a 1 pg/ml y comparables con los observados en ensayos de lavado usando soluciones líquidas de anticuerpo de detección.

EJEMPLO 4. Medidas de Citoquina Usando una Placa de Múltiples Pocillos con Pocillos que Tienen una Capa de Captura Revestida con una Capa Protectora que Contiene Proteína y Anticuerpo de Detección Etiquetado Seco en las Paredes del Pocillo

Este ensayo usó una placa MULTI-ARRAY con una sola aplicación puntual por pocillo. El electrodo de trabajo en cada pocillo se revistió previamente con estreptavidina (placa MULTI-ARRAY con estreptavidina, Meso Scale Discovery). El anticuerpo monoclonal anti-IL1-*β* se inmovilizó en el electrodo de trabajo de acuerdo con el siguiente protocolo. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS y a continuación se trataron con 20 *µ*l de una solución de 3 *µ*g/ml de anti-IL1-*β* etiquetado con biotina. Se permitió que la inmovilización evolucionara durante 2 horas con agitación en un agitador de placa. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS. Un volumen de 20 *µ*l de una solución tamponada de BSA y sacarosa se añadió a los pocillos de condenación se secó en los pocillos al vacío para formar una película seca en la parte inferior de las placas.

Una pastilla seca de anticuerpo policlonal anti-IL1-*β* etiquetado con SULFO-TAG se formó en la pared del pocillo de acuerdo con el siguiente protocolo. Una microgotita de 100 nl de una solución de 482 *µ*g/ml del anticuerpo etiquetado se distribuye en cada pared del pocillo usando un microdispensador BIO-DOT (Bio-Dot, Inc.) con una punta en ángulo. La gotita permaneció en la pared del pocillo en el que se permitió que secara durante 30 minutos en una cámara desecadora. Los pocillos se cerraron herméticamente a continuación con un sello caliente para placa. En algunos experimentos, una baja concentración de fluoresceína se añadió a la solución de anticuerpo de detección. La fluorescencia de la fluoresceína se pudo usar para proporcionar una comprobación de control de calidad identificando cualquier pocillo en el que el anticuerpo de detección fluyera por la pared del pocillo o salpicara en la parte inferior del pocillo. La fluoresceína no influía en el rendimiento del ensayo.

Los ensayos para IL1-*β* se realizaron mediante la adición de 125 *µ*l de soluciones que contienen cantidades conocidas de IL1-*β* a los pocillos e incubando durante 37 minutos a la vez que la placa se agitaba. A continuación, la placa se lavó con PBS, se añadió MSD READ BUFFER T y la placa se analizó en un instrumento Sector® PR 400. Los ensayos usando placas con anticuerpos de detección secos se realizaron de una manera comparable a los ensayos que usaban soluciones de anticuerpo de detección de líquido.

EJEMPLO 5. Ensayos en Placas de Múltiples Pocillos Usando Reactivos Secos: Almacenamiento de Anticuerpos Etiquetados Secos en Repisas en los Pocillos

Este ensayo usó una placa Multi-Spot configurada como se muestra en la Figura 8. La placa era similar a la que se muestra en la Figura 7 excepto por el uso de un patrón de 7 aplicaciones puntuales y la omisión de los pocillos desecantes 720, canales 725, pastillas de desecante 722, y la capa de sellado en la parte inferior 790. La parte superior de la placa era polipropileno moldeado por inyección. Los anticuerpos de captura frente a los que se inmovilizaron mediante distribución, en las aplicaciones puntuales individuales, de anticuerpos contra la toxina botulínica A (BotA), dinitrofenilo (DNP), ricina, enterotoxina estafilocócica B (SEB), encefalitis equina venezolana (VEE), y *Yersinia pestis* (YP). La IgG de ratón no inmune se inmovilizó en la aplicación puntual restante para su uso como un control negativo. La inmovilización se realizó mediante la distribución de 75 nl de soluciones que comprenden 100-500 *µ*g/ml de un anticuerpo, 750 *µ*g/ml de BSA, y TRITON X-100 al 0,03 %. Una excepción fue el anticuerpo de captura BotA que estaba biotinilado he inmovilizado después de su unión previa a 1200 *µ*g/ml de avidina y que estaba inmovilizado en ausencia de BSA.

La IgG no inmune no debería participar en un complejo de tipo sándwich y debería dar una señal de baja para todas las muestras. El aumento de esta señal fuera de un rango seleccionado se puede usar como una indicación de que un artefacto de medida está produciendo una unión no específica elevada de detección de anticuerpos y de que hay un riesgo de resultados de falso positivo. De forma más general, se puede usar cualquier reactivo de unión que no está emparejado con un reactivo de detección correspondiente. Opcionalmente, el reactivo de unión se puede seleccionar para que comparta propiedades estructurales con los reactivos de captura de ensayo, por ejemplo, en un inmunoensayo puede incluir inmunoglobulinas de una o más de las especies de las que se derivaron los otros anticuerpos de captura. La aplicación puntual de anti-DNP se usará como un control positivo. El pocillo también incluirá un anticuerpo anti-fluoresceína (FL) etiquetado con SULFO-TAG y una cantidad definida de BSA seco etiquetado tanto con DNP como con FL (DNP-FL-BSA). Por lo tanto, la señal de control positivo debería dar una señal positiva constante indicativa de la cantidad definida de DNP-FL-BSA. La reducción de esta señal por debajo de un rango seleccionado se puede usar como una indicación de que una muestra interfiere con reacciones de unión o generación de señales y de que hay un riesgo de resultados de falso negativo. De forma más general, el control positivo puede ser un ensayo para cualquier analito que se pueda añadir en la mezcla de reacción. Preferentemente, la probabilidad de encontrar el analito en las muestras de interés es baja.

Se permitió que las soluciones de anticuerpo de captura se secaran durante 30 minutos en un ambiente desecado y a continuación se secaron durante 30-60 minutos al vacío. Los pocillos se lavaron con un tampón de lavado de estabilización que contiene sacarosa que se describe en la sección Materiales y Métodos, se bloquearon con BSA al

5 % durante 45 minutos y se lavaron una vez más con el tampón de lavado de estabilización. Se añadió una solución de estabilización/de bloqueo (20 µl de fosfato de amonio 305 mM, cloruro de amonio 100 mM, TRITON X-100 al 0,02 %, sacarosa al 2 %, BSA al 2 %, y conservante KATHON al 0,02 %, pH 7,4) y la solución se secó en el pocillo al vacío para formar una torta de reactivo seca en la parte inferior del pocillo.

Una mezcla de anticuerpos de detección etiquetados con STAG (0,5 µl de una mezcla de anticuerpos frente a BotA, FL, ricina, SEB, VEE, e YP a entre 40-240 µg/ml en la solución de estabilización/bloqueo) se distribuyó (usando un dispensador BIO-DOT con una punta de distribución en ángulo) en las paredes de los pocillos justo por encima de la repisa de reactivo seco y se permitió que fluyeran en la repisa. Una solución que contenía 80 ng/ml del analito de control positivo (DNP-FL-BSA) se distribuyó en la pared opuesta. Las soluciones de anticuerpo de detección y control se dejaron secar durante 30-60 minutos al vacío. Las placas se empaquetaron a continuación con desecante hasta su uso.

El protocolo usado para realizar ensayos con estas placas fue: añadir 80 µl de muestra (cantidades definidas de uno o más de los analitos diana en TRITON X-100al 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS)), incubar 1 hora con agitación, lavar con PBS, añadir 150 µl de 1x MSD READ BUFFER T (Meso Scale Diagnostics, LLC) y analizar la placa usando un instrumento MSD Sector® Imager 6000. VEE e YP usados en este ensayo se inactivar mediante radiación. BotA usado en el ensayo se inactivó con formalina.

La tabla que sigue a continuación muestra que las señales observadas en cada aplicación puntual para muestras que no contienen analito (-) o para muestras que contienen 10 ng/ml de BotA, 1 ng/ml de ricina, 50 ng/ml de SEB, 1000 ng/ml de VEE, o 10.000 de CFU/ml de YP. La tabla muestra detección sensible y específica de los analitos diana y rendimiento apropiado de las aplicaciones puntuales de control positivo y negativo.

	Aplicación Puntual de Captura						
Analito	**BotA**	**Ricina**	**SEB**	**VEE**	**YP**	**Neg**	**Pos**
BotA	28893	178	97	182	159	134	9456
Ricina	243	15502	106	222	142	129	8776
SEB	276	165	9518	230	177	162	8288
VEE	1516	233	188	11821	204	237	8506
YP	243	129	107	211	4280	152	8656
-	249	81	75	212	115	121	8923

La siguiente tabla compara las señales observadas con estas placas para ensayos realizados en condiciones comparables excepto por el uso de reactivos de detección líquidos. La tabla proporciona solamente la señal en la aplicación puntual específica para un analito dado y proporciona tanto señal en presencia de analito (10 ng/ml de BotA, 1 ng/ml de ricina, 50 ng/ml de SEB, 1000 ng/ml de VEE, o 10.000 de CFU/ml YP) como señal de fondo en ausencia de analito. La tabla muestra que los ensayos en seco y en húmedo se realizan de forma comparable.

	Señal en Aplicación Puntual Específica			
	Seco		**Húmedo**	
Analito	**Fondo**	**Señal**	**Fondo**	**Señal**
BotA	249	12098	156	4809
Ricina	81	15502	94	12531
SEB	**75**	9518	68	6299
VEE	212	11821	260	7497
YP	115	4280	145	3876

EJEMPLO 6- Ensayos en Placas de Múltiples Pocillos Con Pocillos de Ensayo y Pocillos con Desecante

Este ensayo usó una placa MULTI-SPOT configurada como se muestra en la Figura 9. La placa era similar a la que se muestra en la Figura 8 excepto por la inclusión de los conductos 910 que conectan pares de pocillos adyacentes. Los conductos se proporcionaron con muescas poco profundas que se cortaron en las paredes que separaban los pocillos adyacentes. En este ejemplo, se uso un pocillo de cada par de pocillos para realizar un inmunoensayo

multiplexado y el otro se uso para contener desecante para mantener el pocillo de ensayo en un estado seco durante el almacenamiento. El ensayo usó un inmunoensayo de tipo sándwich multiplexado con reactivos de captura y detección secos preparados como en el Ejemplo 5. Los anticuerpos de captura eran la var. Niger de *anti-Bacillus subtilis* (BG), fago anti-MS2, anti-FL, anti-DNP, e IgG de ratón como un control negativo. La pastilla de anticuerpo de detección seca incluía anti-BG etiquetado, anti-MS2, y anti-ovoalbúmina (Ova) (para la detección de FL-Ova y DNP-Ova).

Después de preparar las placas, los pocillos con desecante se llenaron con aproximadamente 50 mg a 200 mg de desecantes de gel de sílice o DRIERITE (sulfato cálcico) y las placas se sellaron con un sellado con calor de papel de aluminio. Después de sellar el pierde de papel de aluminio a la parte superior de la placa, las muescas en los pocillos proporcionaron conductos entre los conjuntos de ensayo y los pocillos con desecante. Algunas placas se prepararon sin desecante en los pocillos con desecante para comparación. Las placas se mantuvieron a 4 ºC en condiciones secas durante varios días para permitir que los reactivos secos se secaran completamente. A continuación, las placas se expusieron a temperatura y humedad elevadas durante varios días antes de uso para realizar medidas de los organismos diana (usando el protocolo de ensayo del Ejemplo 5).

La Figura 10 proporciona señales para muestras que contienen cantidades definidas de los analitos diana y compara las señales procedentes de placas con desecante de sílice, desecante sulfato cálcico y sin desecante después de exposición a un 60 % de humedad a 30 ºC durante 7 días. Las señales se proporcionan como un porcentaje de la señal obtenida a partir de una placa que se preparó al mismo tiempo que las otras, pero que se habían mantenido secas a 4 ºC durante el período de 7 días. Los resultados indican que los pocillos con desecante eran muy eficaces para mejorar la estabilidad de los reactivos secos al calor y la humedad.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas que se describen en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención que entran dentro del alcance de las reivindicaciones además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas.

Una reivindicación que menciona "que comprende" permite la inclusión de otros elementos que están dentro del alcance de la reivindicación; la invención también se describe mediante tales reivindicaciones que mencionan las expresiones transicionales "que consiste esencialmente en" (es decir, que permite la inclusión de otros elementos que están dentro del alcance de la reivindicación si no influyen de forma material en la operación de la invención) o "que consiste en" (es decir, que permite solamente los elementos enumerados en la reivindicación distintos de impurezas o actividades inconsecuentes que normalmente están asociados con la invención) en lugar de la expresión "que comprende". Cualquiera de estas tres transiciones se puede usar para reivindicar la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una placa de ensayo de múltiples pocillos que comprende un cuerpo de placa con una pluralidad de pocillos definidos en la misma, en la que dicha pluralidad de pocillos comprende:

(a) una superficie de unión que tiene un reactivo de captura inmovilizado en la misma y
(b) un reactivo seco reconstituible, en la que dicho reactivo seco se localiza en una superficie de dicho pocillo que no se superpone con dicha superficie de unión.

2. La placa de ensayo de múltiples pocillos de la reivindicación 1, en la que dicho reactivo seco reconstituible comprende un reactivo de detección etiquetado.

3. La placa de ensayo de múltiples pocillos de la reivindicación 2, en la que dicha superficie de unión está situada en una superficie de la parte inferior de dicho pocillo y dicho reactivo seco reconstituible está situado en una pared de dicho pocillo.

4. La placa de ensayo de múltiples pocillos de la reivindicación 3, en la que dicha pared de dicho pocillo comprende una repisa de almacenamiento de reactivo en la que se sitúa dicho reactivo seco reconstituible.

5. La placa de múltiples pocillos de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que dicha superficie de unión está revestida con una capa protectora reconstituible.

6. Un método para realizar un ensayo en la placa de ensayo de múltiples pocillos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, método que comprende:

(a) añadir muestra a uno o más de dicha pluralidad de pocillos,
(b) reconstituir materiales secos reconstituibles en dicho uno o más pocillos para formar una mezcla(s) de reacción,
(c) incubar dicha mezcla(s) de reacción en condiciones que estimulan la unión de dichos reactivos de captura y detección a sus correspondientes compañeros de unión, y
(d) medir la formación de complejos que comprenden dichos reactivos de captura inmovilizados y dicho reactivo de unión etiquetado.

7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho ensayo es un ensayo de unión de tipo sándwich, y dicho reactivo de captura y dicho reactivo de detección se pueden unir de forma simultánea a un analito de interés.

8. El método de la reivindicación 6, en el que dicho ensayo es un ensayo de unión competitiva y
dicho reactivo de captura se une a un analito de interés y dicho reactivo de detección compite con dicho analito por la unión a dicho reactivo de captura o
dicho reactivo de detección se une a un analito de interés y dicho reactivo de captura compite con dicho analito por la unión a dicho reactivo de detección.

9. Un método para preparar una placa de ensayo de múltiples pocillos para uso en un ensayo, método que comprende realizar lo siguiente en al menos dos pocillos de dicha placa:

(a) inmovilizar un reactivo de captura en una superficie de un pocillo de dicha placa para formar una superficie de unión,
(b) distribuir un reactivo líquido que comprende un reactivo de detección etiquetado a una superficie de dicho pocillo que no se superpone con dicha superficie de unión, y
(c) secar dicho reactivo líquido para formar un reactivo de detección seco reconstituible.

10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha superficie de unión está en la parte inferior de dicho pocillo.

11. El método de la reivindicación 10, en el que dicho reactivo líquido se distribuye y se seca en una pared de dicho pocillo.

12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha pared comprende una repisa de almacenamiento de líquido y en el que dicho reactivo líquido

(i) se distribuye y se seca en dicha repisa o
(ii) se distribuye en dicha pared en una posición por encima de dicha repisa de modo que el reactivo líquido que fluye por la pared se recoge y posteriormente se seca en dicha repisa.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12 que comprende adicionalmente distribuir un reactivo de protección en dicha superficie de unión y secar dicho reactivo de protección para formar una capa protectora reconstituible sobre dicha superficie de unión, en el que dicha distribución y secado de dicho reactivo protector se

produce antes de la distribución de dicho reactivo líquido que comprende un primer reactivo de unión etiquetado.

14. El método de la reivindicación 12, en el que dicho reactivo líquido comprende adicionalmente uno o más reactivos de detección etiquetados adicionales, y dicho reactivo de detección etiquetado y reactivos de detección etiquetados adicionales se diferencian en su especificidad o afinidad por compañeros de unión.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12 y 14 que comprende adicionalmente:

(d) distribuir un reactivo líquido adicional que comprende un control de ensayo para una superficie de dicho pocillo que no se superpone con dicha superficie de unión, teniendo dicho control de ensayo una afinidad de unión hacia dicho reactivo de captura y/o dicho reactivo de detección etiquetado y
(e) secar dicho reactivo líquido adicional para formar un control de ensayo seco reconstituible;
en el que dicho reactivo de detección seco y dicho control de ensayo seco no están en contacto físico.

Figura 1a

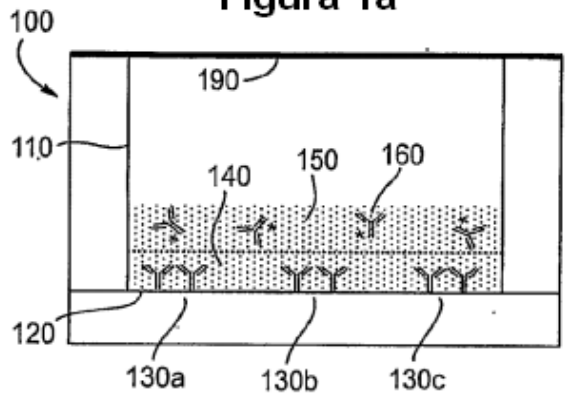


Figura 1b

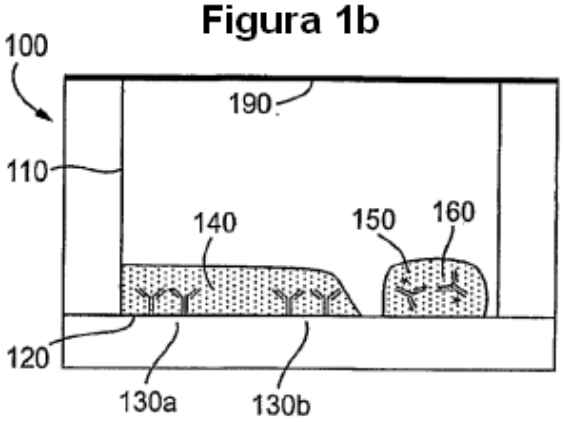


Figura 1c

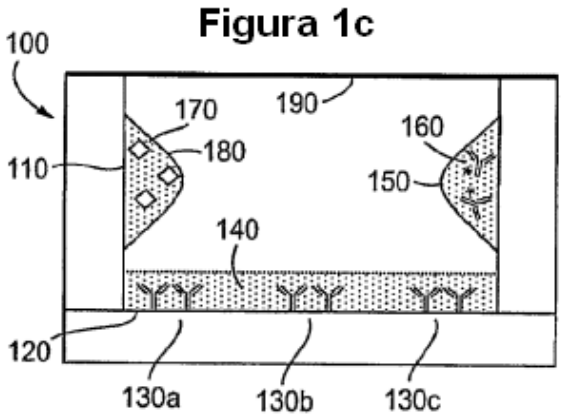


Figura 1d

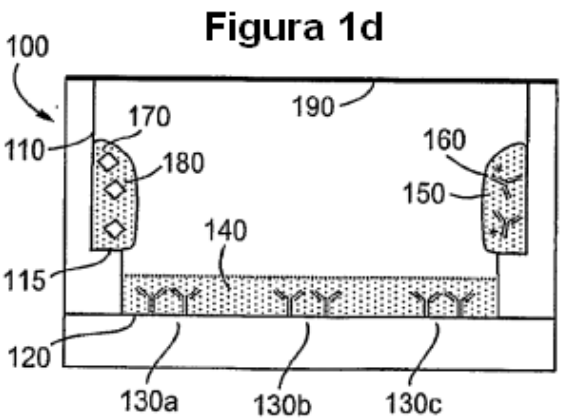


Figura 1e

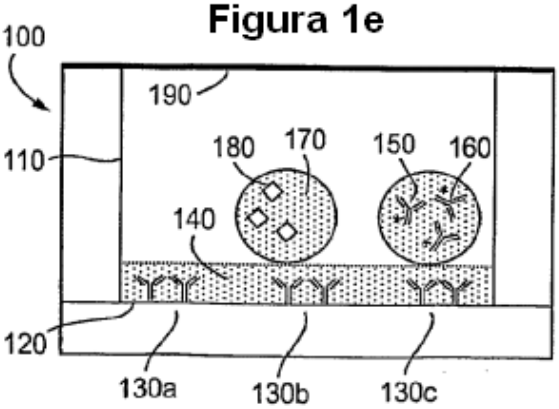


Figura 2a

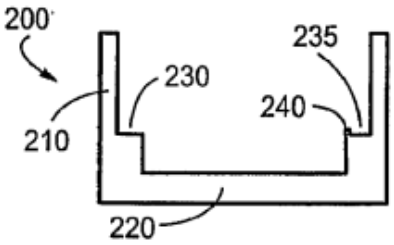


Figura 2b

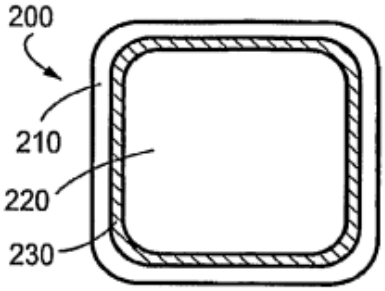


Figura 2c

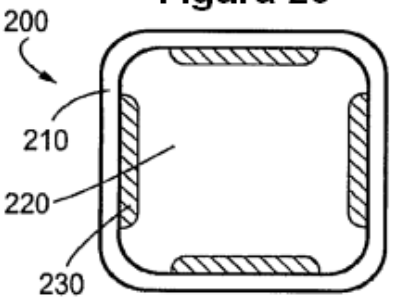


Figura 2d

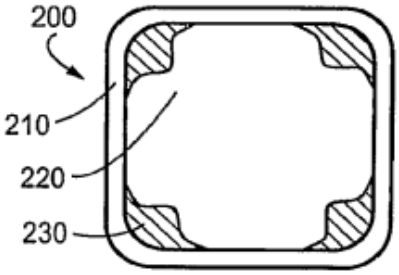


Figura 2e

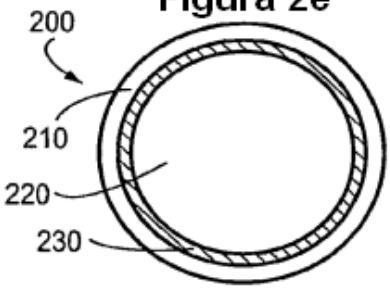


Figura 2f

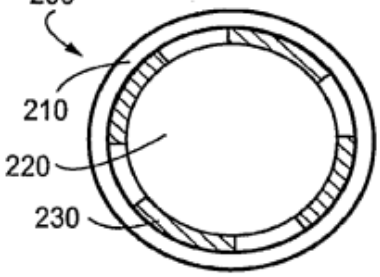


Figura 2g

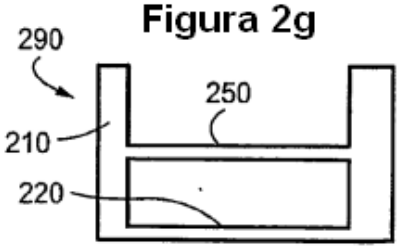


Figura 2h

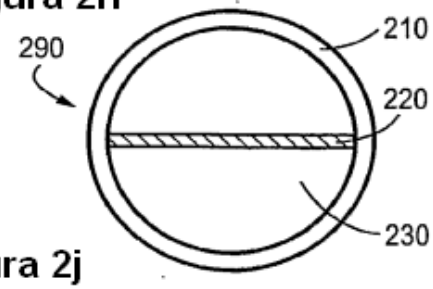


Figura 2i

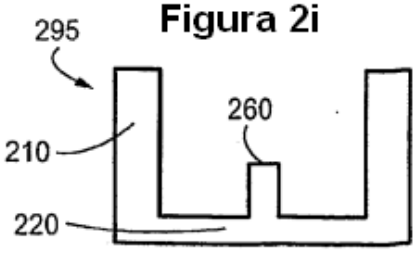


Figura 2j

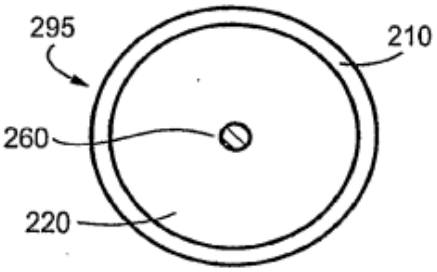


Figura 3a

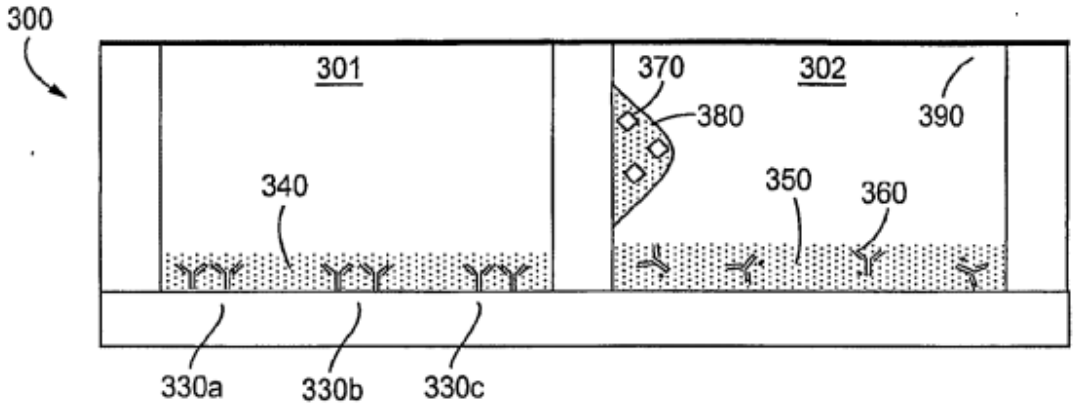


Figura 3b

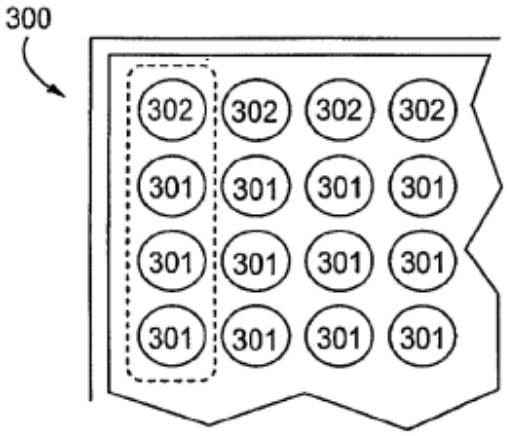


Figura 3c

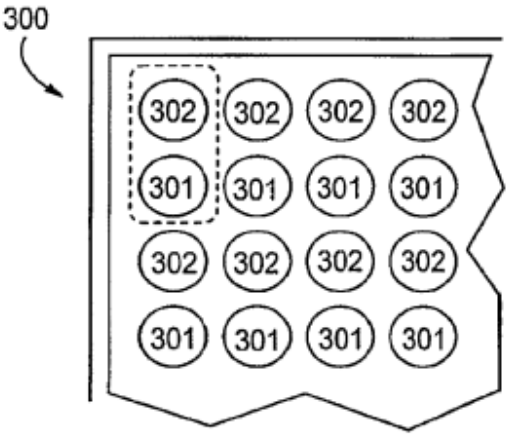


Figura 4a

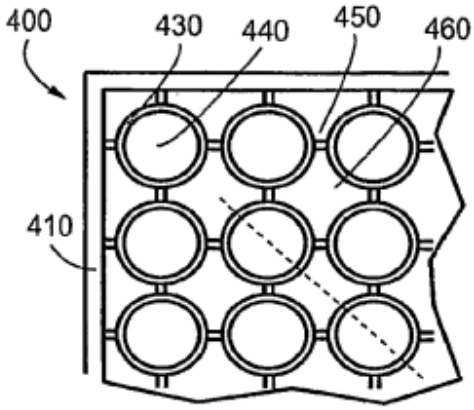


Figura 4b

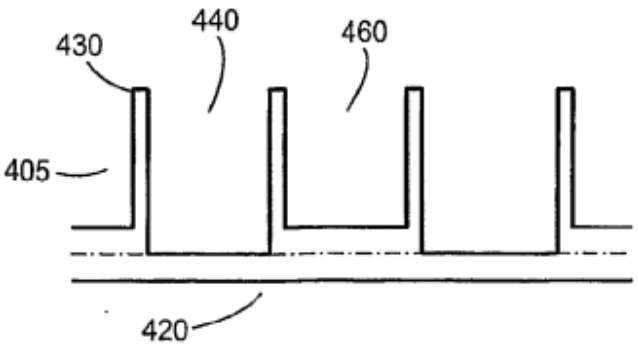


Figura 5a

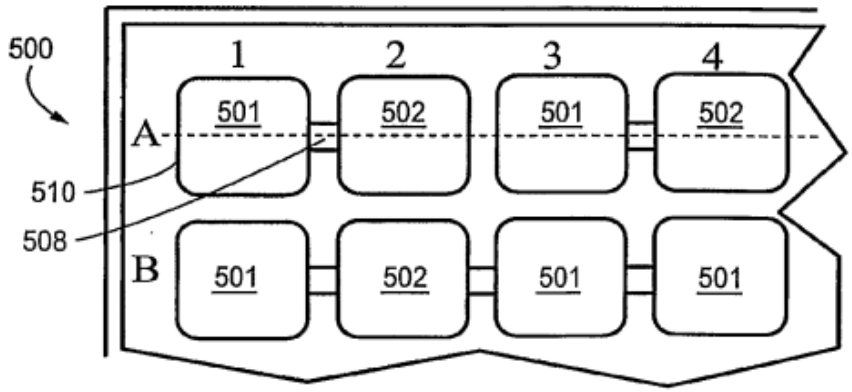


Figura 5b

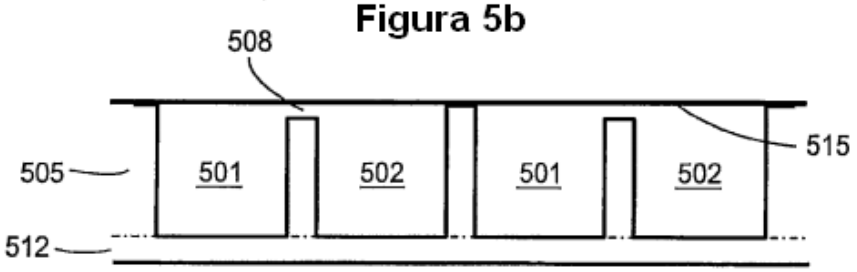


Figura 5c

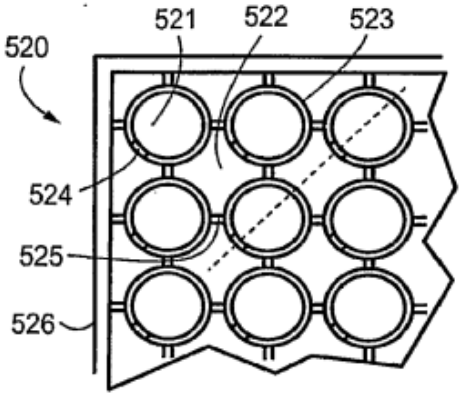


Figura 5d

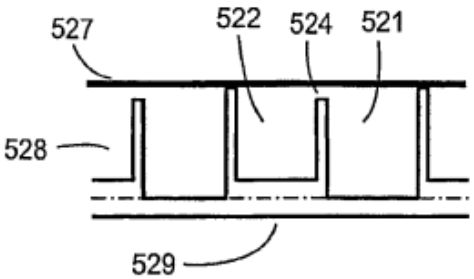


Figura 5e

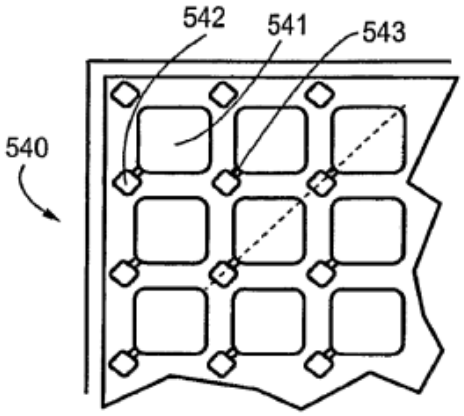


Figura 5f

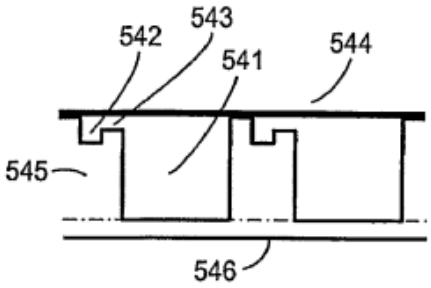


Figura 6

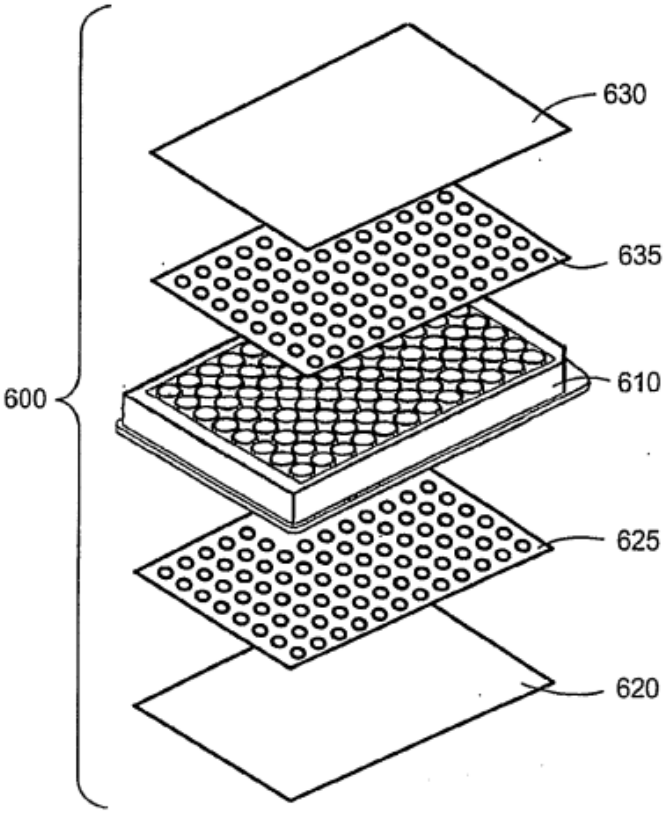


Figura 7a

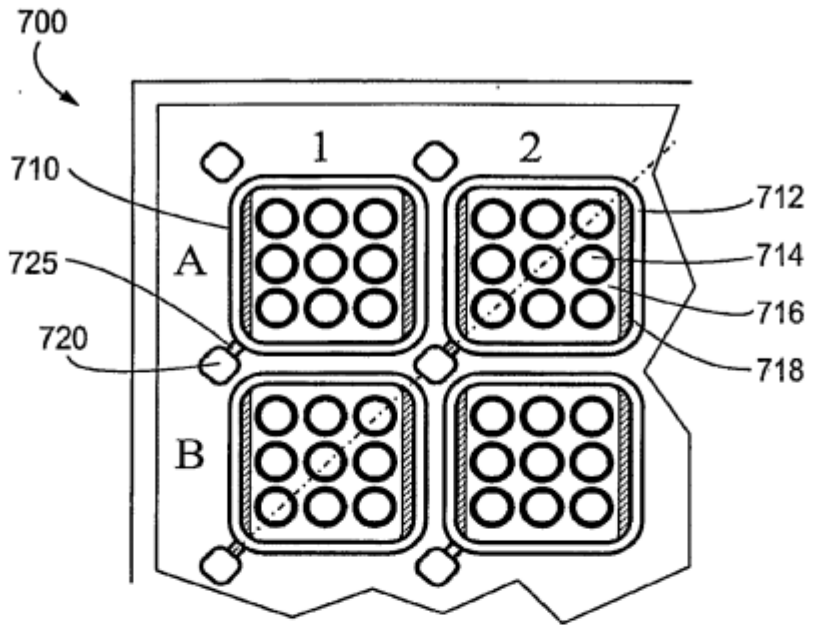


Figura 7b

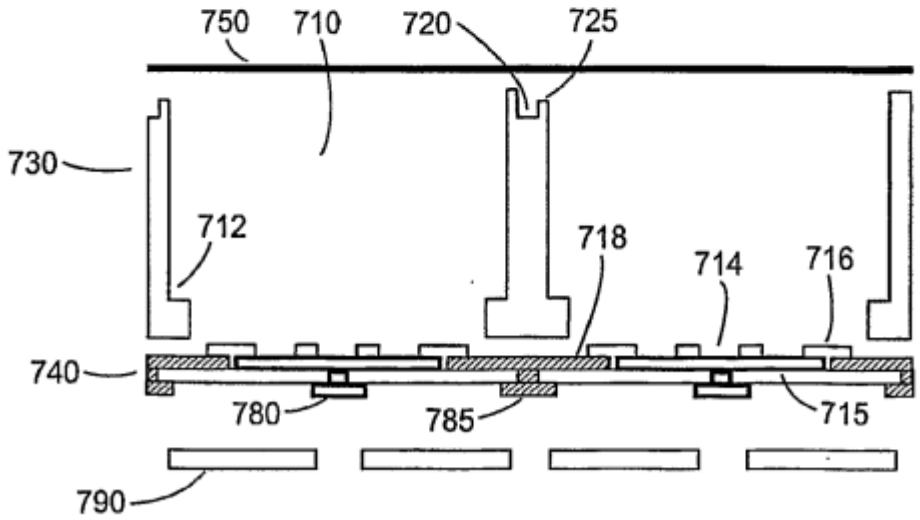


Figura 7c

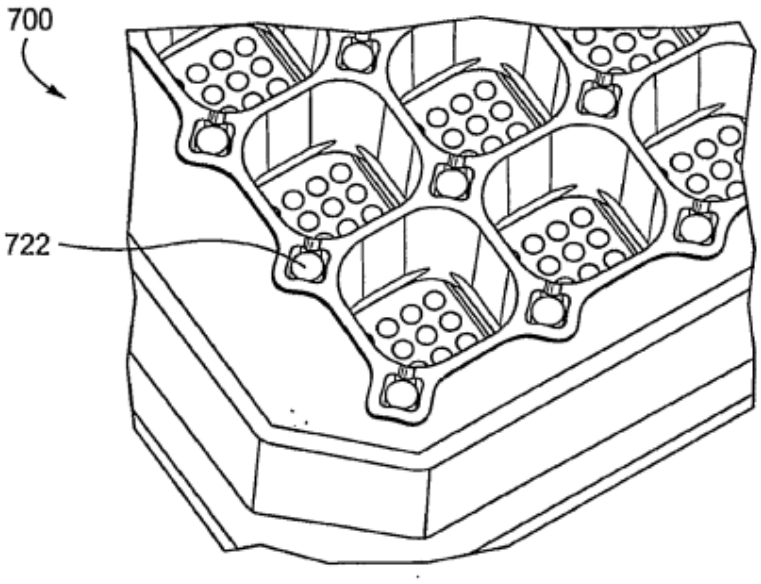


Figura 8

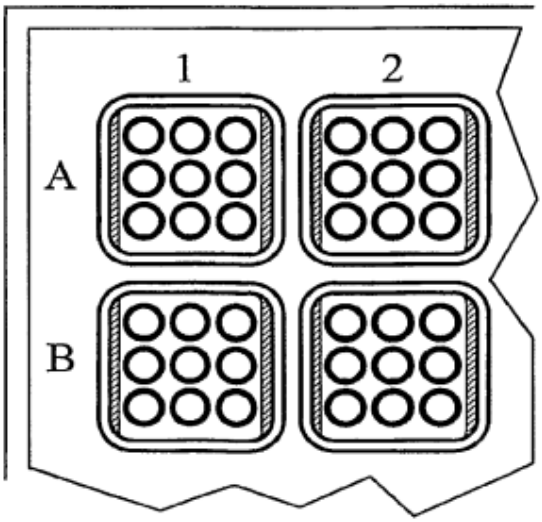


Figura 9

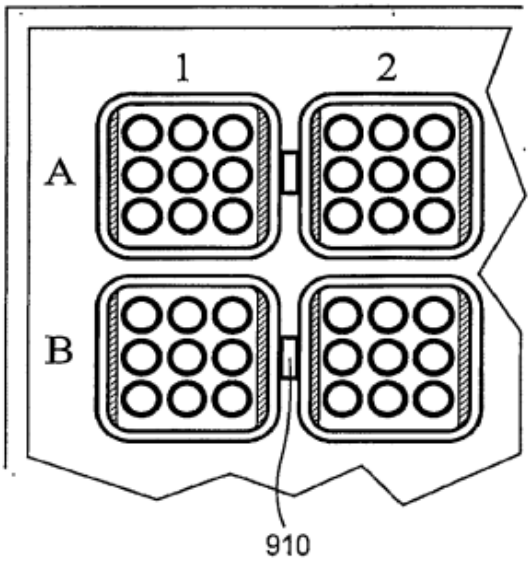
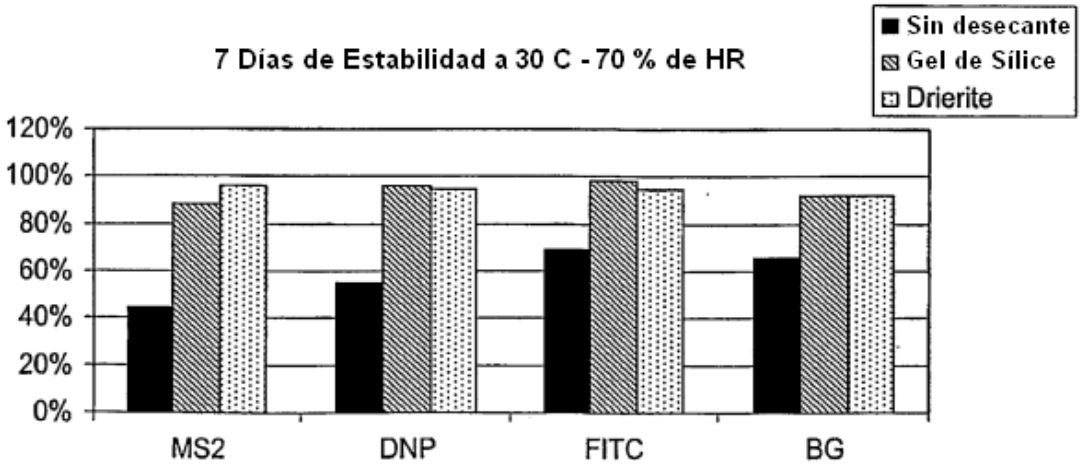



Figura 10