

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 652**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/42 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2016 PCT/JP2016/082638**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17110258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2016 E 16878156 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022 EP 3379242**

54 Título: **Método de medición electroquímica**

30 Prioridad:

22.12.2015 JP 2015249764

18.03.2016 JP 2016055283

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2022

73 Titular/es:

**JAPAN AVIATION ELECTRONICS INDUSTRY,
LIMITED (50.0%)**

21-1, Dogenzaka 1-chome Shibuya-ku

Tokyo 150-0043, JP y

TOHOKU UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

KUNIKATA, RYOTA;

HAYASHI, HIROYUKI;

SUDA, ATSUSHI;

INO, KOSUKE;

INOUE, KUMI y

MATSUE, TOMOKAZU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 905 652 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

Método de medición electroquímica

5 [CAMPO TÉCNICO]

La presente invención se refiere a un método de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en células, agregados celulares, fragmentos de tejido y otras muestras biológicas, y muestras no biológicas que contienen sustancias biológicamente relevantes (que en conjunto se denominan simplemente como "muestras biológicas" en lo sucesivo), excluyendo las muestras biológicas embriones humanos. También se describen un dispositivo de medición electroquímica y un transductor utilizados en la medición electroquímica.

[TÉCNICA ANTERIOR]

El desarrollo de técnicas para evaluar cuantitativamente las sustancias químicas generadas o consumidas en las células contribuye significativamente no solo al desarrollo de la bioquímica fundamental sino también a los campos de la medicina y las ciencias de la vida, como el cribado citológico utilizado para las pruebas de detección del cáncer y similares, la evaluación de la calidad de las células de trasplante utilizadas en medicina regenerativa, terapias de células inmunitarias y similares, y para su uso como sustitutos de la experimentación en animales para evaluaciones de eficacia de fármacos y evaluaciones de toxicidad.

Sin embargo, las bioactividades de las células varían con los entornos que las rodean, tales como la temperatura, el pH, las composiciones del medio, las células adyacentes y las matrices extracelulares, y también varían con el tiempo según los estímulos externos, tales como la introducción de genes, la exposición a fármacos, la aplicación de estrés y similares y eventos celulares tales como división celular y muerte celular.

Por lo tanto, para evaluar las verdaderas propiedades de las células que realmente actúan en un cuerpo biológico, es importante colocar muestras de células vivas (manteniendo al mismo tiempo las bioactividades celulares) en un entorno que sea lo más cercano posible a un entorno intravital y medir una sustancia química generada o consumida en las células en tiempo real con respecto a estímulos externos y eventos celulares.

Un método ampliamente utilizado para colocar células de muestra en un entorno cercano a un entorno intravital es seleccionar como muestra un agregado celular (esferoide) que es un agregado de múltiples células y componentes de la matriz extracelular (MEC), en lugar de una sola célula.

Esto se debe a que muchas de las diversas bioactividades de las células experimentan una interacción con las células adyacentes y la MEC que contacta con las células y, por lo tanto, un agregado celular que es un agregado de ellas puede replicar un entorno intravital con mayor fidelidad.

Dichos agregados de células pueden incluir esferoides de células de los islotes pancreáticos obtenidas a partir del páncreas, óvulos fertilizados no humanos, células hepáticas y células nerviosas obtenidas mediante cultivo celular y cuerpos embrioides de células madre embrionarias ("ES cells").

Si bien dichos agregados celulares tienen diámetros que difieren según los tipos de células componentes, las regiones de un cuerpo biológico a partir de las cuales se obtuvieron los agregados celulares, las condiciones de cultivo y similares, los agregados celulares que tienen diámetros de aproximadamente 100 a 600 μm se usan a menudo en la evaluación de actividades celulares. Esto se debe a que el número de células componentes en un agregado celular pequeño con un diámetro de 100 μm o menor es demasiado pequeño para que aparezcan bioactividades específicas de los agregados celulares, mientras que en un agregado celular grande con un diámetro de 600 μm o mayor, el oxígeno no se difunde a las células en la parte central del agregado celular y es probable que ocurra necrosis celular.

Como enfoque para medir una sustancia química generada o consumida en las células en tiempo real, se utiliza un enfoque electroquímico. El enfoque electroquímico requiere electrodos (electrodos de trabajo) que se colocan en la misma solución junto con una muestra y se usan para detectar varias señales electroquímicas de la muestra. Existen varios métodos de detección con variaciones en el control de potencial o control de corriente de los electrodos de trabajo. En mediciones relacionadas con actividades metabólicas de células o similares, se ha utilizado electrólisis potencioestática (electrólisis de potencial constante) ejemplificada por cronoamperometría y voltamperometría cíclica debido a su alto rendimiento de comparación y simplicidad de análisis. En la electrólisis potencioestática, el potencial de un electrodo de trabajo se controla en función del tiempo y durante el control se detecta un valor de corriente que aparece en el electrodo de trabajo.

En la medición electroquímica de una sustancia química generada o consumida en un agregado celular común, un sistema de reacción que hace que una sustancia química que tiene una actividad redox se genere dentro del agregado celular o en la superficie del agregado celular en asociación con el metabolismo de la sustancia del agregado celular se incorpora y se oxida o reduce en un electrodo de trabajo para generar una corriente.

Si bien se pueden diseñar varios sistemas que dependen de un sistema metabólico de interés como sistemas de reacción que hacen que se genere una sustancia química que tiene una actividad redox en asociación con el metabolismo de sustancias de las células, los sistemas que usan una reacción enzimática se usan popularmente, entre otros, con el propósito de detectar una cantidad traza de sustancia metabólica con alta sensibilidad.

Por ejemplo, en un cuerpo embrioide que es un agregado celular hecho de células ES de ratón, la cantidad de fosfatasa alcalina (ALP), que es una enzima existente en la superficie de las células, aumenta o disminuye según el estado de diferenciación del cuerpo embrioide.

Con el fin de evaluar el estado de diferenciación de un cuerpo embrioide, a menudo se realiza una evaluación electroquímica de la cantidad de ALP generada (Bibliografía 1 que no es de patentes). En el sistema de evaluación, se coloca un cuerpo embrioide en una solución en la que se disuelve fosfato de p-aminofenilo (PAPP), que es una sustancia sustrato, y se facilita una desfosforilación por la actividad de la enzima ALP, generando así p-aminofenol (PAP) que tiene actividad redox.

Cuando la concentración de PAPP en la solución es lo suficientemente alta, las cantidades de PAP, que es una sustancia química activa redox, pueden acumularse con el tiempo por la actividad enzimática de PAP incluso aunque la cantidad de ALP generada a partir de las células sea ultra baja. En consecuencia, la cantidad de ALP existente se puede detectar con alta sensibilidad.

La bibliografía 1 de patentes describe estéreos-electrodos mejorados con nanoestructuras, métodos para fabricar electrodos mejorados con nanoestructuras y métodos de uso para dispositivos equipados con estéreos-electrodos mejorados con nanoestructuras.

La bibliografía 2 de patentes se refiere a microelectrodos nanoestructurados y dispositivos biosensores que incorporan los mismos.

La bibliografía 2 que no es de patentes describe la monitorización de la actividad de la fosfatasa alcalina de cuerpos embrioides de células madre embrionarias de ratón utilizando un dispositivo amperométrico basado en integración a gran escala (LSI) con 400 sensores y un paso de 250 µm. Se realizó un análisis de simulación para revelar la relación posicional entre los cuerpos embrioides y los electrodos sensores hacia mediciones más precisas. Se muestra que el análisis de simulación se puede aplicar para obtener imágenes electroquímicas precisas de células cultivadas tridimensionalmente mediante la normalización de las señales actuales.

También se hace referencia a las bibliografías 3 a 6 de patentes y a la bibliografía 3 que no es de patentes.

[BIBLIOGRAFÍA DE LA TÉCNICA ANTERIOR]

[BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES]

Bibliografía 1 de patentes: US 2009/297913 A1
Bibliografía 2 de patentes: WO 2010/025547 A1
Bibliografía 3 de patentes: EP 1 406 086 A1
Bibliografía 4 de patentes: WO 2015/151395 A1
Bibliografía 5 de patentes: WO 2014/073195 A1
Bibliografía 6 de patentes: JP 2005 148058 A

[BIBLIOGRAFÍA QUE NO ES DE PATENTES]

Bibliografía 1 que no es de patentes: M. Sen, et al., "LSI-based Amperometric Sensor for Real-time Monitoring of Embryoid Bodies" ("Sensor amperométrico basado en LSI para Monitorización de cuerpos embrioides en tiempo real"), Biosensors and Bioelectronics ("Biosensores y Bioelectrónica"), 2013, vol. 48, pp (págs.). 12 - 18

Bibliografía 2 que no es de patentes: Y. Kanno et al., "Simulation Analysis of Positional Relationship between Embryoid Bodies and Sensors on an LSI-based Amperometric Device for Electrochemical Imaging of Alkaline Phosphatase Activity" ("Análisis de simulación de relación posicional entre cuerpos embrioides y sensores en un dispositivo amperométrico basado en LSI para la obtención de imágenes electroquímicas de la actividad de fosfatasa alcalina", Analytical Sciences ("Ciencias Analíticas"), vol. 31, 10 de julio de 2015, pp. (págs.) 715 - 719- Bibliografía 3 que no es de patentes: K. Ino et al., "Electrochemical Device with Interdigitated Ring Array Electrodes for Investigating the Relationship between Cardiomycyte Differentiation" ("Dispositivo electroquímico con electrodos de grupos de anillos interdigitados para investigar la relación entre la diferenciación de cardiomiocitos", Embryonic Stem Cells and Alkaline Phosphatase Activity, Electrochemistry" ("Células madre embrionarias y actividad de fosfatasa alcalina, Electroquímica"), vol. 81, N.º 9, 2019, pp. (págs.) 682 - 687

[COMPENDIO DE LA INVENCION]

[PROBLEMAS QUE SE HAN DE RESOLVER CON LA INVENCION]

Una sustancia química redox activa que se genera o consume en células dispersadas radialmente por un mecanismo de difusión estando las células colocadas en un centro a menos que se ejerza una acción hidrodinámica especial externa y parte de la sustancia química alcance un electrodo de trabajo y experimente oxidación o reducción. En consecuencia, la cantidad de corriente generada en este momento se ve significativamente afectada por la cantidad de la sustancia química generada o consumida y la distancia de difusión de la sustancia química al electrodo de trabajo.

Sin embargo, si se forma un electrodo de trabajo sobre un sustrato y se coloca una muestra cerca del electrodo de trabajo, se inhibe el suministro de una sustancia de sustrato disuelta en una solución a la muestra debido al pequeño espacio entre la muestra y el sustrato. En consecuencia, la cantidad de una sustancia química generada a partir de la muestra por una reacción enzimática es menor que cuando la muestra está lejos del sustrato y suspendida en la solución. Además, dado que el volumen de espacio entre la muestra y el electrodo de trabajo es pequeño, la mayor parte de la sustancia química generada no puede permanecer en el espacio y se dispersa. Dado que la sustancia química dispersada está a una distancia mayor del electrodo de trabajo, la cantidad de sustancia química que llega al electrodo de trabajo disminuye y, como resultado, la sensibilidad disminuye (problema 1).

Además, dado que existe una influencia de irregularidad de la superficie de una muestra y la muestra no es necesariamente esférica, la precisión del control de la distancia vertical entre el electrodo de trabajo y la muestra es limitada. Dado que la distancia vertical puede variar normalmente al menos varios micrómetros cada vez que se realiza una medición, la distancia de difusión de una sustancia química resulta inconstante y el rendimiento de comparación y la reproducibilidad de la medición disminuyen (problema 2).

En la bibliografía 1 que no es de patentes, las cantidades de sustancias químicas se miden utilizando electrodos de trabajo sobre un sustrato, que tiene los problemas 1 y 2 descritos anteriormente.

Por otro lado, a veces se utilizan electrodos de trabajo de tipo sonda (electrodos de sonda) en lugar de electrodos de trabajo sobre un sustrato. Dado que la punta de un electrodo de sonda suele ser mucho más pequeña que una muestra, la inhibición del suministro de una sustancia disuelta a la muestra en una solución por el electrodo de sonda y su soporte es menor que la inhibición de un electrodo sobre un sustrato. En consecuencia, el problema 1 descrito anteriormente no es significativo. Además, la posición de un electrodo de sonda con respecto a una muestra normalmente se controla con precisión del orden de micrómetros mediante un manipulador. En consecuencia, no surge el problema 2 descrito anteriormente.

Sin embargo, el control de la posición de un electrodo de sonda requiere equipo costoso tal como un manipulador y un sistema de microscopio para observar la posición de la punta de la sonda. Además, los electrodos de sonda a menudo se rompen por usuarios sin experiencia.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de medición electroquímica que sea capaz de mejorar la sensibilidad, el rendimiento de comparación y la reproducibilidad de la medición electroquímica que utiliza electrodos de trabajo formados en un sustrato, por ejemplo, y colocados y fijados en una solución en lugar de utilizar electrodos de sonda como electrodos de trabajo.

[MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS]

En vista del problema anterior, la presente invención proporciona un método de medición electroquímica según la reivindicación 1.

Un método de medición electroquímica según un aspecto de la presente invención es un método de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica en una solución, en el que la muestra biológica, que tiene un diámetro de entre 100 μm , inclusive, y 600 μm , inclusive, incluye células, agregados celulares, fragmentos de tejido o muestras no biológicas que contienen sustancias biológicamente relevantes, siempre que la muestra biológica excluya embriones humanos, el método incluye: realizar una simulación en la cual la condición dada incluye una dimensión de la superficie de un electrodo de un electrodo de trabajo que suministra o recibe electrones hacia o desde la sustancia química para provocar una reacción de oxidación-reducción y la dimensión de la muestra biológica, y en el que el valor de una corriente que fluye a través del electrodo de trabajo se calcula como una función de la distancia entre la muestra biológica y la superficie del electrodo en una dirección vertical perpendicular a la superficie del electrodo, sobre la base de la velocidad de una reacción química en la que la sustancia química se genera o consume en la muestra biológica, un cambio en la distribución de la concentración de la sustancia química en la solución y la velocidad a la que se suministran o reciben electrones hacia o desde la sustancia química en la superficie del electrodo, asumir que la sustancia química que se difunde en la solución al electrodo de trabajo provoca la reacción de oxidación-reducción en el electrodo de trabajo y se detecta como el valor de la corriente, para obtener un intervalo de la distancia en la dirección vertical que incluye un punto en el que la corriente toma un valor máximo, teniendo una curva del valor de la corriente forma de arco con un pico en el punto, siendo definido el intervalo de tal modo que el valor de la corriente dentro del intervalo es mayor

o igual al 90% del valor máximo; y realizar la medición colocando la muestra biológica en la solución a una distancia de medición alejada de la superficie del electrodo en la dirección vertical usando un separador que impide que la muestra biológica entre en una región en el lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y que permite que la sustancia química se difunda al electrodo de trabajo, estando situada la distancia de medición dentro del intervalo.

Un método de medición electroquímica según un primer ejemplo que no está cubierto por la reivindicación es un método de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica en una solución que tiene un diámetro de entre 100 μm , inclusive, y 600 μm , inclusive, mediante el uso de un electrodo de trabajo que tiene un diámetro menor o igual a 80 μm y suministra y recibe electrones hacia y desde la sustancia química para provocar una reacción de oxidación-reducción, en el que se coloca un separador en la solución, teniendo el separador una superficie de perfil a una distancia h_1 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, satisfaciendo la distancia h_1

[Formula 1]

$$h_1 = 21.8 \frac{d_{el} + 0.8}{d_{el} + 9.7} \pm 5 \quad [\mu\text{m}]$$

impidiendo el separador que la muestra biológica entre en una región del lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permitiendo que una sustancia disuelta se difunda en la solución; y la medición se realiza mientras la muestra biológica está colocada a lo largo de la superficie del perfil del separador.

Un método de medición electroquímica según un segundo ejemplo que no está cubierto por la reivindicación es un método de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica en una solución que tiene un diámetro de entre 100 μm , inclusive, y 600 μm , inclusive, mediante el uso de un electrodo de trabajo que tiene un diámetro d_{el} menor o igual a 80 μm y suministra y recibe electrones hacia y desde la sustancia química para provocar una reacción de oxidación-reducción, en el que se coloca un separador en la solución, teniendo el separador una superficie de perfil en forma de cono invertido a una distancia h_2 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, dependiendo la distancia h_2 de una distancia m desde un centro de la superficie del electrodo en la dirección paralela a la superficie del electrodo y satisfaciendo

$$h_2 = \sqrt{\{(1.05 d_{el} + 6.89)m\}} - 0.48 d_{el} - 2.38 \pm 5 \quad [\mu\text{m}]$$

impidiendo el separador que la muestra biológica entre en una región del lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permitiendo que se difunda una sustancia disuelta en la solución; y la medición se realiza mientras la muestra biológica está colocada inmediatamente encima del centro de la superficie del electrodo a lo largo de la superficie del perfil del separador.

Un dispositivo de medición electroquímica según el primer ejemplo es un dispositivo de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica en una solución mediante el uso de un electrodo de trabajo que incluye una superficie de electrodo que suministra y recibe electrones hacia y desde la sustancia química. para provocar una reacción de oxidación-reducción, en el que la superficie del electrodo tiene un diámetro d_{el} menor o igual a 80 μm ; y hay previsto un separador en un depósito de solución que contiene la solución y la muestra biológica, teniendo el separador una superficie de perfil a una distancia h_1 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, satisfaciendo la distancia h_1

[Formula 2]

$$h_1 = 21.8 \frac{d_{el} + 0.8}{d_{el} + 9.7} \pm 5 \quad [\mu\text{m}]$$

impidiendo el separador que la muestra biológica entre en una región del lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permitiendo que una sustancia disuelta se difunda en la solución.

Un dispositivo de medición electroquímica según el segundo ejemplo es un dispositivo de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica en una solución mediante el uso de un electrodo de trabajo que incluye una superficie de electrodo que suministra y recibe electrones hacia y desde la sustancia química. para provocar una reacción de oxidación-reducción, en el que la superficie del electrodo tiene un diámetro d_{el} menor o igual a 80 μm ; y hay previsto un separador en un depósito de

solución que contiene la solución y la muestra biológica, teniendo el separador una superficie de perfil en forma de cono invertido a una distancia h_2 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, dependiendo la distancia h_2 de una distancia m desde un centro de la superficie del electrodo en la dirección paralela a la superficie del electrodo y satisfaciendo

$$h_2 = \sqrt{\{(1.05 d_{el} + 6.89)m\}} - 0.48 d_{el} - 2.38 \pm 5 [\mu m],$$

impidiendo el separador que la muestra biológica entre en una región del lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permitiendo que una sustancia disuelta se difunda en la solución.

Un transductor según el primer ejemplo es un transductor que incluye un depósito de solución que puede contener una solución y una muestra biológica sumergida en la solución, estando montado el depósito de solución en un chip LSI, usándose el transductor para la medición electroquímica de una sustancia química generada o consumida en la muestra biológica, en el que un electrodo provisto en el chip LSI, colocado en una superficie inferior del depósito de solución y que tiene una superficie de electrodo con un diámetro d_{el} menor de $80 \mu m$, y un separador fabricado sobre el electrodo y que tiene una superficie de perfil a una distancia h_1 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, satisfaciendo la distancia h_1

[Formula 3]

$$h_1 = 21.8 \frac{d_{el} + 0.8}{d_{el} + 9.7} \pm 5 [\mu m]$$

impidiendo el separador que la muestra biológica entre en una región en el lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permitiendo que una sustancia disuelta se difunda en la solución, están previstos en el depósito de la solución.

Un transductor según el segundo ejemplo es un transductor que incluye un depósito de solución que puede contener una solución y una muestra biológica sumergida en la solución, estando montado el depósito de solución en un chip LSI, usándose el transductor para la medición electroquímica de una sustancia química generada o consumida en la muestra biológica, en el que un electrodo previsto en el chip LSI, colocado en una superficie inferior del depósito de solución y que tiene una superficie de electrodo con un diámetro d_{el} menor de $80 \mu m$, y un separador fabricado sobre el electrodo y que tiene una superficie de perfil en forma de cono invertido a una distancia h_2 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, dependiendo la distancia h_2 de una distancia m desde un centro de la superficie del electrodo en la dirección paralela a la superficie del electrodo, satisfaciendo la distancia h_2

$$h_2 = \sqrt{\{(1.05 d_{el} + 6.89)m\}} - 0.48 d_{el} - 2.38 \pm 5 [\mu m],$$

Impidiendo el separador que la muestra biológica entre en una región en el lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permitiendo que una sustancia disuelta se difunda en la solución, están previstos en el depósito de la solución.

[EFECTOS DE LA INVENCION]

En un método de medición electroquímica según la presente invención, la medición se realiza colocando una muestra biológica a una distancia predeterminada alejada de la superficie del electrodo de un electrodo de trabajo en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo, proporcionando así un espacio a través del cual una sustancia disuelta en una solución puede difundirse para suministrar una cantidad suficiente de la sustancia disuelta a la muestra biológica.

Por lo tanto, el método de medición electroquímica según la presente invención es capaz de aumentar la cantidad de una sustancia química generada o consumida en la muestra biológica y detectada en el electrodo de trabajo y mejorar la sensibilidad de la medición en consecuencia en comparación con los métodos de medición electroquímica convencionales en los que la medición se realiza colocando una muestra biológica cerca de la superficie del electrodo de un electrodo de trabajo.

Además, dado que la muestra biológica se coloca a una distancia predeterminada de la superficie del electrodo de trabajo, el método de medición de la presente invención es capaz de reducir las influencias de las variaciones en la distancia de difusión de la sustancia química que están asociadas con variaciones en la distancia vertical entre el electrodo de trabajo y la muestra biológica debido a la forma y condiciones de la superficie de la muestra biológica, lo que mejora el rendimiento de comparación y la reproducibilidad de la medición en comparación con los métodos de medición electroquímicos convencionales en los que una muestra biológica se coloca cerca de la superficie del electrodo de un electrodo de trabajo.

Además, un dispositivo de medición electroquímica y un transductor como los descritos permiten que dicha medición electroquímica se realice con éxito.

5 [BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS]

La figura 1 es un gráfico que ilustra la relación entre la distancia z electrodo-muestra y el valor I de corriente;
La Figura 2 es un gráfico que ilustra la relación entre el diámetro d_{sp} de la muestra y la distancia efectiva z electrodo-muestra;

10 La Figura 3 es un gráfico que ilustra la relación entre el diámetro d_{el} del electrodo y distancia efectiva z electrodo-muestra;

La Figura 4 es un gráfico que ilustra la relación entre la distancia z electrodo-muestra, el valor I de corriente y la velocidad V_{max} de reacción;

15 La figura 5 es un gráfico que ilustra la relación entre la distancia z electrodo-muestra, el valor I de corriente y el coeficiente D de difusión;

La figura 6 es un diagrama esquemático para explicar una configuración y disposición ejemplares de un separador que tiene una altura uniforme;

La figura 7 es un diagrama esquemático para explicar una configuración y disposición ejemplares de un separador en forma de cono invertido;

20 La figura 8A es una vista en planta que ilustra un ejemplo de un transductor como se ha descrito y la figura 8B es una vista en sección transversal del transductor ilustrado en la figura 8A; y

La figura 9 es una vista en perspectiva del transductor ilustrado en la figura 8A.

[DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES]

25 La relación entre un proceso de difusión de una sustancia disuelta en una solución relacionada con una reacción química que ocurre en una muestra y una corriente que fluye a través de un electrodo en un sustrato se analizó en detalle en la medición electroquímica y se encontró que la cantidad de corriente aumentó. y la sensibilidad de la medición se mejoró colocando una muestra a cierta distancia determinada por el diámetro del electrodo y el diámetro de la muestra lejos del electrodo en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo para formar, debajo de la muestra, una trayectoria a través de la cual la solución se difunde libremente, en comparación con cuando la muestra se coloca inmediatamente encima y cerca del electrodo.

35 Además, se encontró que las variaciones en los valores de corriente causadas por la baja precisión del control de posición de una muestra con respecto al electrodo se redujeron colocando la muestra lejos del electrodo en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo y el rendimiento de comparación y la reproducibilidad de la medición mejoraron en comparación con las variaciones cuando la muestra se colocó inmediatamente encima y cerca del electrodo.

40 En primer lugar, a continuación, se describirán los resultados de una simulación que ha conducido a los hallazgos descritos anteriormente.

En la simulación se utilizó el software de simulación COMSOL Multiphysics. Se eligió un cuerpo embrioide formado a partir de células ES de ratón como muestra modelo. Como sustancia química a generar a partir de la muestra, se eligió el PAP generado por reacción enzimática ALP en la superficie de la muestra. Se asumió que la sustancia química generada a partir de la muestra se difunde a un electrodo (electrodo de trabajo), luego provoca una reacción de oxidación-reducción en el electrodo y se detecta como valores de corriente. Las otras condiciones fueron las que se indican a continuación.

50 <Reacción enzimática>

La reacción de la enzima ALP usando PAPP, que es una sustancia disuelta en una solución, avanza y se genera PAP. Se supuso que la velocidad v de la reacción (velocidad de generación) seguía la ecuación de Michaelis-Menten (1) dada a continuación.

55 [Fórmula 4]

$$v = \frac{A_{sp} V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \dots \quad (1)$$

Aquí A_{sp} es el área de la muestra, V_{max} es la velocidad de reacción por unidad de superficie de la muestra cuando la concentración de la sustancia del sustrato es infinita, K_m es la constante de Michaelis de la reacción de la enzima ALP, y $[S]$ es la concentración de la sustancia del sustrato. Valores de V_{max} y k_m se establecieron en $2,65 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ y $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, respectivamente. El valor inicial de $[S]$ era de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

<Reacción del electrodo>

Se asumió que la reacción de oxidación de doble electrón de PAP generada a partir de la muestra progresa en el electrodo. Se asumió que el potencial del electrodo era lo suficientemente alto para que la reacción fuera una reacción controlada por difusión completa. Se supuso que el valor I de corriente durante la reacción seguía las ecuaciones (2) y (3) dadas a continuación.

[Fórmula 5]

$$I = \int_{A_{el}} i(x, y) dA_{el} \quad \dots \quad (2)$$

$$i(x, y) = nFD \frac{dc(x, y)}{dz} \quad \dots \quad (3)$$

Aquí, $i(x, y)$ y $c(x, y)$ son la densidad de corriente y la concentración de la sustancia química a detectar, respectivamente, en un punto arbitrario (x, y) en la superficie del electrodo, A_{el} es el área del electrodo, n es el número de electrones involucrados en la reacción, F es la constante de Faraday y D es el coeficiente de difusión de la sustancia química a detectar en la solución. n , F y D se establecieron en $2,964 \times 10^4 \text{ C/mol}$ y $6,47 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, respectivamente. El valor I de corriente adquirido 200 segundos después del inicio de la reacción del electrodo se mostró como resultado de la medición.

<Otras condiciones>

Forma de la muestra: Diámetro $d_{sp} = 200 \text{ } \mu\text{m}$, esférica

Forma del electrodo (superficie del electrodo): diámetro $d_{el} = 20 \text{ } \mu\text{m}$, circular

Posición del electrodo: Configurado de tal manera que la distancia horizontal entre las coordenadas centrales de la superficie del electrodo y las coordenadas centrales de la muestra (x, y) es 0

Distancia z entre la superficie del electrodo y el extremo inferior de la muestra: 0 - 80 μm

Se investigó cómo cambiaba el valor I de corriente resultante de la reacción de oxidación-reducción de la sustancia química generada a partir de la muestra dependiendo de la distancia z entre el electrodo y el extremo inferior de la muestra. La Figura 1 ilustra el resultado de la simulación indicando la relación entre el valor I de corriente y la distancia z .

Puede verse a partir del resultado que el gráfico del valor I de corriente es una curva en forma de arco con el pico en $z = 16 \text{ } \mu\text{m}$. Así, se encontró que colocando una muestra a una distancia óptima a la que se puede obtener el valor de corriente de pico, la sensibilidad de la medición puede mejorarse significativamente en comparación con cuando la muestra estaba a una distancia $z = 0 \text{ } \mu\text{m}$. Se obtuvieron tendencias de z similares a esta tendencia de z , cuando el diámetro d_{el} del electrodo y el diámetro d_{sp} de la muestra se cambiaron.

Además, se puede ver que cuando z está en o cerca de la distancia óptima descrita anteriormente, las variaciones en el valor I de corriente a medida que z cambia hacia arriba y hacia abajo son significativamente menores que cuando $z = 0 \text{ } \mu\text{m}$. Cuando la muestra es una célula, un agregado celular, un fragmento de tejido o similar, es difícil controlar z con una precisión de varios micrómetros porque hay influencias de irregularidad en la superficie de la muestra y la muestra no tiene necesariamente forma esférica. Sin embargo, establecer z en o cerca de la distancia óptima como se ha descrito anteriormente puede reducir las variaciones en el valor I de corriente debido a la baja capacidad de control de z , lo que da como resultado mejoras en el rendimiento cuantitativo relativo y en la reproducibilidad.

Los efectos de las mejoras en el rendimiento cuantitativo relativo y en la reproducibilidad resultan más notables a medida que z está situada más cerca de la distancia óptima y son especialmente notables cuando z está en un intervalo en el que el valor de corriente es el 90 % o más del valor de corriente de pico. Por lo tanto, se puede ver que, ajustando z a un valor en este intervalo, se pueden lograr efectos elevados en términos de una mejora en la sensibilidad, así como mejoras en el rendimiento cuantitativo relativo y en la reproducibilidad.

Se ha demostrado a partir de los resultados de varias simulaciones realizadas que el intervalo de z efectivo descrito anteriormente varía significativamente según las condiciones de medición, en particular el diámetro del electrodo y el

diámetro de la muestra. Por lo tanto, para evaluar una muestra que tiene un diámetro particular, se debe prever un electrodo que tenga un diámetro y una z apropiados.

Sin embargo, en el caso de muestras biológicas tales como células, agregados celulares o fragmentos de tejido, los diámetros de las muestras varían ampliamente dependiendo de los tipos y condiciones de las células componentes. Además, los diámetros de las muestras tomadas de la misma región del mismo cuerpo de prueba o muestras adquiridas bajo las mismas condiciones de cultivo varían de una muestra a otra en varios cientos de micrómetros. Verificar el diámetro de cada una de esas muestras y establecer un diámetro de electrodo y una z apropiados antes de la medición no es realista en términos de costo. Además, es significativamente difícil comparar cuantitativamente los resultados de medición adquiridos con diferentes diámetros de electrodo y valores de z entre sí.

Para resolver estos problemas, es efectivo determinar los diámetros de los electrodos y los intervalos de z que pueden proporcionar efectos muy ventajosos de la presente invención para todas las muestras que tienen varios diámetros en un intervalo razonable y medir varias muestras mediante un dispositivo de medición electroquímica que tiene la misma configuración usando los diámetros de electrodo e intervalos de z determinados.

Por lo tanto, en la presente invención, para muestras de agregados celulares, de las que se dice que reproducen con mayor precisión bioactividades en cuerpos biológicos, diámetros de electrodos y un intervalo de z con el que se puede lograr el efecto de mejorar la sensibilidad, el rendimiento cuantitativo relativo y la reproducibilidad incluso cuando sus diámetros varían en un intervalo comúnmente usado entre 100 - 600 μm . El procedimiento se describirá a continuación.

Primero, se investigó cómo el valor límite inferior $Z_{\min}$ y el valor límite superior $z_{\max}$ de un intervalo de cambios de z efectivos con diámetros d_{sp} de muestra cuando el diámetro d_{el} del electrodo fue de 20 μm . La Figura 2 ilustra el resultado de la simulación. Cuando z está entre $z_{\min}$, inclusive y $z_{\max}$, inclusive, mostrada en la Figura 2 para cada d_{sp} con d_{el} de 20 μm , se puede proporcionar el efecto de que el valor I de corriente se convierta en el 90% o más del valor de corriente de pico. (Z_{opt} es la distancia z óptima que produce el valor de corriente de pico). Además, se puede proporcionar el efecto de que el valor I de corriente se convierta en el 90 % o más del valor de corriente de pico cuando z está en el intervalo entre el límite inferior $z_{\min}^*$ y el límite superior $z_{\max}^*$ indicado por la eclosión en la Figura 2 con cualquier valor de d_{sp} entre 100 - 600 μm , donde $z_{\max}^*$ es $z_{\max}$ cuando d_{sp} es 100 μm y $z_{\min}^*$ es $z_{\min}$ cuando d_{sp} es 600 μm .

Luego, se investigó cómo $z_{\min}^*$ y $z_{\max}^*$ cambian con d_{el} . La Figura 3 ilustra el resultado de la simulación. A cualquier valor de d_{el} en el intervalo de 0 - 80 μm , se puede proporcionar un efecto muy ventajoso de la presente invención para muestras con $d_{\text{sp}} = 100 - 600 \mu\text{m}$ cuando z está entre $z_{\min}^*$, inclusive, y $z_{\max}^*$, inclusive, mostrado en la Figura 3. Al ajustar la operación utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales, el intervalo se puede expresar aproximadamente como una función de d_{el} por la ecuación (4) dada a continuación.

[Fórmula 6]

$$z = 21.8 \frac{d_{\text{el}} + 0.8}{d_{\text{el}} + 9.7} \pm 5 \quad [\mu\text{m}] \quad \dots \quad (4)$$

Por lo tanto, z puede establecerse en el intervalo expresado por la ecuación (4), donde $z > 0$.

Obsérvese que, como se puede ver en la Figura 3, la ecuación (4) dada anteriormente no se puede usar cuando el diámetro d_{el} del electrodo es de aproximadamente 80 μm o mayor. Sin embargo, en la medición electroquímica en muestras diminutas tales como células, se usan comúnmente electrodos con $d_{\text{el}} = 50 \mu\text{m}$ o menos. Esto se debe a que la relación S/N de un valor de corriente (la relación entre una corriente de Faraday generada por una reacción de oxidación-reducción de una sustancia química a detectar y una corriente de carga generada por un electrolito que no es la sustancia que se ha de detectar) aumenta significativamente en un electrodo con $d_{\text{el}} = 50 \mu\text{m}$ o menos. Por lo tanto, aunque la ecuación (4) dada arriba no se puede usar cuando el diámetro d_{el} del electrodo es de 80 μm o mayor, eso no plantea un problema.

Un intervalo de z efectivo puede variar según la velocidad v de generación de una sustancia química de una muestra y el coeficiente D de difusión de la sustancia química, además del diámetro d_{el} del electrodo y del diámetro d_{sp} de la muestra, pero sus influencias son limitadas.

Puede verse en la ecuación (1) que cuando la concentración $[S]$ de la sustancia del sustrato es lo suficientemente alta, v está virtualmente determinada por la velocidad $V_{\max}$ de reacción a una concentración de sustancia de sustrato infinita. En consecuencia, se investigó cómo cambia el intervalo de z efectivo con $V_{\max}$. La Figura 4 ilustra el resultado de una simulación del valor I de corriente a distintos $V_{\max}$ y z . El eje vertical del gráfico representa I normalizada con $V_{\max}$. Se

puede ver en la Figura 4 que la relación entre I normalizada con $V_{\max}$ y z permanecen casi sin cambios cuando $V_{\max}$ cambia y, en consecuencia, el intervalo de z efectivo casi no cambia.

De manera similar, se investigó cómo cambia el intervalo de z efectivo con D . La Figura 5 ilustra el resultado de la simulación de I a distintos D y z . Los valores de D de sustancias químicas típicas que se han de detectar utilizadas en los campos de la medicina y las ciencias de la vida, tales como PAP, complejos de hierro, complejos de rutenio y peróxido de hidrógeno, generalmente están en el intervalo de $1 - 20 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Puede verse en la figura 5 que cuando D cambia en este intervalo, la relación entre I y z permanece casi sin cambios y, por lo tanto, el intervalo de z efectivo casi no cambia.

De los resultados puede verse que la ecuación (4), que representa la relación entre z y d_{el} que debe cumplirse para proporcionar efectos muy ventajosos de la presente invención para muestras con diámetros de $100 - 600 \mu\text{m}$ también es útil para sistemas de medición que tienen distintos v y D .

Sobre la base de los resultados de simulación descritos anteriormente, en un método de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica que tiene una dimensión diametral (diámetro) de entre $100 \mu\text{m}$, inclusive, y $600 \mu\text{m}$, inclusive, en una solución usando un electrodo de trabajo con una superficie de electrodo que tiene una dimensión diametral (diámetro) d_{el} menor o igual a $80 \mu\text{m}$ que suministra y recibe electrones hacia y desde la sustancia química para provocar la reacción de oxidación-reducción, un separador que tiene una superficie de perfil en la que una distancia h_1 en la dirección perpendicular a la superficie del electrodo satisface el intervalo de z representado por la ecuación (4), impide que la muestra biológica entre en una región en el lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y permite que una sustancia disuelta en la solución que se ha de difundir sea colocada en la solución y la muestra biológica se sitúa a lo largo de la superficie del perfil del separador.

La figura 6 ilustra un ejemplo en el que el separador 10 está formado por un grupo de objetos estructurales 11 de pilar y un grupo de los objetos estructurales 11 de pilar que tienen alturas uniformes se extiende sobre un sustrato 20, sobre el que se forma un electrodo 21 de trabajo, en la dirección perpendicular a una superficie 21a de electrodo del electrodo 21 de trabajo y a intervalos de menos de $100 \mu\text{m}$. En la Figura 6, la línea discontinua indica la superficie del perfil a la distancia h_1 en la dirección perpendicular. El número 30 de referencia indica una muestra biológica.

Colocando la muestra biológica 30 por encima del electrodo 21 de trabajo 21 mediante una operación de pipeteado bajo el microscopio o usando una guía de tal manera que la distancia horizontal entre el electrodo 21 de trabajo y la muestra biológica 30 (la distancia en la dirección paralela a la superficie 21a del electrodo) es 0, la distancia vertical z entre el electrodo 21 de trabajo y el extremo inferior de la muestra biológica 30 puede ser controlada para que esté dentro del intervalo expresado por la ecuación (4) sin realizar ninguna otra operación especial. Como resultado, se forma una trayectoria de difusión a través de la cual se suministra la sustancia disuelta en la solución entre la muestra biológica 30 y el electrodo 21 de trabajo. Por lo tanto, la cantidad de sustancia química que se ha de detectar generada a partir de la muestra biológica 30 aumenta. Además, dado que aumenta el volumen del espacio entre la muestra biológica 30 y el electrodo 21 de trabajo, aumenta la cantidad de parte de la sustancia química generada que permanece en este espacio. Los dos efectos contribuyen a aumentar la cantidad de sustancia química que llega al electrodo 21 de trabajo.

Por otro lado, la cantidad de sustancia química que se dispersa sin llegar al electrodo 21 de trabajo puede aumentar debido a que el separador 10 aumenta la distancia de difusión entre la muestra biológica 30 y el electrodo 21 de trabajo. Sin embargo, dado que la distancia h_1 es controlada por el separador 10 para que esté situada dentro de un intervalo apropiado, los dos efectos descritos anteriormente dominan y, como resultado, la cantidad de sustancia química que llega al electrodo 21 de trabajo puede aumentar.

Si bien los efectos ventajosos del uso del separador que tiene una altura uniforme en un plano se han descrito anteriormente, la altura de un separador no necesita ser uniforme en toda la región sobre el plano en el que está colocada la superficie del electrodo y un separador puede tener una región más alta y una región más baja o puede tener una región en la que la altura cambia gradualmente.

Por ejemplo, un separador puede tener una estructura de cono invertido en la que una parte del separador situada en el centro de la superficie del electrodo es la más baja y en la que una altura del separador resulta más alta a medida que se aleja del centro de la superficie del electrodo en una dirección circunferencial exterior. Al introducir una muestra biológica tal como células, que tiene una gravedad específica más alta que la solución, en el electrodo de trabajo equipado con el separador usando una pipeta o similar, la muestra biológica puede hundirse por su propio peso hasta la posición más baja del separador, es decir, el centro de la superficie del electrodo sin utilizar ningún mecanismo. De esta forma, no solo se puede controlar la distancia vertical sino también la distancia horizontal con respecto a la relación posicional de la muestra biológica con la superficie del electrodo.

Además, al establecer adecuadamente la relación entre la distancia horizontal m desde un punto en el plano, en el que se encuentra la superficie del electrodo, hasta el centro de la superficie del electrodo (la distancia en una dirección

paralela a la superficie del electrodo) y la altura del separador en el punto, z se puede controlar para que caiga dentro de un intervalo de z efectivo determinado en la simulación descrita anteriormente, independientemente del diámetro d_{sp} de la muestra siempre que el valor del diámetro de la muestra esté en el intervalo de 100 - 600 μm .

La figura 7 ilustra un ejemplo de un separador 40 que tiene tal estructura en forma de cono invertido. En la figura 7, el separador 40 que tiene la estructura en forma de cono invertido está formado por un grupo de objetos estructurales 41 de pilar con alturas que varían gradualmente. Un grupo de los objetos estructurales 41 de pilar se extiende sobre un sustrato 20 sobre el que está formado un electrodo 21 de trabajo en la dirección perpendicular a una superficie 21a de electrodo del electrodo 21 de trabajo y permanece a intervalos de menos de 100 μm .

Dos muestras biológicas 30 con dos valores diferentes de diámetro d_{sp} se ilustran en la Figura 7. Varios valores en el intervalo de 100 - 600 μm dados anteriormente se seleccionan como los valores de d_{sp} según sea apropiado y una curva que circunscribe un contorno de todas las muestras biológicas cada una de las cuales se coloca a la altura igual a la mediana de z expresada por la ecuación (4) que corresponde a cada uno de los valores de d_{sp} , es decir, h_2 indicada por la línea discontinua en la Figura 7, se ajusta, lo que produce aproximadamente la siguiente mediana expresada por la ecuación (5) dada a continuación.

$$h_2 = \sqrt[3]{\{(1.05 d_{el} + 6.89)m\}} - 0.48 d_{el} - 2.38 \pm 5 [\mu\text{m}] \dots (5)$$

Específicamente, un separador que tiene una superficie de perfil que tiene forma de cono invertido en el que una distancia h_2 en la dirección vertical a la superficie del electrodo satisface la ecuación (5) en respuesta a la distancia m en la dirección paralela a la superficie del electrodo desde el centro de la superficie del electrodo del electrodo de trabajo, impide que las muestras biológicas entren en una región del lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil, y permite que una sustancia disuelta en una solución que se ha de difundir se pueda colocar en la solución, las muestras biológicas se pueden situar sobre el centro de la superficie del electrodo a lo largo de la superficie del perfil del separador y, en este estado, se puede realizar una medición electroquímica.

Cuando se colocan las muestras biológicas 30, la muestra biológica 30 se puede hundir en la parte cóncava del separador 40 en forma de cono invertido por su propio peso sin necesidad de una operación especial. En este punto, la distancia m entre el electrodo 21 de trabajo y la muestra biológica 30 en la dirección paralela a la superficie 21a del electrodo es 0. Obsérvese que dado que la posición en la que la muestra biológica 30 entra en contacto con el separador 40 varía dependiendo del diámetro d_{sp} de la muestra, la distancia z entre el electrodo 21 de trabajo y el extremo inferior de las muestras biológicas 30 varía dependiendo de d_{sp} .

Como la configuración ilustrada en la Figura 6, la configuración ilustrada en la Figura 7 permite aumentar la cantidad de una sustancia química que se ha de detectar generada a partir de la muestra biológica 30 debido a que se forma una trayectoria de difusión a través de la cual se suministra una sustancia disuelta en la solución entre la muestra biológica 30 y el electrodo 21 de trabajo. Además, dado que aumenta el volumen de espacio entre la muestra biológica 30 y el electrodo 21 de trabajo, aumenta la cantidad de parte de la sustancia química generada que permanece en este espacio. Los dos efectos contribuyen a aumentar la cantidad de sustancia química que llega al electrodo 21 de trabajo.

Por otro lado, la cantidad de sustancia química que se dispersa sin llegar al electrodo 21 de trabajo puede aumentar debido a que el separador 40 aumenta la distancia de difusión entre la muestra biológica 30 y el electrodo 21 de trabajo. Sin embargo, dado que la distancia h_2 es controlada por el separador 40 en forma de cono invertido para que esté situada en un intervalo apropiado, los dos efectos descritos anteriormente dominan y, como resultado, la cantidad de sustancia química que llega al electrodo 21 de trabajo puede aumentar.

Mientras que los separadores descritos anteriormente están formados por objetos estructurales de pilares, los separadores no están tan limitados. Por ejemplo, un objeto estructural poroso que tenga numerosos orificios con diámetros inferiores a 100 μm puede usarse como separador.

- Ejemplos específicos de configuraciones como se ha descrito.

Se espera que los efectos ventajosos descritos anteriormente se logren con cualesquiera configuraciones de una muestra biológica, un mecanismo por el cual se genera o consume una sustancia química que se ha de detectar en una muestra biológica, o un electrodo de trabajo y una placa de sustancia en la que están formados los electrodos de trabajo, siempre que se satisfaga la condición de que una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica sea electroquímicamente activa o se transforme en otra sustancia química electroquímicamente activa.

<Muestras biológicas>

Si bien se eligió un cuerpo embrioide formado a partir de células ES de ratón para la simulación, se pueden usar otras muestras, tales como agregados celulares, una sola célula, fragmentos de tejido, microorganismos o una muestra no biológica que contenga una sustancia biológicamente relevante.

<Mecanismo por el cual se genera o consume una sustancia química en una muestra biológica>

Si bien se eligió un mecanismo de generación que usa una reacción de la enzima ALP en una muestra para la simulación, puede usarse generación o consumo mediante una reacción enzimática de otra proteína, péptido, ARN o similar o una reacción catalítica u otra reacción con una película delgada de platino o una película de óxido de titanio o similar sobre una muestra.

Cuando una muestra son células o similares, la sustancia química puede ser una sustancia generada o consumida a través de diversas vías metabólicas o vías de señalización en las células. Los ejemplos incluyen la liberación de protones en una vía metabólica en un sistema glucolítico y la liberación de dopamina de las células nerviosas.

<Electrodo de trabajo>

Si bien no se ha especificado ningún material específico del electrodo de trabajo en la simulación, el electrodo de trabajo puede estar hecho de cualquier material que pueda usarse como electrodo de trabajo para la medición electroquímica, tal como un metal noble como el oro o el platino, un material inorgánico compuesto predominantemente de carbono tal como grafito, diamante dopado con una impureza o nanotubos de carbono, o un polímero conductor tal como polipirrol, polianilina o politiofeno.

La forma de la superficie del electrodo del electrodo de trabajo no se limita a un círculo y puede tener una forma tal como una elipse o un polígono. En el caso de un electrodo de trabajo que tenga una superficie de electrodo no circular, la dimensión del diámetro d_{el} especificado en la presente invención es el promedio de las longitudes desde el centro de la forma hasta todo el borde de la forma.

<Sustrato de formación de electrodo de trabajo>

Si bien no se especificó ningún material específico del sustrato de formación del electrodo de trabajo en la simulación, se puede usar cualquier material que pueda usarse como material de un soporte de electrodo de trabajo para la medición electroquímica, tal como cuarzo, vidrio, silicio u otros materiales cerámicos.

- Ejemplos de un método para fabricar un separador

El separador debe fabricarse mediante un método que pueda controlar la altura a nivel de micrómetros para lograr efectos elevados de la presente invención. Además, el separador debe permitir que una solución pase a su través, es decir, debe permitir que una sustancia disuelta en una solución se difunda y también debe ser un aislante eléctrico si el separador se fabrica en un electrodo de forma contigua. Siempre que se cumplan estas condiciones, el separador puede lograr los efectos previstos independientemente del método de fabricación y del material del separador. A continuación, se proporcionan ejemplos de métodos de fabricación de separadores y materiales que pueden ser preferibles.

<Fabricación de un separador formado por objetos estructurales de pilar mediante deposición de película → patrón de capa protectora → grabado>

- 1) Depositar una película de nitruro de silicio de grosor controlado y uniforme sobre un sustrato por CVD
- 2) Crear un patrón de una capa protectora de grabado en la película de nitruro de silicio mediante fotolitografía
- 3) Grabar la película de nitruro de silicio en regiones no cubiertas con la capa protectora mediante grabado con iones reactivos para formar objetos estructurales de pilar
- 4) Retirar la capa protectora

El material de la película aislante (el material de los objetos estructurales del pilar) puede ser óxido de silicio, óxido de titanio, así como nitruro de silicio.

El método de deposición de película puede ser un método de deposición al vacío tal como pulverización catódica o deposición de vapor o vidrio por centrifugación, así como CVD.

El método de creación de patrones puede ser un método como la serigrafía o la impresión por chorro de tinta, así como la fotolitografía.

El método de grabado puede ser grabado con plasma, grabado por pulverización catódica, grabado con haz de iones o grabado en húmedo, así como grabado con iones reactivos.

<Fabricación de un separador formado por un grupo de objetos estructurales de pilar mediante creación de patrones de objetos estructurales utilizando resina fotosensible>

- 1) Recubrir un LSI que tenga un elemento de detección de corriente con resina fotosensible mediante recubrimiento por centrifugación
- 2) Fabricar objetos estructurales de pilar mediante fotolitografía.

La resina fotosensible puede ser cualquier resina aislante y fotosensible que se use en fotolitografía común y se debe elegir la resina fotosensible que se requiere para lograr la resolución requerida. Para proporcionar estabilidad química a los objetos estructurales del pilar, puede ser preferible una resina fotosensible epoxi químicamente amplificada utilizada como resistencia negativa permanente.

El método de recubrimiento puede ser cualquier método que pueda controlar el grosor de la película del orden de micrómetros. Puede ser preferible el recubrimiento por centrifugación y el recubrimiento por pulverización debido a la capacidad de control del grosor de la película, pero se pueden utilizar recubrimientos tales como el recubrimiento por inmersión, el recubrimiento por serigrafía o el recubrimiento por rodillo.

<Fabricación de un separador formado por un objeto estructural poroso mediante recubrimiento de gel>

- 1) Preparar y calentar una solución diluida en agua de agarosa a 80°C o más para cambiarla a sol.
- 2) Dejar caer la solución en agua de agarosa sobre un sustrato calentado a 80°C y formar una película delgada mediante recubrimiento por centrifugación. Mantener la temperatura del sustrato constantemente a 80°C.
- 3) Dejar que el sustrato se enfríe naturalmente a temperatura ambiente para adquirir un separador poroso hecho de gel de agarosa.

El sol que se deja caer sobre el sustrato puede ser cualquier sol que cambie a un gel poroso después del recubrimiento por centrifugación y se debe elegir la temperatura de calentamiento que sea apropiada para el tipo de sol. Se prefieren sustancias tales como la agarosa, el alcohol polivinílico y la celulosa debido a su facilidad de preparación y biocompatibilidad.

El método de recubrimiento puede ser cualquier método que tenga un mecanismo que pueda controlar el grosor de la película en el orden de micrómetros y mantenga constante la temperatura del sol durante la operación de recubrimiento. El recubrimiento por centrifugación y el recubrimiento por pulverización pueden ser preferibles debido a la capacidad de control del grosor de la película, pero se pueden utilizar recubrimiento por inmersión, recubrimiento por serigrafía, recubrimiento por rodillo o similares.

<Otras condiciones>

Un separador formado por objetos estructurales de pilar puede fabricarse mediante otros métodos, tales como nanoimpresión, moldeo tal como moldeo integrado, impresión tal como serigrafía e impresión por chorro de tinta, o mecanizado. Se puede adquirir un separador hecho de un objeto estructural poroso colocando un material poroso preformado tal como sílice porosa o membrana de nitrocelulosa sobre un sustrato.

- Especificaciones para un separador formado por objetos estructurales de pilar.

Las separaciones y la forma de un grupo de objetos estructurales de pilar utilizados como separadores deben determinarse de la siguiente manera.

<Separaciones>

Si bien las separaciones son inferiores a 100 µm, cuanto más amplias sean las separaciones entre los objetos estructurales del pilar, mejor, en términos de minimizar la inhibición de la difusión de una sustancia disuelta alrededor de una muestra biológica por parte de los objetos estructurales de pilar para lograr una mayor sensibilidad.

Las separaciones entre los objetos estructurales de pilar no necesitan ser uniformes y puede haber una región en la que los objetos estructurales del pilar estén densamente ubicados y una región en la que los objetos estructurales del pilar estén ubicados de manera separada o una región en la que no se encuentre ningún objeto estructural del pilar.

Por ejemplo, una estructura en la que no haya formado un objeto estructural de pilar en una región inmediatamente por encima de la superficie del electrodo y, por lo tanto, una muestra biológica esté retenida solo por objetos estructurales de pilar alrededor de la superficie del electrodo puede impedir eficazmente la inhibición de la difusión de una sustancia disuelta inmediatamente debajo de la superficie de la muestra biológica y puede lograr una mayor sensibilidad.

<Diámetro>

No hay restricciones en el diámetro de los objetos estructurales del pilar siempre que se pueda proporcionar la resistencia que puede mantener una muestra biológica separada de la superficie de un electrodo. Sin embargo, cuanto menor sea el diámetro de los objetos estructurales de pilar, mejor, para minimizar la inhibición de la difusión de una sustancia disuelta alrededor de la muestra por parte de los objetos estructurales del pilar para lograr una mayor sensibilidad.

<Forma de la superficie superior>

No hay restricciones sobre la forma de la superficie superior de un objeto estructural de pilar. Los efectos ventajosos de la presente invención se pueden lograr independientemente de si la superficie superior tiene una forma circular, triangular, rectangular o poligonal.

5 Un objeto estructural de pilar no necesita ser una estructura de pilar cuyas superficies superior e inferior tengan formas y áreas idénticas. Por ejemplo, el área de la superficie superior puede reducirse intencionadamente o la parte superior puede ser puntiaguda, por ejemplo, cambiando las condiciones de grabado de una capa aislante durante la fabricación.

10 Si una muestra biológica son células, un fragmento de tejido o similar, el área de contacto y la adhesividad entre la muestra biológica y los objetos estructurales del pilar pueden reducirse haciendo puntiagudos los objetos estructurales de pilar. Este efecto es útil para reducir la fuerza requerida para arrancar la muestra biológica durante la extracción de la muestra biológica después de la medición en la muestra biológica y, en consecuencia, reducir el daño a la muestra biológica.

15 Una configuración específica de un transductor como se ha descrito utilizado para la medición electroquímica de una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica se describirá con referencia a las Figuras 8A, 8B y 9.

20 El transductor tiene una configuración en la que un depósito 50 de solución electrolítica que puede contener una solución 51 y una muestra biológica sumergida en la solución 51 está montado en un chip LSI 60. Se forma un orificio 52 en el centro del depósito 50 de solución electrolítica y se dispone el chip LSI 60 en el extremo inferior del orificio 52 de tal manera que el chip LSI 60 cubra el orificio 52.

25 El chip LSI 60 y el depósito 50 de solución electrolítica se montan y fijan sobre un sustrato 70 y se forma un patrón 71 de muchos conductores para la conexión con un dispositivo externo que controla el transductor sobre el sustrato 70. El número 80 de referencia en la Figura 8B indica cables de unión que interconectan el chip LSI 60 y el patrón 71 de conductores.

30 Se forma una región detectora 61 en la superficie superior del chip LSI 60. En la Figura 8A, la región detectora 61 se indica mediante sombreado y se define en la posición del orificio 52 en la superficie inferior del depósito 50 de solución electrolítica. Aunque se omiten los detalles de la figura, los electrodos (electrodos de trabajo) se forman en la región detectora 61 y los separadores hechos de objetos estructurales de pilar como se ha descrito anteriormente se fabrican encima de los electrodos de trabajo. El chip LSI 60 incluye funciones tales como la función de aplicar una tensión a los electrodos de trabajo, la función de detectar una reacción en el electrodo de trabajo tal como un valor de corriente, y la función de amplificar el valor de corriente.

35 Obsérvese que un grupo de objetos estructurales de pilar que forman un separador puede tener alturas uniformes o puede tener una superficie de perfil con forma de cono invertido. Además, un separador puede estar formado por una estructura porosa en lugar de objetos estructurales de pilar.

40

REIVINDICACIONES

1. Un método de medición electroquímica para medir electroquímicamente una sustancia química generada o consumida en una muestra biológica en una solución, en el que la muestra biológica, que tiene una dimensión de diámetro de entre 100 μm , inclusive, y 600 μm , inclusive, comprende células, agregados de células, fragmentos de tejido, o muestras no biológicas que contengan sustancias biológicamente relevantes, siempre que la muestra biológica excluya los embriones humanos, comprendiendo el método:
- 10 realizar una simulación, en la que la condición dada incluye una dimensión de la superficie del electrodo de un electrodo de trabajo que suministra o recibe electrones hacia o desde la sustancia química para provocar una reacción de oxidación-reducción y la dimensión de la muestra biológica, y en la que un valor de una corriente que fluye a través del electrodo de trabajo se calcula en función de la distancia entre la muestra biológica y la superficie del electrodo en una dirección vertical perpendicular a la superficie del electrodo, sobre la base de la velocidad de una reacción química en la que la sustancia química es generada o consumida en la muestra biológica, un cambio en la distribución de la concentración de la sustancia química en la solución, y la velocidad a la que se suministran o reciben electrones hacia o desde la sustancia química en la superficie del electrodo, asumiendo que la sustancia química que se difunde en la solución al electrodo de trabajo provoca la reacción de oxidación-reducción en el electrodo de trabajo y es detectada como el valor de la corriente, para obtener un intervalo de la distancia en la dirección vertical que incluye un punto en el que la corriente toma un valor máximo, teniendo la curva del valor de la corriente forma de arco con un pico en el punto, definiéndose el intervalo de tal modo que el valor de la corriente dentro del intervalo sea mayor o igual al 90% del valor máximo; y
- 20 realizar la medición colocando la muestra biológica en la solución a una distancia de medición alejada de la superficie del electrodo en dirección vertical usando un separador que impide que la muestra biológica entre en una región en el lado de la superficie del electrodo de la superficie del perfil y que permite que la sustancia química se difunda hacia el electrodo de trabajo, estando la distancia de medición situada dentro del intervalo.
- 25

FIG. 1

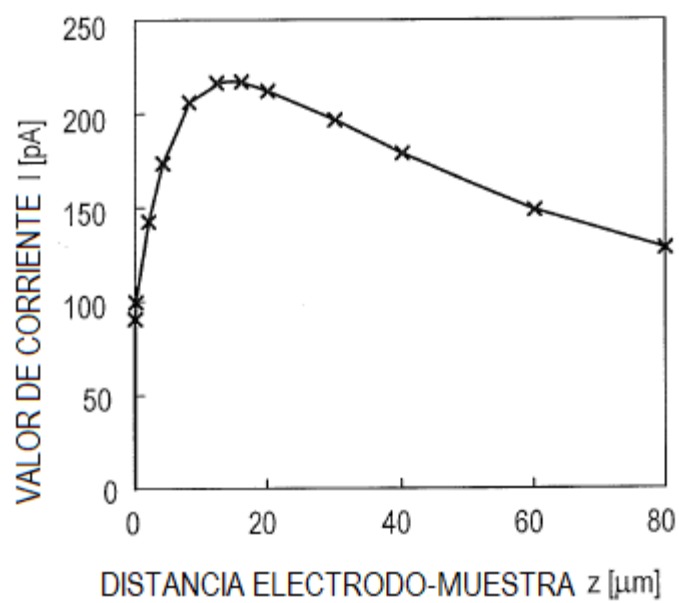


FIG. 2

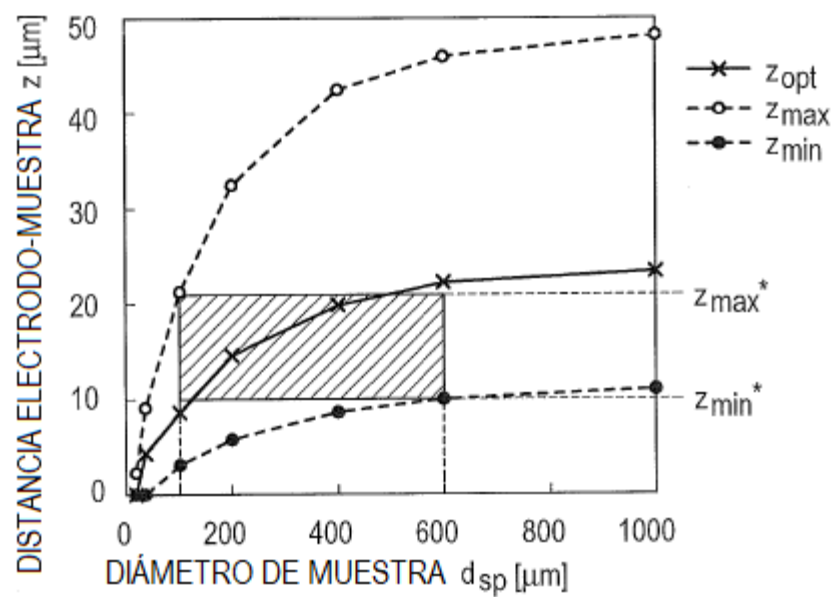


FIG. 3

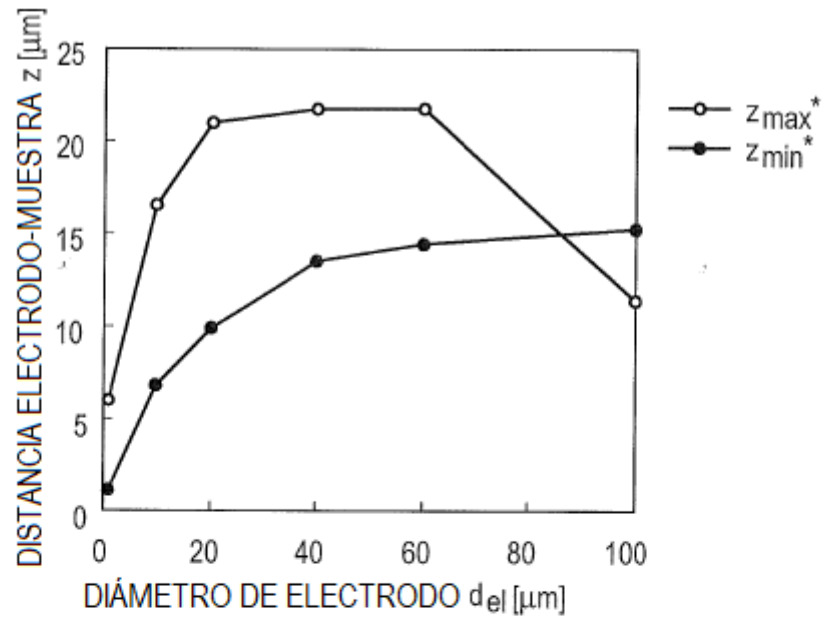


FIG. 4

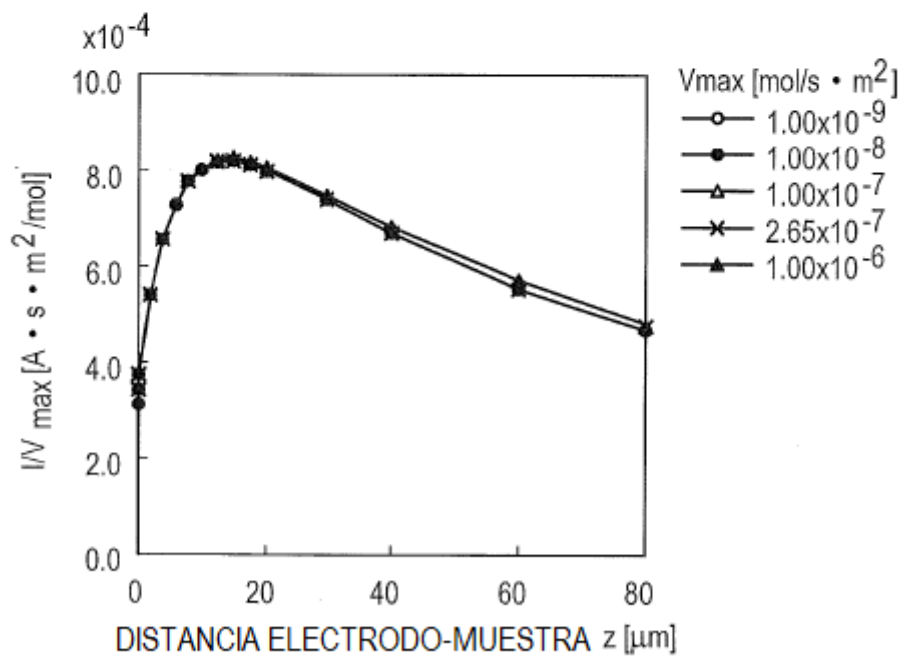


FIG. 5

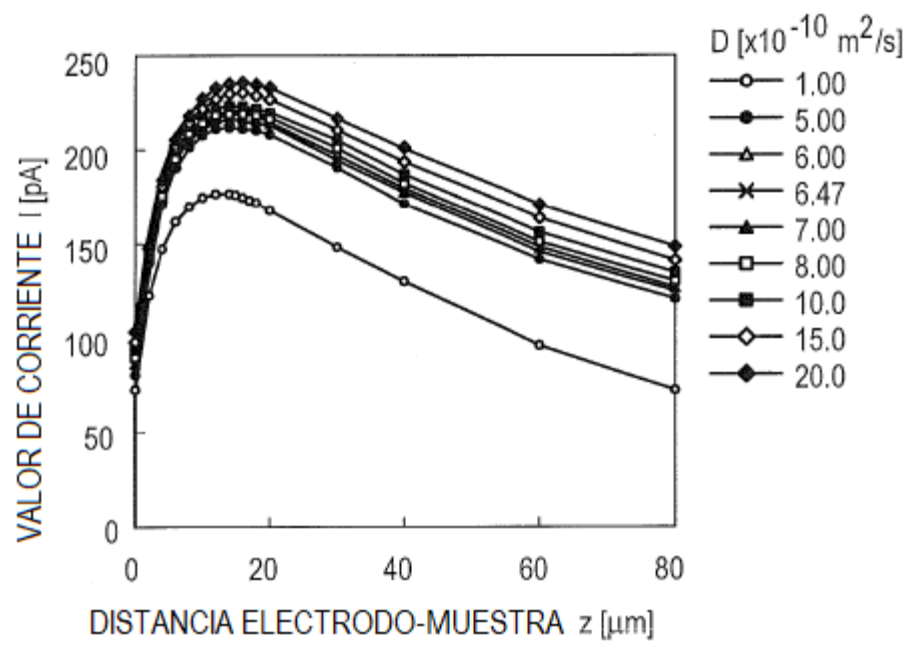


FIG. 6

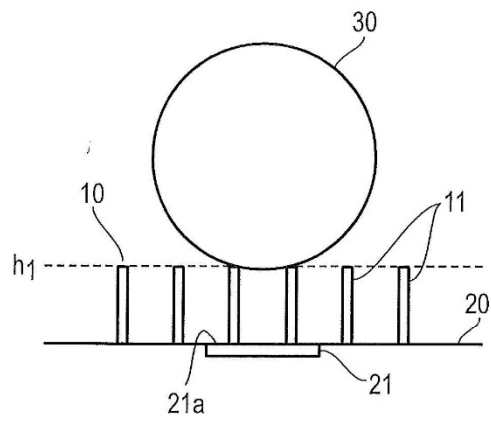


FIG. 7

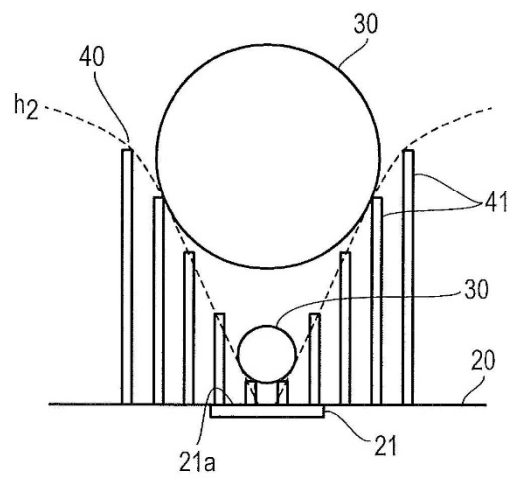


FIG. 8A

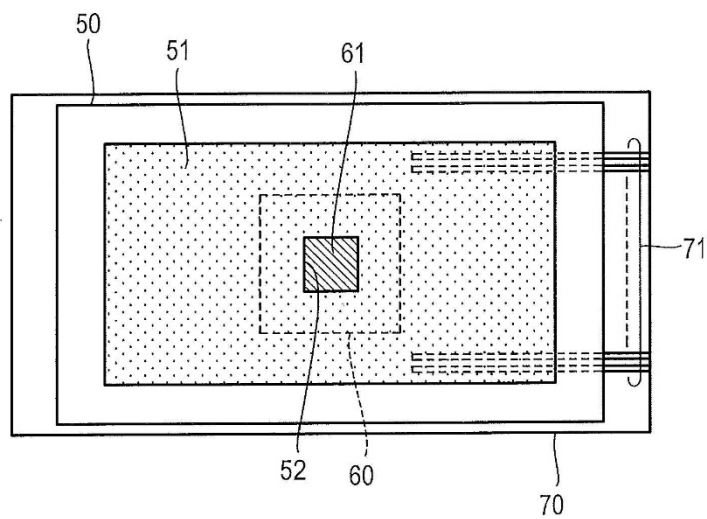


FIG. 8B

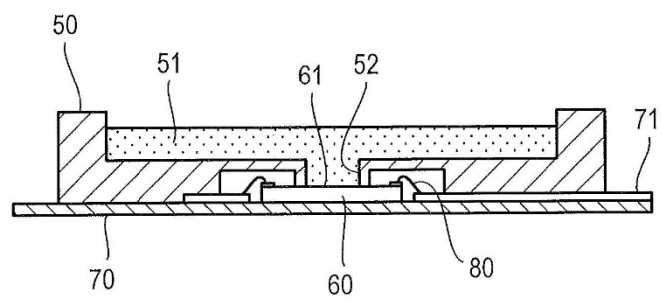


FIG. 9

