



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 304 971**

(51) Int. Cl.:

**G01N 21/69** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00953206 .0**

(86) Fecha de presentación : **16.08.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1204858**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **15.05.2002**

(54) Título: **Método para mediciones de electroluminiscencia.**

(30) Prioridad: **17.08.1999 US 376139**

(73) Titular/es: **Orion Diagnostica Oy  
Koivu-Mankkaan tie 6 B  
02200 Espoo, FI**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

(72) Inventor/es: **Ala-Kleme, Timo;  
Haapakka, Keijo;  
Juhala, Pentti;  
Kankare, Jouko;  
Kulmala, Sakari;  
Käppi, Rainer;  
Loikas, Kari;  
Nauma, Mauri;  
Pihlaja, Jyrki;  
Sutela, Timo y  
Valli, Raili**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 para mediciones de electroluminiscencia.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para determinar la concentración de un compuesto emisor de luz mediante luminiscencia y, más particularmente, a un método para determinar la concentración de un compuesto emisor de luz mediante quimioluminiscencia electrogenerada.

10 **Antecedentes de la invención**

Existe una necesidad en aumento de métodos específicos, sensibles, rápidos y rentables para detectar y cuantificar sustancias químicas, biológicas y bioquímicas tales como anticuerpos, hormonas, virus, enzimas, metabolitos, 15 narcóticos, venenos, fármacos, microorganismos y ácidos nucleicos. La sensibilidad y especificidad requeridas se obtienen usando reacciones de unión, por ejemplo, reacciones antígeno-anticuerpo en las que la presencia del complejo de valor diagnóstico, es decir, el analito, se indica por medio de un marcador detectable unido a uno o más de los materiales complejantes. Un ejemplo de compuestos marcados comercialmente útiles son aquellos capaces de generar 20 una luminiscencia basada en los métodos de excitación fotoquímicos, químicos o electroquímicos.

20 Los métodos analíticos basados en la luminiscencia en sus diversas modificaciones generalmente se conocen por su sensibilidad, pero todos tienen sus propios defectos a muy bajas concentraciones de las especies emisoras. La sensibilidad de la fluorescencia está limitada por los fenómenos de dispersión de Raleigh y de Raman así como por las impurezas fluorescentes que aumentan la emisión de fondo no específica. La fosforescencia está principalmente 25 restringida al estado sólido y la emisión de aquellos pocos compuestos que presentan fosforescencia en disolución a temperatura ambiente generalmente es extremadamente sensible al oxígeno, lo que dificulta su aplicación práctica. Los métodos basados en fluorescencia y fosforescencia convencionales usan excitación mediante luz y necesitan una fuente de luz y componentes ópticos apropiados. Los métodos basados en la quimioluminiscencia no necesitan componentes 30 ópticos de excitación y la instrumentación generalmente es muy simple. Sin embargo, los métodos quimioluminiscentes a menudo están sujetos a graves interferencias químicas. El método basado en una excitación electroquímica instrumentalmente simple (es decir, quimioluminiscencia electrogenerada o ECL) utiliza una excitación mediante un pulso eléctrico aplicado a un electrodo, lo que proporciona un bajo límite de detección.

35 Es bien conocido en la técnica el ECL de compuestos orgánicos e inorgánicos en disoluciones de electrolitos. Por ejemplo, se ha estudiado el ECL anódico del luminol en el electrodo de platino en un electrolito acuoso desde 1929 (por ejemplo, N. Harvey, *J. Phys. Chem.* 33 (1929) 1456; K. Haapakka y J. Kankare, *Anal. Chim. Acta* 138 (1982) 263), se ha descrito un ECL anódico de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  en presencia de oxalato en un electrolito acuoso y un ECL catódico de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  en presencia de peroxidisulfato en una mezcla acetonitrilo/agua por Bard *et al.* (D. Ege, W. Becker y A. Bard, *Anal. Chem.* 56 (1984) 2413), se ha descrito un ECL catódico de numerosos iones inorgánicos (K. Haapakka, 40 J. Kankare y S. Kulmala, *Anal. Chim. Acta* 171 (1985) 259) y de numerosos compuestos orgánicos (K. Haapakka, J. Kankare y O. Puhakka, *Anal. Chim. Acta* 207 (1988) 195) en un electrodo de aluminio recubierto de óxido en electrolitos acuosos que contenían un agente oxidante apropiado, en el que el ECL de vida corta se media durante el pulso eléctrico aplicado a los electrodos. Distintos complejos de terbio (III) son capaces de iniciar un ECL catódico 45 específico de terbio (III) de vida larga en un electrodo de aluminio recubierto de óxido en un electrolito acuoso que contiene peroxidisulfato, lo que hace posible eliminar el ECL de fondo de vida corta usando una detección ECL resuelta en el tiempo, creando de ese modo las bases para el análisis extremo de trazas (J. Kankare, K. Fäldén, S. Kulmala y K. Haapakka, *Anal. Chim. Acta* 256 (1992) 17; J. Kankare, A. Karppi y H. Takalo, *Anal. Chim. Acta* 295 (1994) 27). Se han propuesto ensayos de unión de los analitos de interés basados en la medida de ECL en la superficie 50 del electrodo: por ejemplo, A. Bard *et al.* (D. Ege, W. Becker y A. Bard, *Anal. Chem.* 56 (1984) 2413 y WO 86/02734) han sugerido marcadores ECL que contenían rutenio (III) y osmio (III); J. Kankare y K. Haapakka (GB 2.217.007 B, US 5.308.754), J. Kankare, K. Haapakka, S. Kulmala, V. Näntö, J. Eskola y H. Takalo, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 205 y M. Billadeau *et al.* (WO 96/41177) han sugerido el uso de marcadores de ECL que contenían  $\text{Ln}(\text{III})$  ( $\text{Ln}(\text{III}) = \text{Dy}(\text{III}), \text{Eu}(\text{III}), \text{Sm}(\text{III}), \text{Tb}(\text{III})$ ) en los ensayos de unión basados en el ECL resuelto en el tiempo. Se han propuesto numerosas 55 configuraciones de celdas de muestras y métodos de medida para la detección ECL en los que el ECL se genera en la superficie del electrodo (por ejemplo en EP 65 8760 A1 y WO 96/28538) o en la superficie de partículas magnéticas reunidas sobre la superficie del electrodo (por ejemplo en WO 92/14139; WO 92/14138, JP 08.190.801 A2 y WO 96/15440). Los detectores ECL se han aplicado en cromatografía líquida de alta presión (por ejemplo, D. Skatty, W. Lee y T. Nieman, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1530) y en electroforesis capilar (por ejemplo, G. Forbes, T. Nieman y J. Sweedler, *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 289).

60 Jones (EP 962 773) ha estudiado reacciones ECL conocidas en electrodos bipolares. En dicha publicación la reacción electroquímica tiene lugar en partículas conductoras de carbón muy pequeñas, por lo cual se requieren altos gradientes de voltaje, que son poco realistas en la práctica, para obtener una caída de voltaje suficiente a través de las partículas conductoras de carbón. Jones no describe conductores combinados de materiales electroquímicamente inertes y metales o semi-metales aislados o sus mezclas, lo cual proporciona uno de los aspectos peculiares de la presente invención, contribuyendo a posibilitar el análisis multi-componente y la estandarización interna, como se muestra más adelante. En el análisis multicomponente, que es una de las realizaciones preferidas de la presente invención, también se necesita un tampón especial para cada marcador y para cada material conductor, como se muestra más adelante.

Típicamente para ECL, el compuesto luminiscente debe estar en la estrecha proximidad de la superficie del electrodo. Especialmente en los inmunoensayos ECL, el marcador ECL, que contiene al compuesto luminiscente unido a anticuerpo o al antígeno, está ligado a la superficie del electrodo, por ejemplo, mediante inmunoreacción directa en la que uno de los inmunoreactivos se inmoviliza sobre la superficie del electrodo (J. Kankare y K. Haapakka, GB

- 5 2.217.007 B, US 5.308.754), o indirectamente utilizando partículas magnéticas no conductoras recubiertas con inmunoreactivos, las cuales después de que la inmunoreacción ha tenido lugar se recogen en la superficie del electrodo mediante un campo magnético. La ventaja de usar estas partículas magnéticas es una reacción de unión considerablemente más eficaz comparada con, por ejemplo, aquella en la superficie del electrodo plano recubierto con anticuerpos. Sin embargo, el uso de partículas magnéticas en ensayos ECL no deja de tener desventajas: (i) la eficacia de la excitación a menudo es baja debido a que se requiere una distancia de excitación de aproximadamente 25 Å o menos desde la superficie del electrodo (véase, por ejemplo, WO 92/14139): (ii) la eficacia de detección de la luz emitida desde la proximidad de la superficie del electrodo está impedida por la capa de partículas que apantan la luz y (iii) las partículas magnéticas separadas de la superficie del electrodo durante el pulso corto de excitación inhiben de ese modo la eficacia de la excitación.

- 10 15 Aunque las partículas magnéticas proporcionan una mejora sobre los métodos ECL convencionales, existe todavía una necesidad en la técnica de ensayos ECL que exhiban sensibilidad aun mayor y permitan el análisis multicomponente y/o la estandarización interna. Por consiguiente, es un propósito de la presente invención proporcionar un método ECL que tenga más sensibilidad y, ventajosamente, la capacidad de determinar la concentración de múltiples analitos de interés.

### Compendio de la invención

- 20 25 La presente invención proporciona un método para medir la concentración de un compuesto luminiscente con sensibilidad mejorada. El método incluye proporcionar un electrolito que tenga sumergido en él un par de electrodos que suministren corriente con un material eléctricamente conductor colocado entre los electrodos, pero no en contacto electrónico con los electrodos, y un compuesto luminiscente. Se aplica después una corriente eléctrica a los electrodos para inducir al compuesto luminiscente en contacto electrónico con el material eléctricamente conductor a exhibir luminiscencia. La luminiscencia (es decir, la luz emitida) se mide para determinar la concentración del compuesto luminiscente.

- 30 35 Ejemplos de materiales eléctricamente conductores incluyen, pero no se limitan a, materiales electroquímicamente inertes y metales, aleaciones o semi-metales aislados o sus combinaciones. Materiales electroquímicamente inertes representativos son carbón vitreo, oro, platino, y sus mezclas. Metales o semi-metales aislados representativos son aluminio, hafnio, magnesio, silicio, tántalo, titanio, circonio, o sus mezclas. Preferiblemente el material aislante es un revestimiento de óxido o polímero. En una realización, el material eléctricamente conductor es una membrana porosa recubierta con una capa fina de material electroquímicamente inerte o de metal o semi-metal aislado.

- 40 45 El electrolito es un electrolito no acuoso o acuoso. El compuesto luminiscente se fija a la superficie del material eléctricamente conductor o alternativamente se une a un analito de interés (por ejemplo, un ácido nucleico o secuencia de amino ácidos). En una realización, la luminiscencia se mide después de una demora desde el final de un pulso eléctrico que se aplica a los electrodos que suministran la corriente. En otras realizaciones, se induce la luminiscencia usando al menos dos compuestos electroquimioluminiscentes diferentes, al menos dos tipos diferentes de materiales eléctricamente conductores o al menos dos analitos de interés diferentes.

- 50 55 Ventajosamente, el método de la presente invención proporciona un ensayo ECL con sensibilidad aumentada. Otras ventajas incluyen la posibilidad de determinar la concentración de múltiples analitos de interés y proporcionar la estandarización interna. Estas y otras ventajas se harán evidentes a partir de la descripción expuesta más adelante.

### Breve descripción de los dibujos

- 60 La Figura 1 es un diagrama de bloques del aparato de luminiscencia electrogenerada sin contacto con un único material eléctricamente conductor.
- 55 La Figura 2 es una representación gráfica de la luminiscencia en función de la concentración de luminol medida mediante luminiscencia electrogenerada sin contacto.

- 65 La Figura 3 es una representación gráfica de la luminiscencia en función de la concentración de Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> medida mediante luminiscencia electrogenerada sin contacto.
- La Figura 4 es una representación gráfica de la luminiscencia en función de la concentración de terbio (III) medida mediante luminiscencia retardada electrogenerada sin contacto.

- 65 La Figura 5 es una representación gráfica de la luminiscencia en función de la concentración de hormona estimulante del tiroides humana (*hTSH*) medida mediante la luminiscencia retardada electrogenerada sin contacto.

La Figura 6 es una representación gráfica de las concentraciones de Tb(III) (●) y Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (○) en una mezcla de muestras mediante luminiscencia electrogenerada sin contacto y retardada sin contacto respectivamente.

# ES 2 304 971 T3

La Figura 7 es un electroluminograma compuesto de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  que ilustra el efecto en la luminiscencia variando el diámetro de los conductores esféricos de oro: 2,0 mm (-.-); 2,5 mm (.....); 3,5 mm (----); y 6,0 mm (—).

## Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método único para medir la concentración de un compuesto luminiscente con sensibilidad aumentada. Este método como se describe adicionalmente a continuación se denomina más adelante en la presente memoria como luminiscencia electrogenerada sin contacto o COEL.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un electrolito que contiene un compuesto luminiscente que tiene sumergido en él un par de electrodos que suministran corriente. Un material eléctricamente conductor se coloca entre los electrodos que suministran corriente, pero no en contacto electrónico con los electrodos. Contacto electrónico en este contexto significa tanto contacto físico como que está a la distancia de excitación requerida para inducir la luminiscencia de un compuesto luminiscente, la cual es preferiblemente 25 Å o menos. Se genera una corriente eléctrica entre los electrodos induciendo al compuesto luminiscente en contacto electrónico con el material eléctricamente conductor a exhibir luminiscencia. Así, al contrario que en los métodos ECL anteriores, la emisión de luz se puede generar sin que el compuesto luminiscente esté en contacto electrónico con los electrodos que suministran corriente. La luminiscencia (es decir, la emisión de luz) se mide siguiendo técnicas convencionales para determinar la concentración del compuesto luminiscente.

El material eléctricamente conductor (más adelante en la presente memoria el “conductor”) es cualquier material eléctricamente conductor que no reacciona perjudicialmente con el electrolito. El conductor debería tener una conductividad igual a, preferiblemente mayor que, la conductividad del electrolito. Aunque los autores no desean verse limitados por la teoría, se cree que se genera una corriente faradaica a través del conductor provocando una caída de voltaje en el electrolito cuando se genera una corriente entre los electrodos que suministran corriente. Este método de generar una corriente faradaica también es conocido como电解池 bipolar como se expone en Eardley, D. Handley y S. Andrew, *Electrochim. Acta* 18 (1973) 839; F. Goodridge, C. King y A. Wright, *Electrochim. Acta* 22 (1977) 347; M. Fleischmann, J. Ghoroghchian y S. Pons, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 5530.

Preferiblemente, el conductor se fabrica a partir de un material eléctricamente conductor usado para electrodos en ensayos ECL. Por ejemplo, el conductor puede ser un material electroquímicamente inerte tal como carbón vítreo, oro, platino, acero inoxidable o una combinación de ellos. El conductor también puede ser un metal, aleación, semi-metal aislado o cualquiera de sus combinaciones. Ejemplos específicos de metales o semi-metales incluyen, pero no se limitan a, aluminio, hafnio, magnesio, silicio, tántalo, titanio, zirconio, o cualquiera de sus combinaciones. En este contexto, aislado significa que el metal, aleación o semi-metal se aísla (es decir, se recubre) con un revestimiento protector tal como un revestimiento de óxido o polímero. El revestimiento puede variar en el intervalo de 1 a 100 nanómetros, como con los electrodos recubiertos de óxido usados en los ensayos ECL conocidos.

Como será evidente a los expertos en la técnica, la elección del material para el conductor depende del tipo de reacción ECL usada para generar la luminiscencia. Por ejemplo, si se va a usar una reacción ECL anódica para iniciar la luminiscencia, se selecciona un material electroquímicamente inerte. Por otra parte, si se va a usar una reacción ECL catódica para iniciar la luminiscencia, se selecciona un metal, aleación o semi-metal aislado.

Los conductores de la presente invención también pueden contener componentes no conductores adicionales para alterar las propiedades físicas del conductor. Por ejemplo, el conductor puede tener un núcleo polímero para disminuir la densidad del conductor y permitir suspenderlo en el electrolito. Igualmente, el conductor puede tener un núcleo formado por un metal o aleación magnético para ayudar a la recogida del conductor. Se pueden usar metales y aleaciones magnéticas conocidas, tales como los listados en *Handbook of Chemistry and Physics*, 70th ed., CRC press, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

De acuerdo con la presente invención, el conductor puede tener cualquier forma o tamaño. Por ejemplo, el conductor puede tener una forma esférica o elíptica. Los materiales eléctricamente conductores conformados como esferas están fácilmente disponibles en fuentes comerciales tal como AbbotBall Company, localizada en Connecticut, USA. Los conductores esféricos pueden variar en el intervalo de 10  $\mu\text{m}$  a 100 mm. Asimismo, el conductor puede ser una matriz porosa que tenga sobre él el material electroquímicamente inerte, o el metal o semi-metal aislado.

Opcionalmente, el electrolito puede contener conductores de diferentes formas, tamaños y materiales eléctricamente conductores para proporcionar potenciales umbrales alternos para inducir la luminiscencia. Por ejemplo, como será evidente para los expertos en la técnica que siguen las instrucciones de la invención, los conductores formados por diferentes materiales, tales como oro y aluminio, tendrán potenciales umbrales diferentes para iniciar la luminiscencia de un compuesto luminiscente (es decir, de un resto ECL) en contacto eléctrico con el conductor. Asimismo, los conductores que tengan tamaños diferentes también exhibirán potenciales umbrales diferentes para iniciar la luminiscencia del resto ECL. Este aspecto peculiar de la invención permite que múltiples reacciones ECL se lleven a cabo en el mismo electrolito, lo que a cambio facilita la estandarización interna y el ensayo de múltiples analitos de interés.

El electrolito es cualquier electrolito usado para las reacciones ECL. De acuerdo con la presente invención el electrolito puede ser un electrolito acuoso o no acuoso. La elección del electrolito está en parte determinada por factores tales como el analito que se ha de detectar y el resto ECL que se ha de usar. Por ejemplo, si se va a determinar

## ES 2 304 971 T3

la concentración de una biomolécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína), se selecciona un electrolito acuoso tamponado. Tales parámetros se pueden determinar fácilmente por uno experto en la técnica.

- De acuerdo con la invención, el resto ECL es cualquier resto luminiscente usado para los ensayo ECL. Por consiguiente, los restos ECL son preferiblemente quelatos metálicos. Ejemplos de quelatos metálicos que se han de usar incluyen, pero no se limitan a, quelatos de metales de transición o de tierras raras tales como rutenio, terbio, osmio, renio, iridio, rodio, platino, indio, paladio, molibdeno, tecnecio, cobre, cromo, volframio, o sus combinaciones. Dos quelatos especialmente preferidos son los quelatos de rutenio y de terbio.
- 10 Los electrodos que suministran corriente se fabrican a partir de cualquiera de los materiales eléctricamente conductores usados para los electrodos en las reacciones ECL. Por consiguiente, los electrodos se pueden conformar a partir de los mismos materiales eléctricamente conductores usados para conformar los conductores como se describió anteriormente. En una realización de la invención, los electrodos y el conductor son del mismo material. En otra realización, los electrodos que suministran corriente se fabrican a partir de materiales eléctricamente conductores en los 15 que no es posible la emisión ECL para minimizar la emisión de fondo. Preferiblemente, los electrodos están separados a distancias iguales unos de otros.

Se genera una corriente eléctrica aplicando un voltaje apropiado a los electrodos que suministran corriente durante un periodo de tiempo pre-definido, lo que da lugar a un flujo parcial de corriente a través del conductor, provocando 20 que el resto ECL en contacto electrónico con el conductor exhiba luminiscencia. El voltaje requerido (es decir, el potencial umbral) para inducir la luminiscencia depende del potencial interfacial en la interfase conductor-electrolito y del porcentaje de corriente faradaica que fluye a través de la interfase. Como será evidente para los expertos en la técnica de electrolisis bipolar, el flujo de corriente a través del conductor depende de los siguientes factores: (1) la conductividad de la disolución de electrolito, (2) el material eléctricamente conductor usado para el conductor, (3) la 25 dimensión más larga del conductor orientado a lo largo de las líneas de flujo de corriente, (4) el espacio libre del paso de corriente en la disolución de electrolito alrededor del conductor, (5) el carácter del proceso de electrodo que ocurre en la interfase, y (6) la resistencia interfacial entre el conductor y la disolución. Así, variar parámetros tales como el tamaño, forma, orientación, posición o material del conductor afectará el requisito de voltaje que se ha de aplicar a los 30 electrodos que suministran corriente para inducir la luminiscencia. Estos parámetros se pueden determinar fácilmente por uno experto en la técnica siguiendo las instrucciones de la presente invención.

La intensidad de luz resultante se mide basándose en la longitud de onda y/o resuelto en el tiempo durante el periodo necesario para lograr la relación señal a ruido requerida, y se usa para la cuantificación del compuesto luminiscente. 35 El detector de luz es cualquier dispositivo detector de luz, tal como un fotomultiplicador o un fotodiodo con una fibra óptica o monocromador. Opcionalmente, el dispositivo detector de luz se puede conectar con un amplificador en el que se amplifica la señal eléctrica procedente del detector de luz. La concentración del resto ECL se determina por técnicas de análisis estándar conocidas en la técnica.

En una realización preferida, el método de la presente invención se usa para medir un analito de interés. Como 40 con otros ensayos ECL conocidos, el resto ECL se usa como un agente marcador para cuantificar la concentración de un analito de interés. El resto ECL puede estar unido como un agente marcador al analito de interés o a un reactivo que se usa para determinar la presencia del analito (por ejemplo, un antígeno o anticuerpo en inmunoensayos). Por consiguiente, el método de la presente invención es particularmente adecuado para usarlo con métodos analíticos que 45 tengan requisitos de bajos límites de detección. Ejemplos de tales métodos analíticos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión tales como inmunoensayos, ensayo de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de liberación, ensayos de retro valoración y sistemas de detección usados en cromatografía, electroforesis capilar y análisis por inyección de flujo.

Por ejemplo, el método de la presente invención se usa como un inmunoensayo para determinar la concentración 50 de un antígeno o múltiples antígenos. El antígeno se cuantifica incubando un conductor o múltiples conductores que tengan inmovilizados sobre él un anticuerpo primario con la muestra que contiene al antígeno y posteriormente con un anticuerpo secundario ligado a un resto ECL. Después de la incubación durante una cantidad de tiempo suficiente, el conductor o conductores se lavan, lo que retira los anticuerpos marcados no ligados. El conductor o conductores se colocan posteriormente en una celda entre los electrodos que suministran corriente, en los que se induce la luminiscencia 55 y se mide de acuerdo con la presente invención.

Se pueden usar diversas modificaciones del inmunoensayo anteriormente descrito. Por ejemplo, usando discriminación resuelta en tiempo o espectral se pueden detectar simultáneamente dos o más compuestos marcados. El doble marcado descrito anteriormente se puede extender a ensayos no competitivos en los que el anticuerpo secundario se marca con resto ECL diferentes para lograr la estandarización interna del ensayo. Alternativamente, se pueden usar dos o más compuestos marcados diferentes requiriendo de ese modo diferentes electrolitos para la generación de la luminiscencia. Cambiando el electrolito, se pueden cuantificar uno tras otro diferentes compuesto y analitos marcados en el mismo o diferentes conductores.

65 Asimismo, las variaciones en el tamaño o material de los conductores permite la medida simultánea de diferentes compuestos luminiscentes y determinar la concentración de diferentes analitos en una muestra. Por ejemplo, se pueden revestir dos conductores de diferentes tamaños con anticuerpos primarios diferentes. Los conductores se incuban después con una mezcla que contiene dos antígenos diferentes que se han de cuantificar y dos anticuerpos secunda-

rios marcados con el mismo resto ECL. Después de una cantidad de tiempo suficiente, los conductores se lavan para eliminar los anticuerpos secundarios no ligados. Los conductores se colocan después en una celda en la que se induce la luminiscencia aumentando gradualmente el voltaje aplicado a los electrodos que suministran corriente. Conforme aumenta el voltaje gradualmente, primero se emite luz en el conductor más grande ya que tiene un potencial umbral menor que su homólogo más pequeño. Una vez la caída de voltaje en la disolución del electrolito es suficientemente alta, entonces comienza a emitirse luz en el conductor más pequeño. Se pueden encontrar fácilmente otras modificaciones del método de la presente invención por aquellos expertos en la técnica.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran el uso de la luminiscencia electrogenerada sin contacto (COEL). La Figura 1 muestra un diagrama general del aparato que se ha de usar de acuerdo con la invención. Con referencia a la Figura 1, se proporciona una celda (10) que tiene paredes (12) de celda que incluyen al electrolito (14). El electrolito (14) tiene en él sumergidos un par de electrodos (16, 18) que suministran corriente y un conductor (20) colocado entre los electrodos, pero no en contacto electrónico con los electrodos. Conectada a los electrodos (16, 18) hay una fuente de corriente (22) que también está conectada a un dispositivo de registro (24), que a su vez está conectado a un detector de luz (26) para detectar la luz ( $h\nu$ ) emitida en el conductor.

La celda usada en los siguientes ejemplos fue una celda de poli(tetrafluoroetileno) que tenía las dimensiones: L= 16 mm, W= 7 mm, D= 9 mm. Los electrodos que suministraban corriente estaban fabricados de alambre de acero inoxidable que tenía un diámetro de 2 mm. Los electrodos estaban separados 11 mm uno de otro. La fuente de corriente era un generador casero de pulso coulostático capaz de generar pulsos cuadrados de 60 voltios (V) y 0,4 milisegundos (ms). El detector de luz era un fotomultiplicador Hamatsu, modelo N° R3550. La señal del detector se amplificó con un pre-amplificador Stanford Research, modelo N° SR455. La señal amplificada se midió con un contador de fotones Stanford Research, modelo N° SR400. El contador de fotones se conectó a un ordenador PC para controlar el sistema de medida y el almacenamiento de datos.

Aunque la corriente eléctrica es el primer factor para la caída del voltaje en los conductores y por lo tanto para la generación de la luminiscencia, debido a razones instrumentales sólo se menciona el voltaje aplicado a los electrodos que suministran corriente en los Ejemplos 1 a 6.

#### Ejemplo 1

##### *Luminiscencia electrogenerada sin contacto con luminol*

Las disoluciones de las muestras se prepararon a partir de los siguientes componentes: tampón borato  $5.0 \times 10^{-2}$  M ajustado a pH 7,8, azida sódica  $7.1 \times 10^{-2}$  M y cantidades variables de luminol (es decir, 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalacinaidona). La luminiscencia electrogenerada sin contacto (COEL) se inició en la superficie de un conductor esférico de aluminio de 6,3 mm de diámetro (conductor Al) (AbbotBall Company) como sigue: se aplicaron pulsos de excitación de 0,4 ms de duración y 60 V de amplitud con nivel cero intermitente de 10 ms a los electrodos que suministran corriente, dando lugar a una corriente de pico de aproximadamente 50 mA en la disolución de la muestra. La emisión de luz resultante (es decir, la respuesta COEL) procedente del conductor Al se detectó mediante el fotomultiplicador. La respuesta COEL integrada procedente de los 500 pulsos de excitación en función de la concentración de luminol en las disoluciones de las muestras se presentan en la Tabla 1 y la Figura 2. La respuesta COEL de fondo (es decir, la respuesta sin el conductor Al en la celda de muestra) fue aproximadamente 50 veces menor que la respuesta COEL de fondo análoga en la Tabla 1.

Tabla 1  
Respuesta COEL en función de la concentración de luminol

[Luminol] / mol l <sup>-1</sup>	COEL / au
0	7.563
$1.0 \times 10^{-11}$	7.490
$1.0 \times 10^{-10}$	15.839
$1.0 \times 10^{-9}$	58.352
$1.0 \times 10^{-8}$	363.900
$1.0 \times 10^{-7}$	2.381.000

# ES 2 304 971 T3

## Ejemplo 2

### Luminiscencia electrogenerada sin contacto con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

Las disoluciones de las muestras se prepararon a partir de los siguientes componentes: tampón dihidrógeno fosfato potásico  $1,12 \times 10^{-1}$  M e hidrógeno fosfato dipotásico  $8,80 \times 10^{-2}$  M a pH 7,2, tripropilamina  $1,0 \times 10^{-1}$  M, azida sódica  $7,1 \times 10^{-2}$  M y cantidades variables de tris(2,2'-bipiridil)ruteno (II) ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ). La luminiscencia electrogenerada sin contacto (COEL) se inició en la superficie de un conductor esférico de oro de 5,0 mm de diámetro (conductor Au) (es decir, una bola de vidrio recubierta con una capa de oro evaporado al vacío) como sigue: se aplicaron pulsos de excitación de 0,4 ms de duración y 6,0 V de amplitud con nivel cero intermitente de 10 ms a los electrodos que suministran corriente, dando lugar a una corriente de pico de aproximadamente 50 mA en dicha disolución de la muestra. La emisión de luz resultante (es decir, la respuesta COEL) procedente del conductor Au se detectó mediante el fotomultiplicador. La respuesta COEL integrada procedente de los 500 pulsos de excitación en función de la concentración de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  en la disolución de la muestra se presentan en la Tabla 2 y la Figura 3. La respuesta COEL de fondo (es decir, la respuesta sin el conductor Au en la celda de muestra) fue aproximadamente 50 veces menor que la respuesta COEL de fondo análoga en la Tabla 2.

Tabla 2

### Respuesta COEL en función de la concentración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] / \text{mol l}^{-1}$	COEL / au
0	853
$1,0 \times 10^{-8}$	11.025
$1,0 \times 10^{-7}$	131.540
$1,0 \times 10^{-6}$	942.059
$1,0 \times 10^{-5}$	6.715.220

## Ejemplo 3

### Luminiscencia electrogenerada sin contacto con terbio (III)-1

Las disoluciones de las muestras se prepararon a partir de los siguientes componentes: tampón borato  $5,0 \times 10^{-2}$  M ajustado a pH 7,8, azida sódica  $7,1 \times 10^{-2}$  M y cantidades variables de quelato Tb(III)-1 en el que 1 es 2,6-bis [N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol. Se inició COEL en la superficie de un conductor Al esférico de 6,3 mm de diámetro (AbbotBall Company) como sigue: se aplicaron pulsos de excitación de 0,4 ms de duración y 60 V de amplitud con nivel cero intermitente de 100 ms a los electrodos que suministran corriente, dando lugar a una corriente de aproximadamente 50 mA en dichas disoluciones de las muestras. La emisión de luz resultante procedente del conductor Al se detectó mediante el fotomultiplicador durante el intervalo 0,08-8,0 ms desde el final del pulso de excitación de 0,4 ms (es decir, un COEL retardado o, abreviado, una respuesta DCOEL). La respuesta DCOEL integrada procedente de los 500 pulsos de excitación en función de la concentración de terbio (III) en las disoluciones de las muestras se presentan en la Tabla 3 y la Figura 4. La respuesta DCOEL de fondo (es decir, la respuesta sin el conductor Al en la celda de muestra) fue aproximadamente 5000 veces menor que la respuesta DCOEL de fondo análoga en la Tabla 3.

Tabla 3

### Respuesta DCOEL en función de la concentración de terbio (III)-1

$[\text{Tb(III)-1}] / \text{mol l}^{-1}$	DCOEL / au
0	10.054
$1,0 \times 10^{-9}$	46.499
$1,0 \times 10^{-8}$	337.576
$1,0 \times 10^{-7}$	4.001.260

## Ejemplo 4

*Inmunoensayo de la hormona estimulante del tiroides humana (hTSH) mediante luminiscencia electrogenerada sin contacto*

5 A. *Preparación del compuesto marcado*

Se usó un complejo de terbio (III) con 4-(3-isotiocianatobenzoil)-2,6-bis [N,N-bis(carboximetil)aminometil] fenol como compuesto marcado y se sintetizó como se expone en J. Kankare *et al.*, Anal. Chim. Acta, 266: 205 (1992), que 10 se incorpora a la presente memoria como referencia.

10 B. *Marcado de anti-hTSH IgG*

15 Se dejó reaccionar durante toda la noche un exceso de 60 veces de complejo de 4-(3-isotiocianatobenzoil)-2,6-bis [N,N-bis(carboximetil)aminometil] fenol terbio (III) con *anti-hTSH IgG* (Oy Medix Biochemica Ab, Kauniainen, Finlandia) a pH 9,5. Se separó el anticuerpo marcado del exceso de complejo de terbio (III) libre en una columna 20 rellena con Sephadex G-50 (1,0 x 5,5 cm) y Sepharose 6 B (1,0 x 5,2 cm) usando un tampón de carbonato sódico 1,0 x 10<sup>-1</sup> M a pH 9,3, que contenía 9 g l<sup>-1</sup> de cloruro sódico y 0,05% de azida sódica como agente eluyente.

20 C. *Revestido de los conductores de aluminio*

25 Los conductores Al de 6,3 mm de diámetro (AbbotBall Company) se revistieron con *anti-hTSH IgG* mediante absorción física con tampón Tris-HCl 5,0 x 10<sup>-2</sup> M a pH 7,5, que contenía 9 g l<sup>-1</sup> de cloruro sódico y 0,05% de azida sódica. La mezcla de reacción se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Despues del revestido, los conductores 30 Al se lavaron con una disolución que contenía 9 g l<sup>-1</sup> de cloruro sódico 0,01% de azida sódica, 0,2 g l<sup>-1</sup> de Tween, y saturado con 0,1% de BSA (albúmina de suero bovino) durante toda la noche y se almacenaron húmedos a 4°C.

35 D. *Inmunoensayo de hTSH*

30 Se añadió una alícuota de 100  $\mu$ l de un estándar apropiado que contenía 0, 1, 10, 100 o 1000  $\mu$ U ml<sup>-1</sup> de *hTSH* (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia) a un tubo de ensayo de 300  $\mu$ l seguido por 14,5  $\mu$ l de disolución de *anti-hTSH* marcada con Terbio (III), en la que 23,4  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de *anti-hTSH* marcada con Terbio (III) se disolvió en 5,064 ml de tampón TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0 x 10<sup>-2</sup> M a pH 7,8 que contenía adicionalmente 9 g l<sup>-1</sup> de cloruro sódico, 5 g l<sup>-1</sup> de BSA, 0,5 g l<sup>-1</sup> de azida sódica, 0,5 g l<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -globulina bovina, 0,1 g l<sup>-1</sup> de Tween 20, 7,9 mg l<sup>-1</sup> de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético). El conductor Al revestido y lavado se colocó en el tubo de ensayo anteriormente mencionado. Despues de una hora de incubación con agitación continua, el conductor Al se lavó dos veces durante dos minutos con 400  $\mu$ l de tampón TRIS-HCl 5,0 x 10<sup>-2</sup> M a pH 7,4 que contenía adicionalmente 0,05% de azida sódica, 0,2% de BSA, 0,1% de Tween. El conductor Al se transfirió despues a la celda COEL que contenía tampón H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0 x 10<sup>-2</sup> M a pH 7,8 y azida sódica 1,0 x 10<sup>-2</sup> M. Se midió la respuesta DCOEL siguiendo el procedimiento 40 del Ejemplo 3 y los resultados se presentan en la Tabla 4 y la Figura 5.

45 Tabla 4

45 Inmunoensayo de *hTSH* mediante luminiscencia electrogenerada sin contacto

<i>hTSH / <math>\mu</math>U ml<sup>-1</sup></i>	DCOEL / au
0	471
1	650
10	1.070
100	4.380
1000	13.620

## 60 Ejemplo 5

*Análisis multicomponente mediante luminiscencia electrogenerada sin contacto*

65 Se prepararon las disoluciones de las muestras a partir de los siguientes componentes: tampón borato 5,0 x 10<sup>-2</sup> M ajustado a pH 7,8, peroxidisulfato 3,0 x 10<sup>-3</sup> M y Tween (poli (monolaureato de oxietilen(20) sorbitan)) 1,0 x 10<sup>-3</sup> M y cantidades variables de Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> y quelato Tb(III)-1. Se inició COEL en la superficie de un conductor Al esférico de 6,3 mm de diámetro (AbbotBall Company) como sigue: se aplicaron pulsos de excitación de 0,4 ms de duración

5 y 60 V de amplitud con nivel cero intermitente de 100 ms a los electrodos que suministran corriente, dando lugar a una corriente de aproximadamente 50 mA en dicha disolución de la muestra. La emisión de luz resultante procedente del conductor Al se detectó mediante el fotomultiplicador durante el pulso (es decir, una respuesta COEL) y durante el intervalo 0,08-8,0 ms desde el final del pulso de excitación de 0,4 ms (es decir, un COEL retardado o respuesta DCOEL). Las respuestas COEL y DCOEL integradas procedentes de los 500 pulsos de excitación se presentan en la Tabla 5 y la Figura 6: la respuesta DCOEL se puede usar para la cuantificación de Tb(III)-1 en estas mezclas de muestras porque el COEL de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  tenía una vida demasiado corta como para alcanzar la ventana de detección de 0,08-8,0 ms, mientras que la respuesta COEL listada (es decir, la respuesta COEL observada restada de la respuesta COEL del Tb(III)-1 que, a su vez, se estima de su respuesta DCOEL medida) se puede usar para la cuantificación de 10  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .

15 **Tabla 5**  
**15 Respuesta COEL y DCOEL como una función de las concentraciones combinadas de**  
**20 Tb(III)-1 y  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$**

[Tb(III)-1] + $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / mol l <sup>-1</sup>	COEL de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / au	DCOEL de Tb(III)-1 / au
1,0 x 10 <sup>-8</sup> + 1,0 x 10 <sup>-6</sup>	335.772	36.377
1,0 x 10 <sup>-7</sup> + 1,0 x 10 <sup>-6</sup>	382.782	317.303
1,0 x 10 <sup>-6</sup> + 1,0 x 10 <sup>-6</sup>	1.383.670	2.933.600
1,0 x 10 <sup>-7</sup> + 1,0 x 10 <sup>-7</sup>	34.376	377.757
1,0 x 10 <sup>-7</sup> + 1,0 x 10 <sup>-6</sup>	382.782	317.303
1,0 x 10 <sup>-7</sup> + 1,0 x 10 <sup>-5</sup>	1.697.352	395.255

35 **Ejemplo 6**

*Luminiscencia electrogenerada sin contacto selectiva en tamaño*

40 Se preparó una disolución de muestra a partir de los siguientes componentes: tampón dihidrógeno fosfato potásico 1,12 x 10<sup>-1</sup> M e hidrógeno fosfato dipotásico 8,80 x 10<sup>-2</sup> M a pH 7,2, tripropilamina 1,0 x 10<sup>-1</sup> M, azida sódica 7,1 x 10<sup>-2</sup> M y tris(2,2'-bipiridil)ruteno (II) ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) 1,0 x 10<sup>-8</sup> M. Se inicio COEL separadamente en la superficie 45 de los conductores esféricos de oro (conductores Au) con los diámetros enumerados en la Tabla 6 (es decir, una bola de vidrio recubierta con una capa de oro evaporado al vacío) aplicando un voltaje de excitación de CC desde 0 V a 20 V a los electrodos que suministran corriente a una velocidad de barrido de 0,25 V s<sup>-1</sup> en la disolución de la muestra. Las respuestas COEL resultantes de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  procedentes de diferentes conductores Au se detectaron mediante un fotomultiplicador y se exhiben en la Figura 7 (2,0 mm (---), 2,5 mm (.....), 3,5 mm (----), y 6,0 mm (—)). Los voltajes 50 e intensidades de pico del COEL de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  usando los diferentes conductores Au se enumeran en la Tabla 6.

50 **Tabla 6**  
**55 Voltajes de pico e intensidades de pico del COEL de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  en los electrolumíno-**  
**gramas obtenidos usando diferentes conductores Au**

Diámetro del conductor Au / mm	Voltaje de pico / V	COEL de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / au
2,0	14,0	4.600
2,5	10,5	10.600
3,5	8,9	46.300
6,0	5,7	157.000

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para generar la luminiscencia de un compuesto luminiscente para la cuantificación de dicho compuesto luminiscente, que comprende:

proporcionar un electrolito que tenga dentro de él (i) un par de electrodos que suministran corriente, (ii) un material eléctricamente conductor colocado entre dichos electrodos, pero no en contacto electrónico con dichos electrodos, y (iii) dicho compuesto luminiscente que está en contacto electrónico con dicho material eléctricamente conductor; y

10 aplicar una corriente eléctrica a dichos electrodos induciendo de ese modo a dicho compuesto luminiscente a exhibir luminiscencia.

15 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende adicionalmente medir dicha luminiscencia para cuantificar la concentración de dicho compuesto luminiscente.

20 3. El método según la reivindicación 1, en el que dicho material eléctricamente conductor es material electroquímicamente inerte.

4. El método según la reivindicación 3, en el que dicho material electroquímicamente inerte es carbón vítreo, oro, platino, o sus mezclas.

25 5. El método según la reivindicación 1, en el que dicho material eléctricamente conductor es un metal o semi-metal aislado.

6. El método según la reivindicación 5, en el que dicho metal o semi-metal aislado se aísla con un revestimiento de óxido o polímero.

30 7. El método según la reivindicación 5, en el que dicho metal o semi-metal es aluminio, hafnio, magnesio, silicio, tántalo, titanio, circonio, o sus mezclas.

8. El método según la reivindicación 1, en el que dicho material eléctricamente conductor es una membrana porosa recubierta con una fina capa de un material electroquímicamente inerte o un metal o semi-metal aislado.

35 9. El método según la reivindicación 1, en el que dicho material eléctricamente conductor es una combinación de un material electroquímicamente inerte y un metal o semi-metal aislado.

10. El método según la reivindicación 1, en el que dicho material eléctricamente conductor incluye adicionalmente un material magnético.

40 11. El método según la reivindicación 1, en el que dicho electrolito contiene al menos dos materiales eléctricamente conductores.

12. El método según la reivindicación 1, en el que dicho electrolito contiene al menos dos tipos diferentes de materiales eléctricamente conductores.

45 13. El método según la reivindicación 1, en el que dicho electrolito es un electrolito acuoso.

14. El método según la reivindicación 1, en el que dicho electrolito es un electrolito no acuoso

50 15. El método según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto luminiscente se fija a la superficie de dicho material eléctricamente conductor.

16. El método según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto luminiscente se liga a un analito de interés.

55 17. El método según la reivindicación 1, en el que dicha luminiscencia se mide después de un retardo desde el final de que dicha corriente eléctrica se haya aplicado a dichos electrodos que suministran corriente.

18. El método según la reivindicación 16, en el que dicha luminiscencia resulta de al menos dos compuestos luminiscentes diferentes.

60 19. Un método según la reivindicación 16, en el que dicha luminiscencia se forma en la superficie de al menos dos tipos diferentes de materiales eléctricamente conductores.

65 20. Un método según la reivindicación 19, en el que dicha luminiscencia en las superficies de dichos materiales eléctricamente conductores diferentes se inicia y mide a diferentes niveles de corrientes que pasan a través de los electrodos que suministran corriente.

## ES 2 304 971 T3

21. El método según la reivindicación 18, en el que las medidas de dos o más compuestos luminiscentes en diferentes conductores se usan para la estandarización interna.
22. El método según la reivindicación 19, en el que las medidas de dos o más compuestos luminiscentes en diferentes conductores se usan para determinar la concentración de dos o más analitos.
23. El método según la reivindicación 16, en el que dicho analito de interés es una secuencia de ácidos nucleicos.
24. El método según la reivindicación 16, en el que dicho analito es una secuencia de amino ácidos.

10

15

20

25

30

35

40

45

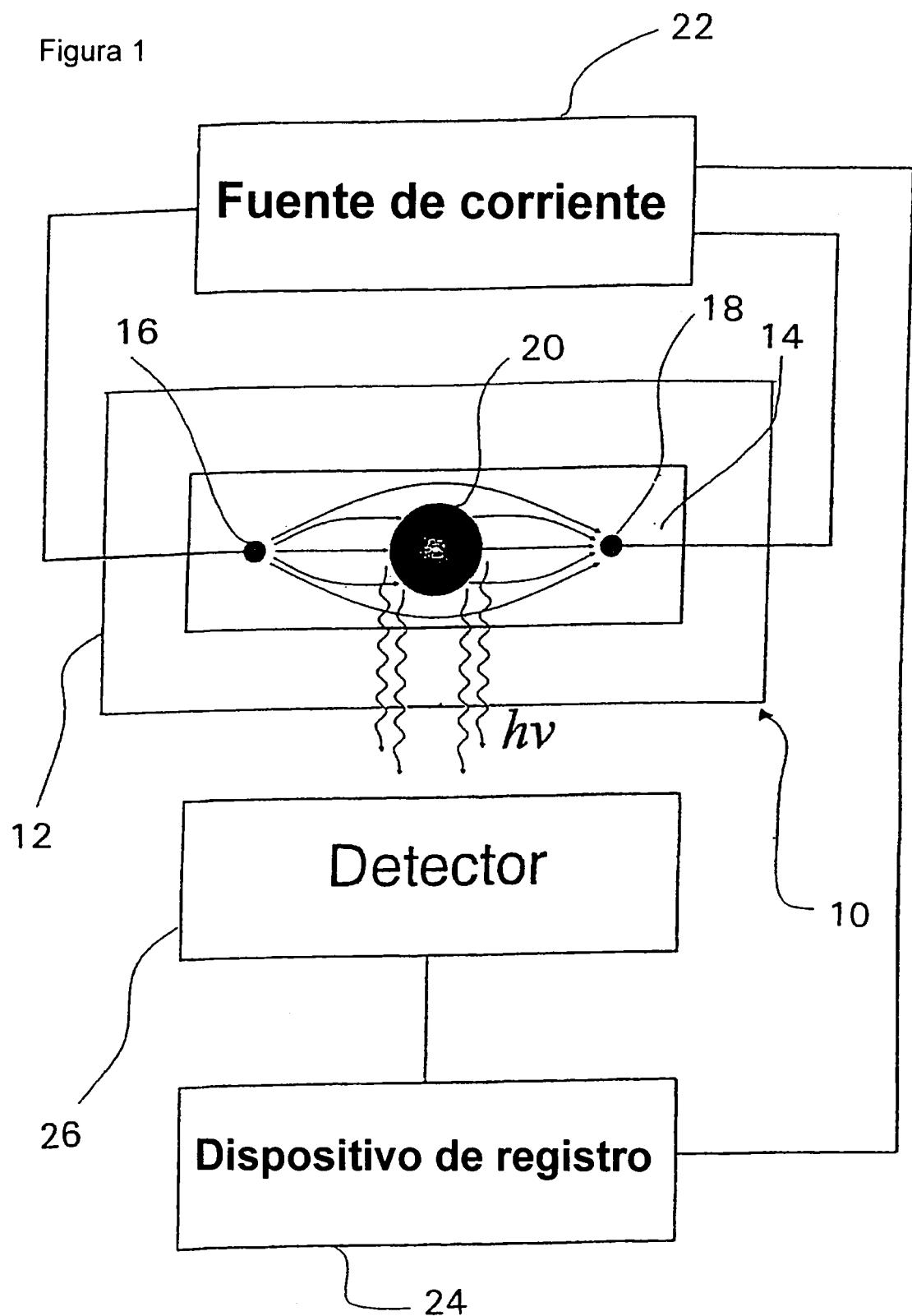
50

55

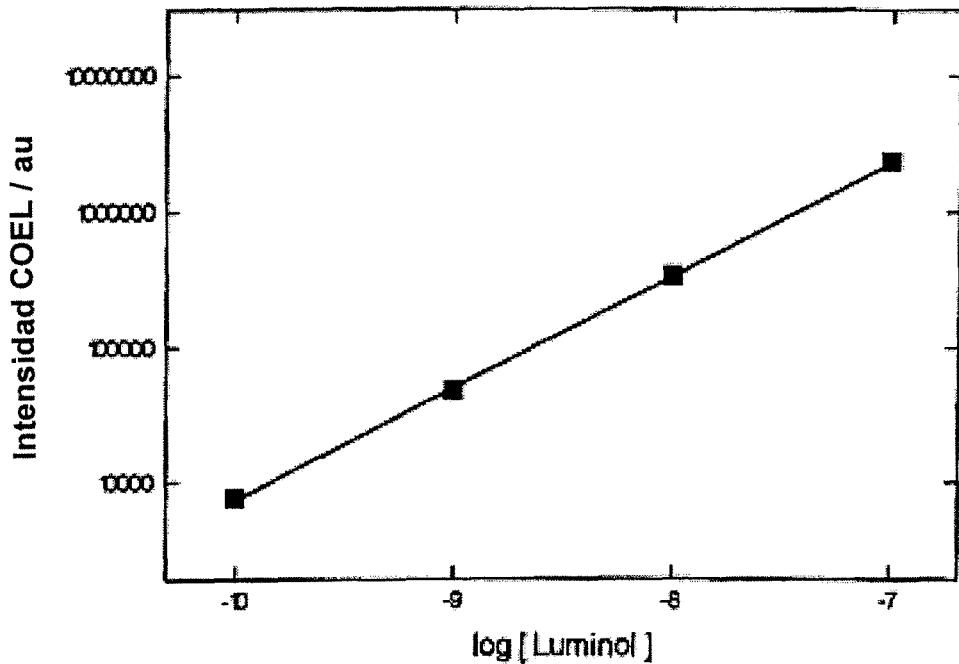
60

65

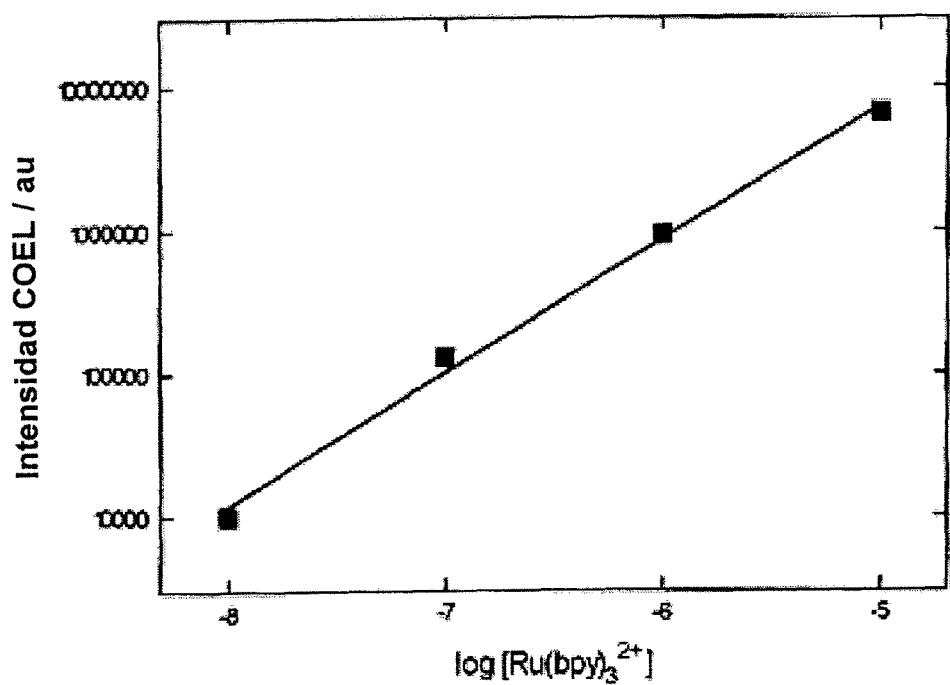
Figura 1



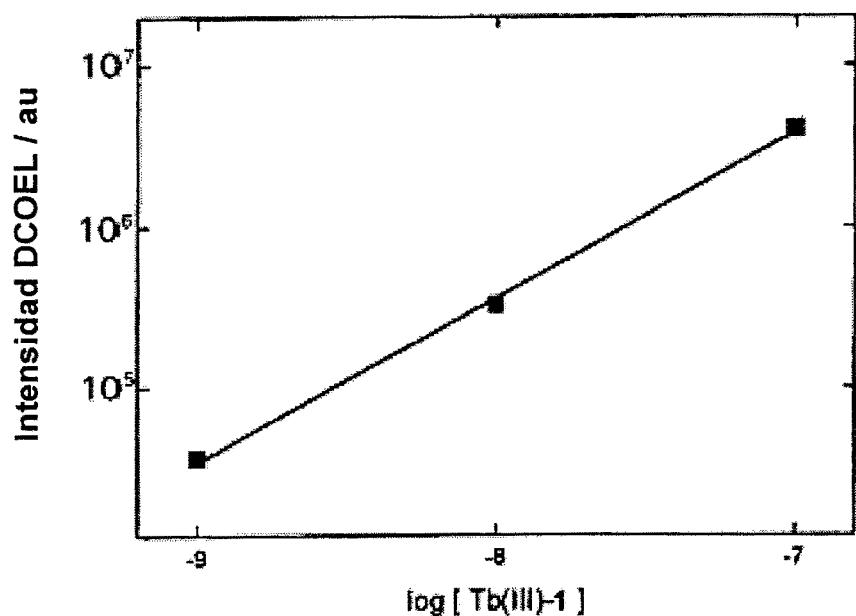
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

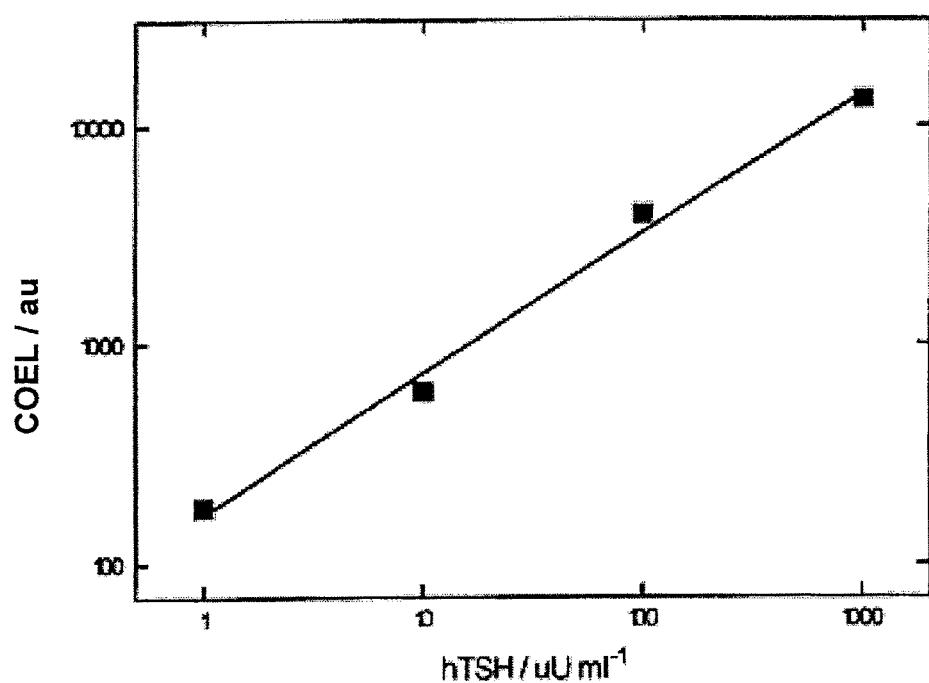


Figura 6

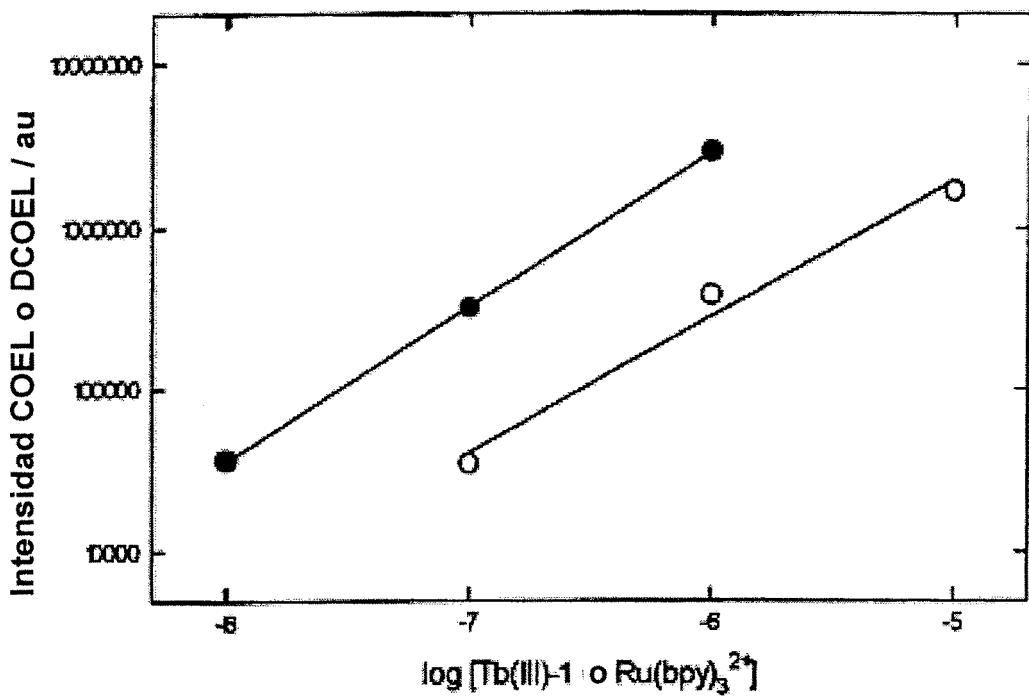


Figura 7

