



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 573**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03251762 .5**  
86 Fecha de presentación : **20.03.2003**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1347302**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Ensayo inmunosensor directo.**

30 Prioridad: **21.03.2002 US 105050**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2007**

73 Titular/es: **LifeScan, Inc.**  
**1000 Gibraltar Drive**  
**Milpitas, California 95035, US**

72 Inventor/es: **Hodges, Alastair y**  
**Chatelier, Ronald**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 282 573 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

Ensayo inmunosensor directo.

### Campo de la invención

La presente invención está relacionada con un dispositivo y con un método para llevar a cabo inmunosayos. El dispositivo comprende un inmunosensor desechable.

### Antecedentes de la invención

Los sensores biomédicos son utilizados para indicar la presencia y/o concentración de una amplia variedad de analitos. Cuando el analito es una proteína, entonces el elemento sensor utilizado es usualmente un anticuerpo, debido a que la interacción del anticuerpo con la proteína (antígeno) es muy específica. Tales inmunoensayos se dividen usualmente en dos categorías: una "respuesta sí/no" obtenida, e.g., por simple detección visual, o una concentración del antígeno, determinada por un método cuantitativo. La mayoría de los métodos cuantitativos implican un equipo caro, como contadores de escintilación (para monitorizar la radioactividad), espectrofotómetros, espectrofluorímetros (ver, e.g., U.S. 5.156.972), instrumentos de resonancia plasmónica de superficie (ver, e.g., U.S. 5.965.456) y similares. Por lo tanto, sería ventajoso el desarrollar un inmunoensayo cuantitativo que fuera al mismo tiempo lo suficientemente barato y sencillo de utilizar como para ser adecuada su utilización tanto en el domicilio como fuera de él. Un inmunosensor de este tipo no precisa de las fases de centrifugado, dilución, pipeteado, lavado o sincronización, y genera un mínimo desperdicio.

Los inmunoensayos convencionales son clasificados en dos categorías: ensayos de competición y ensayos de tipo sándwich. En un ensayo de competición el antígeno en la muestra de la prueba es mezclado con un complejo antígeno-sonda (comúnmente referido como un complejo reportero) y entonces la mezcla compete para unirse al anticuerpo. La sonda puede ser un radioisótopo, una enzima, un fluoróforo o un cromóforo. En un ensayo de tipo sándwich el antígeno en la muestra de prueba se une al anticuerpo y, a continuación, un segundo complejo anticuerpo-sonda se une al antígeno. En estos antiguos métodos de ensayo son usualmente requeridas dos o más fases de lavado. Las fases de lavado introducen complejidad en el procedimiento del ensayo y pueden generar desperdicios líquidos con riesgo biológico. Por lo tanto, sería ventajoso el desarrollar un dispositivo para llevar a cabo un inmunoensayo que no precisara de fases de lavado y que fuera adecuado para un único uso, como un dispositivo desechable.

### Resumen de la invención

Es proporcionado un inmunosensor cuantitativo desechable barato que no precisa de fases de lavado y, de esta forma, no genera desperdicios líquidos. Para inmunosensores de ciertas realizaciones no se precisa que el usuario realice fases de sincronización, y el sensor puede ser adaptado fácilmente a las interacciones de antígeno-anticuerpo en un amplio rango cinético. Los sensores de las realizaciones preferidas presentan un número de ventajas potenciales. Tales sensores pueden ser más fáciles de fabricar, ya que los reactivos pueden ser depositados en una fase única y/o únicamente en una parte de la cámara de reacción o en un soporte dentro de la misma.

Los sensores pueden utilizar un complejo de pseudo antígeno-sonda, un complejo de antígeno modifi-

cado-sonda o un complejo de antígeno-sonda. El término "pseudo antígeno", conforme es utilizado aquí, es un término amplio y es utilizado en su sentido ordinario incluyendo, sin limitación, a los antígenos distintos del antígeno de interés que se unen al anticuerpo inmovilizado, pero no con tanta fuerza como el antígeno de interés. El término "antígeno modificado", conforme es utilizado aquí, es un término amplio y es utilizado en su sentido ordinario incluyendo, sin limitación, antígenos que han sido modificados químicamente o de otra forma, de tal modo que el antígeno modificado se une al anticuerpo inmovilizado, pero no con tanta fuerza como el antígeno de interés. El antígeno del complejo antígeno-sonda, el cual puede ser el mismo que el antígeno de interés o uno diferente, por el hecho de encontrarse unido a una sonda se unirá al anticuerpo inmovilizado, pero no con tanta fuerza como el antígeno de interés, el cual se encuentra en un estado no unido. Aunque las realizaciones preferidas son comentadas principalmente en relación con un pseudo antígeno, se entiende que un complejo de antígeno-sonda o un antígeno modificado pueden ser sustituidos por un pseudo antígeno.

Puede ser más fácil el asegurar que la proporción entre anticuerpo y antígeno-sonda, antígeno modificado-sonda o pseudo antígeno-sonda en la cámara de reacción es correcta, ya que esto ocurrirá esencialmente de forma automática cuando el antígeno-sonda, el antígeno modificado-sonda o el pseudo antígeno-sonda se haya unido al anticuerpo durante la fabricación del sensor, a diferencia de los métodos antiguos en este campo, en donde la proporción correcta se obtiene usualmente por medio del control de las tasas de sedimentación del reactivo y de las densidades de superficie. El sensor de las realizaciones preferidas puede ser particularmente adecuado también para cinéticas de inmunoreacción más lentas, en donde los procesos de unión pueden ser lentos. La utilización de un pseudo antígeno no humano en la fabricación del sensor puede reducir la posibilidad de transmisión de enfermedades contagiosas cuando el sensor se pone en contacto con una gota de sangre en el dedo del paciente.

En una primera realización es proporcionado un dispositivo desechable para su utilización en la detección de un antígeno diana en una muestra de fluido, incluyendo el dispositivo una cámara de reacción; un anticuerpo inmovilizado fijado dentro de la cámara de reacción; un complejo reportero incluyendo una sonda y un antígeno complejo reportero, en donde la sonda se encuentra ligada al antígeno complejo reportero, en donde el antígeno complejo reportero se encuentra unido al anticuerpo inmovilizado, y en donde el antígeno complejo reportero se une con menor fuerza que el antígeno diana al anticuerpo inmovilizado; una cámara de detección; una entrada de la muestra a la cámara de reacción; y un paso para la muestra entre la cámara de reacción y la cámara de detección.

En un aspecto de la primera realización el antígeno complejo reportero puede ser un antígeno diana, un pseudo antígeno o un antígeno modificado. La sonda puede incluir radioisótopos, cromóforos o fluoróforos.

En un aspecto de la primera realización la sonda puede incluir una enzima, como la glucosa deshidrogenasa. Cuando la sonda es una enzima, la cámara de detección puede incluir adicionalmente un sustrato enzimático, por ejemplo, un sustrato oxidable como

la glucosa. La cámara de detección puede incluir también adicionalmente un mediador, como el diclorofenolindofenol, o complejos entre metales de transición y especies heteroatómicas conteniendo hidrógeno, o ferricianida. El dispositivo puede incluir además un tampón que ajuste el pH de la muestra, como un fosfato o un melitato. El dispositivo puede incluir también un estabilizador, en donde el estabilizador estabiliza uno o más de entre los siguientes elementos: el antígeno diana, el antígeno complejo reportero, la enzima y el anticuerpo inmovilizado. El sustrato enzimático puede ser soportado sobre una superficie interior de la cámara de detección.

En un aspecto de la primera realización el anticuerpo inmovilizado puede ser soportado sobre una superficie interior de la cámara de reacción.

En un aspecto de la primera realización el dispositivo incluye también un material de soporte. El material de soporte puede encontrarse dentro de la cámara de detección y puede incluir una primera sustancia, como un sustrato enzimático, un mediador o un tampón, que puede estar soportada sobre el material de soporte o encontrarse dentro del mismo. El material de soporte pueden encontrarse dentro de la cámara de reacción y puede incluir una segunda sustancia, como el anticuerpo inmovilizado, el complejo reportero o un agente que evite la unión no específica de proteínas a una superficie interna de la cámara de reacción, que puede estar soportada sobre el material de soporte o encontrarse dentro del mismo. El material de soporte puede incluir un material reticulado, por ejemplo un material malla incluyendo un polímero como la poliolefina, el poliéster, el nylon, la celulosa, el poliestireno, el policarbonato, la polisulfona o mezclas de los mismos. El material de soporte puede incluir un material de relleno fibroso, como un material de relleno fibroso incluyendo un polímero como la poliolefina, el poliéster, el nylon, la celulosa, el poliestireno, el policarbonato, la polisulfona o mezclas de los mismos. El material de soporte puede incluir un material poroso, como un polvo sinterizado o una membrana macroporosa, por ejemplo, una membrana macroporosa incluyendo material polimérico como la polisulfona, el difluoruro de polivinilideno, el nylon, el acetato de celulosa, el polimetacrilato, el poliácido o mezclas de los mismos. El material de soporte puede incluir una perla.

En un aspecto de la primera realización la cámara de detección incluye un primer electrodo y un segundo electrodo. Al menos uno de los dos electrodos (primer electrodo y segundo electrodo) incluye un material como aluminio, cobre, níquel, cromo, acero inoxidable, paladio, platino, oro, iridio, carbono, carbono mezclado con aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño, un polímero conductor o mezclas de los mismos.

En un aspecto de la primera realización una pared de la cámara de detección puede ser transparente a una radiación emitida o absorbida por la sonda, y la radiación es indicativa de una presencia o ausencia del complejo reportero en la cámara de detección.

En un aspecto de la primera realización el dispositivo incluye un detector que detecta una situación en donde la cámara de reacción se encuentra sustancialmente llena.

En un aspecto de la primera realización el dispositivo incluye un medio de perforación que crea un orificio de aireación en la cámara de detección, en un

extremo distal de la cámara de detección. El dispositivo puede incluir también un orificio de aireación en la cámara de reacción, en un extremo distal de la cámara de reacción.

En un aspecto de la primera realización el antígeno diana incluye una proteína C reactiva humana. El antígeno complejo reportero puede incluir una proteína C reactiva monomérica. Alternativamente, el antígeno complejo reportero puede incluir una proteína C reactiva derivada de una especie no humana, o una proteína C reactiva químicamente modificada, en donde una afinidad de la proteína C reactiva químicamente modificada para el anticuerpo es menor que una afinidad de la proteína C reactiva humana para el anticuerpo.

En un aspecto de la primera realización una pared de la cámara de detección, o una pared de la cámara de reacción, incluye un material como el poliéster, el poliestireno, el policarbonato, la poliolefina, el tereftalato de polietileno o mezclas de los mismos. La pared de la cámara de detección, o la pared de la cámara de reacción, puede incluir también una sustancia de relleno, como el dióxido de titanio, el carbono, el sílice, el cristal y mezclas de los mismos.

En un aspecto de la primera realización la sonda incluye un cofactor enzimático, como la flavina mononucleótida, la flavina-adenina-dinucleótida, la nicotinamida adenina dinucleótida o la pirroloquinolina quinona. El cofactor enzimático puede estar ligado al antígeno complejo reportero a través de un espaciador flexible. La cámara de detección puede incluir también un sustrato enzimático o una apoenzima.

En un aspecto de la primera realización la sonda incluye un regulador de actividad enzimática, como una quinasa o fosforilasa. La cámara de detección puede incluir también un sustrato enzimático o una enzima.

En un aspecto de la primera realización la sonda incluye una subunidad proteica, la cual es parte de una enzima multi-subunitaria.

En una segunda realización es proporcionado un método para determinar una cantidad de un antígeno diana en una muestra de fluido, incluyendo el método las fases de: colocación de la muestra de fluido en una cámara de reacción conteniendo un anticuerpo inmovilizado y un complejo reportero, incluyendo una sonda ligada a un antígeno complejo reportero, en donde el anticuerpo se encuentra fijado dentro de la cámara de reacción, en donde el antígeno complejo reportero se encuentra unido al anticuerpo inmovilizado, y en donde el antígeno complejo reportero se une con menos fuerza al anticuerpo inmovilizado que el antígeno diana; disociación de una parte del antígeno complejo reportero del anticuerpo inmovilizado en la muestra de fluido; unión de una parte del antígeno diana al anticuerpo inmovilizado; transferencia de la muestra de fluido a una cámara de detección; y determinación de una cantidad de complejo reportero en la muestra de fluido, en donde la cantidad de complejo reportero es indicativa de la cantidad inicial de antígeno diana en la muestra de fluido.

En un aspecto de la segunda realización la fase de transferencia de la muestra de fluido a una cámara de detección incluye el transferir la muestra de fluido a una célula electroquímica poseyendo un primer electrodo y un segundo electrodo. La fase de determinación de una cantidad del complejo reportero en la muestra de fluido puede incluir también: la aplicación

de un potencial entre el primer electrodo y el segundo electrodo en la célula electroquímica; y la medición de una corriente, en donde la corriente es indicativa de una cantidad de complejo reportero presente en la muestra de fluido, y en donde la cantidad de complejo reportero es indicativa de la cantidad de antígeno diana.

En un aspecto de la segunda realización la fase de transferencia de la muestra de fluido a una cámara de detección incluye el transferir la muestra de fluido a una cámara de detección incluyendo una parte transmisora de radiación electromagnética. La fase de determinación de una cantidad de complejo reportero en la muestra de fluido puede incluir también las fases de: exposición de la parte transmisora de radiación electromagnética a radiación electromagnética, en donde la radiación electromagnética pasa a través de la muestra de fluido, o es reflejada por la misma; y la monitorización de una propiedad de la radiación electromagnética después de que ésta pasa a través de la muestra de fluido, o es reflejada por la misma, en donde la propiedad es indicativa de una cantidad de complejo reportero presente en la muestra de fluido, y en donde la cantidad de complejo reportero es indicativa de la cantidad de antígeno diana.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una vista superior (no a escala) de un inmunosensor de una primera realización preferida, que incorpora una célula electroquímica.

La Fig. 2 muestra una vista transversal (no a escala), a lo largo de la línea A-A', de una realización del inmunosensor de la Figura 1.

La Fig. 3 muestra una vista superior (no a escala) de un inmunosensor de una realización preferida, que incorpora una célula electroquímica.

La Fig. 4 muestra una vista transversal (no a escala), a lo largo de la línea B-B', de una realización del inmunosensor de la Figura 3.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Es proporcionada una tira sensor que contiene dos cámaras: una cámara de reacción y una cámara de detección. Es alojada una muestra en la cámara de reacción, en donde los componentes de la muestra experimentan una inmunoreacción. Son detectados uno o más productos de la inmunoreacción en la cámara de detección, con el fin de cuantificar el antígeno presente en la muestra. La cámara de reacción y la cámara de detección son preparadas de tal modo que la muestra puede fluir desde la cámara de reacción hasta la cámara de detección.

Después de haber tenido lugar la inmunoreacción en la cámara de reacción, al menos parte de la muestra que ha reaccionado es transferida a la cámara de detección, donde es detectada y analizada la presencia de una sonda con el fin de obtener un resultado. Se prefiere que sea transferida una cantidad suficiente de muestra como para que la cámara de detección se encuentre lo suficientemente llena, es decir, que sea transferida una cantidad suficiente de muestra a la cámara de detección de tal modo que pueda ser detectada y analizada la presencia de una sonda por medio del método de detección empleado.

La cámara de reacción contiene anticuerpos inmovilizados dentro de la misma para el antígeno de interés. Los anticuerpos pueden ser inmovilizados sobre una pared de la misma cámara. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser inmovilizados sobre un sopor-

te que se encuentra dentro de la cámara de reacción. Los soportes adecuados incluyen, aunque sin estar limitados a los mismos, materiales fibrosos, materiales macroporosos, materiales en polvo o, en realizaciones especialmente preferidas, perlas de un material, como los que son comúnmente conocidos en este campo para el soporte de anticuerpos.

En las realizaciones preferidas los anticuerpos inmovilizados son unidos a lo que es referido como un "pseudo antígeno" ligado a una sonda. El pseudo antígeno-sonda se une al anticuerpo inmovilizado, pero no con tanta fuerza como lo haría el antígeno de interés. Si, por ejemplo, el antígeno a ser detectado es una proteína humana, entonces un pseudo antígeno-sonda adecuado puede incluir una versión animal de la misma proteína -como una proteína de perro o de cerdo- ligada a la sonda. En este ejemplo los anticuerpos para la versión humana de la proteína son inmovilizados en la cámara de reacción, y la versión animal de la proteína, ligada a una sonda adecuada, es unida al anticuerpo inmovilizado para formar un complejo de anticuerpo-pseudo antígeno-sonda.

Cuando la muestra llena la cámara de reacción una pequeña fracción del pseudo antígeno-sonda se disocia en la solución, ya que la unión al anticuerpo es relativamente débil. Existirá un equilibrio dinámico entre el pseudo antígeno-sonda unido y el pseudo antígeno-sonda libre, dejando libres algunos sitios de unión del anticuerpo. Si hay antígeno en la solución éste se unirá fuertemente a los sitios libres de unión de anticuerpos, preferentemente en lugar del pseudo antígeno-sonda y, de esta forma, dejará al pseudo antígeno-sonda en la solución. Este proceso continuará hasta que sustancialmente todo el antígeno presente en la muestra se haya unido a los anticuerpos y exista una cantidad igual de pseudo antígeno-sonda libre en la solución. De esta manera, cada antígeno que se una a un anticuerpo inmovilizado desplazará un pseudo antígeno-sonda a la solución.

Cuando todo el antígeno en la muestra, o una fracción predeterminada del mismo, se encuentra unido a los anticuerpos inmovilizados, la concentración de pseudo antígeno-sonda en la solución refleja la concentración inicial de antígeno en la muestra. En las realizaciones preferidas se cuenta con el equilibrio entre el pseudo antígeno-sonda libre y el unido para asegurar que el antígeno en la solución termina unido al anticuerpo de forma preferente en lugar del pseudo antígeno-sonda. Por lo tanto, es utilizado un pseudo antígeno-sonda que se une más débilmente al anticuerpo que el antígeno diana, pero no hay necesidad de separar físicamente el pseudo antígeno-sonda del anticuerpo con anterioridad a la introducción de la muestra, conforme en ciertos métodos antiguos en este campo.

Después de que han tenido lugar las inmunoreacciones, la muestra de líquido conteniendo cualquier pseudo antígeno-sonda liberado de los anticuerpos es transferida a la cámara de detección. En la cámara de detección es medida la concentración de pseudo antígeno-sonda presente en la muestra y es obtenido un resultado.

Una pequeña cantidad de pseudo antígeno-sonda puede disociarse en la solución incluso en ausencia de antígeno en la muestra, como resultado del equilibrio alcanzado en la solución entre el pseudo antígeno-sonda unido y el libre. Si esto tiene lugar, entonces la señal generada en la cámara de detección debida a

este pseudo antígeno-sonda libre es tratada como señal de fondo, la cual es sustraída del resultado de concentración de antígeno como parte del procedimiento analítico.

En WO02/06788, WO02/06806, WO02/06828 y WO02/08763 es descrita una tira de inmunoensayo con una inmunoreacción ligada y cámara de detección. A diferencia del sensor aquí descrito -el cual utiliza un pseudo antígeno-sonda inicialmente conjugado con un anticuerpo inmovilizado sobre una superficie dentro de la cámara de reacción- en el sensor de las solicitudes antes mencionadas, con anterioridad a la introducción de la muestra en la cámara de reacción, los anticuerpos son inmovilizados sobre una superficie y el antígeno-sonda es inmovilizado sobre otra superficie de la cámara de reacción. Cuando es introducida la muestra en la cámara de reacción, el antígeno-sonda se disuelve en la solución y compete con el antígeno en la muestra para los sitios de unión al anticuerpo. El método de utilización del sensor de las solicitudes anteriormente referidas se basa sobre todo en factores cinéticos para asegurar que el antígeno se une al anticuerpo (llegando el primero) de forma preferente a la que lo haría el antígeno-sonda. Por lo tanto, existe la necesidad de separar espacialmente el antígeno-sonda del anticuerpo en la cámara de reacción, y el sensor puede funcionar cuando el antígeno y el antígeno-sonda se unen con la misma fuerza al anticuerpo.

En las realizaciones preferidas el sensor es un inmunosensor de fase única no lavable. El sensor es un dispositivo desechable de un único uso que utiliza una cámara de reacción y una cámara de detección. Puede ser utilizado cualquier método de detección adecuado. Los métodos de detección adecuados incluyen, por ejemplo, la detección visual, en donde es observado el desarrollo de un color, o la detección espectroscópica, en donde es utilizada la luz reflejada o transmitida para medir cambios en la absorbancia lumínica. En una realización preferida el método de detección es electroquímico, en donde es medida la corriente eléctrica, o el potencial, relacionados con los productos de las inmunoreacciones.

Métodos y dispositivos para la obtención de mediciones electroquímicas de muestras de fluidos son expuestos en detalle en las anteriormente indicadas solicitudes internacionales.

La sincronización de las distintas fases de la prueba, i.e., la fase de reacción y la fase de detección, puede ser realizada manualmente. Alternativamente, la sincronización puede ser realizada automáticamente en respuesta a una señal desencadenante generada cuando la cámara de reacción y/o la cámara de detección se encuentran llenas.

Realizaciones de sensores adecuados para su utilización en la detección electroquímica son ilustradas en las Figuras 1 y 2 y en las Figuras 3 y 4. La Figura 1 es una vista superior de una primera realización de una tira sensor y la Figura 2 es una vista transversal, mostrando detalles de la cámara de reacción y de la cámara de detección. La Figura 3 es una vista superior de una segunda realización de una tira sensor y la Figura 4 es una vista transversal, mostrando detalles de la cámara de reacción y de la cámara de detección.

#### *El Sensor*

Los inmunosensores de la presente invención pueden ser preparados utilizando técnicas de sobra conocidas de fabricación de dispositivos de capas finas,

como las que son utilizadas en la preparación de dispositivos sensores electroquímicos de glucosa (ver, e.g., US 5.942.102). Tales técnicas, con ciertas modificaciones, pueden ser usadas también para preparar inmunosensores utilizando métodos de detección no electroquímicos.

En las realizaciones preferidas de los inmunosensores ilustrados en las Figuras 1 y 2 y en las Figuras 3 y 4 la cámara de detección comprende una célula electroquímica. Los inmunosensores pueden ser preparados ensamblando varias capas finas de materiales adecuadamente conformados, de acuerdo con los métodos de fabricación de sensores de capas finas según es de sobra conocido en este campo. Usualmente, el proceso de fabricación comprende el intercalado de una o más capas espaciadoras entre una capa superior y una capa inferior.

En una realización preferida el sensor (20) es una célula electroquímica (28) utilizando una enzima, e.g., glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa, como la sonda, conforme es ilustrado en la Figura 1, una vista superior de un sensor (20) de este tipo, y en la Figura 2, una sección transversal del sensor a lo largo de la línea A-A'. La cámara de reacción (22) y la cámara de detección (28) son preparadas formando una abertura que se extiende a través de una hoja de material resistente a la electricidad (36). La abertura está conformada de tal manera que ésta define una pared lateral tanto en la cámara de reacción (22) como en la cámara de detección (28), así como el paso para la muestra (38) entre las dos cámaras (22) y (28). Extendiéndose la abertura desde el extremo proximal (24) de la cámara de reacción (22) hasta el extremo de la hoja (37) se forma también el acceso de la muestra (24). En una realización el grosor de la hoja (36) define la altura total de la cámara de reacción (22) y de la cámara de detección (28), que son las mismas. En otra realización la altura de la cámara de reacción (22) es mayor que la de la cámara de detección (28). Es preparada una cámara de reacción (22) de mayor altura que la cámara de detección (28) al extender múltiples hojas (32), (34) y (36) juntas. La hoja del medio (36) de la capa posee una abertura que define las paredes laterales (74) y (76) tanto de la cámara de reacción (22) como de la cámara de detección (28), conforme es descrito más arriba. Esta capa media (36) se encuentra intercalada entre dos o más capas adicionales (32) y (34), poseyendo las capas adicionales (32) y (34) una abertura definiendo únicamente la pared lateral (74) de la cámara de reacción (22), definiendo de esta forma las capas (32) y (34) las paredes del extremo (60) y (62) de la cámara de detección (28). En esta realización las paredes del extremo (60) y (62) de la cámara de detección comprenden los electrodos (52) y (54), los cuales pueden ser preparados conforme es descrito más abajo.

Conforme es ilustrado en la Figura 2 los anticuerpos (44) son sujetados al fondo (40) de la cámara de reacción (22). El pseudo antígeno-sonda (50) es conjugado con los anticuerpos (44). El anticuerpo puede ser sujeto a cualquier superficie adecuada dentro de la cámara de reacción, e.g., sujeto a una pared o sobre una superficie de un soporte dentro de la cámara de reacción (22).

Un primera capa fina de electrodos (52) es colocada o formada sobre un lado (70) de la hoja del material resistente a la electricidad (36), extendiéndose a lo largo de la abertura que forma la cámara de detección

(28) y formando un extremo de la pared (60). La capa (52) puede ser adherida a la hoja (36), e.g. por medio de un adhesivo. Los adhesivos adecuados incluyen, por ejemplo, adhesivos activados por calor, adhesivos sensibles a la presión, adhesivos curados por calor, adhesivos curados químicamente, adhesivos de fusión en caliente, adhesivos de viscosidad caliente y similares.

La capa de electrodos (52) puede ser preparada por medio de recubrimiento (e.g., recubrimiento por bombardeo iónico, conforme es indicado en la WO97/18464, por impresión por serigrafía, o por cualquier otro método adecuado) de una hoja de material resistente a la electricidad (32) con un material adecuado, por ejemplo, aluminio, cobre, níquel, cromo, acero, acero inoxidable, platino, paladio, carbono, carbono mezclado con un aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño, óxidos de indio/estaño mezclados, oro, plata, iridio, mezclas de los mismos, polímeros conductores, como el polipirrol o el poliácetileno, y similares. Si el electrodo (52) ha de ser utilizado como un cátodo en la célula electroquímica, entonces los materiales adecuados incluyen, por ejemplo, aluminio, cobre, níquel, cromo, acero, acero inoxidable, platino, paladio, carbono, carbono mezclado con un aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño, óxidos de indio/estaño mezclados, oro, plata, iridio, mezclas de los mismos, polímeros conductores, como el polipirrol o el poliácetileno, y similares. Si el electrodo (52) ha de ser utilizado como un ánodo en la célula electroquímica, o tiene que estar en contacto con sustancias oxidantes durante la fabricación o el almacenamiento del sensor, entonces los materiales adecuados incluyen, por ejemplo, platino, paladio, carbono, carbono mezclado con un aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño, óxidos de indio/estaño mezclados, oro, plata, iridio, mezclas de los mismos, polímeros conductores, como el polipirrol o el poliácetileno, y similares. Los materiales adecuados para su utilización como los electrodos (52) y (54) son compatibles con los reactivos presentes en el sensor (20), es decir, no reaccionan químicamente con los reactivos en el potencial escogido, o durante la fabricación y almacenamiento del sensor.

Una segunda capa fina de electrodos (54) es colocada sobre el lado opuesto (72) del material resistente a la electricidad (36), extendiéndose también sobre la abertura formando la cámara de detección (28), para formar una segunda pared del extremo (62). En esta realización la capa eléctricamente aislante inerte (36) separa los sustratos portadores de electrodos (32) y (34). Preferiblemente, la capa aislante (36) mantiene a las capas (32) y (34) en una separación predeterminada. Siempre que esta separación sea lo suficientemente pequeña, e.g., inferior o igual a alrededor de 500 micrones, el flujo de la corriente entre los electrodos (52) y (54) será directamente proporcional a la concentración de mediador reducido después de un tiempo adecuadamente corto en relación con el tiempo de detección empleado. En esta realización la velocidad del aumento de corriente está directamente relacionada con la velocidad de reacción de la enzima y, por lo tanto, con la cantidad de enzima presente.

En ciertas realizaciones puede ser preferida una configuración de electrodos distinta de una relación opuesta, por ejemplo, una relación de lado a lado, o una relación paralela pero compensada. Los electrodos pueden ser idénticos o sustancialmente similares

en cuanto a tamaño, o pueden ser de distintos tamaños y/o distintas formas. Los electrodos pueden comprender el mismo material conductor o materiales diferentes. Serán evidentes para aquellos expertos en este campo otras variaciones en la configuración de los electrodos, espaciamiento y construcción o fabricación.

En una realización preferida, las capas de electrodos (52) y (54) son montadas en una relación opuesta en paralelo, a una distancia inferior o igual a 500, 450, 400, 350, 300, 250 o 200 micrones y, más preferiblemente, desde alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 micrones hasta alrededor de 75, 100, 125, 150 o 175 micrones. Sin embargo, en ciertas realizaciones puede ser preferido que el espaciamiento de electrodos sea superior a 500 micrones, por ejemplo 600, 700, 800, 900 o 1000 micrones, o incluso mayor de 1, 2, 3, 4 o 5 milímetros.

El volumen de la cámara de detección o de la cámara de reacción es usualmente desde alrededor de 0,3 microlitros, o inferior, hasta alrededor de 100 microlitros o más, preferiblemente desde alrededor de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 microlitros hasta alrededor de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 microlitros y, más preferiblemente, desde alrededor de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 microlitros hasta alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 o 18 microlitros. Sin embargo, en ciertas realizaciones pueden ser preferidos volúmenes mayores o menores para una de las cámaras o para ambas: la cámara de reacción y la cámara de detección.

Los electrodos (54) y (52) en la cámara de detección (28) pueden ser colocados en conexión eléctrica con un contador (no mostrado) a través del extremo conector (66). Los conectores (no mostrados) se encuentran en conexión eléctrica con los electrodos (54) y (56) en la cámara de detección (28) a través de canalizaciones (no mostradas). En la realización preferida, ilustrada en la Figura 1, estas canalizaciones consisten en extensiones de las películas de los conductores (52) y (54) que recubren las superficies internas (32) y (34). El contador en conexión con el área de conexión (66) es capaz de aplicar un potencial entre los electrodos (52) y (54) en la cámara de detección (28), analizando las señales eléctricas generadas, mostrando una respuesta, almacenando opcionalmente la respuesta en memoria y, opcionalmente, transmitiendo las respuestas almacenadas a un dispositivo externo, como una impresora o un ordenador.

En otras realizaciones utilizando detección electroquímica son usualmente utilizadas tiras de material conductor en una de las caras internas de la cámara de detección, o en ambas, con, al menos, dos electrodos presentes, es decir, un electrodo sensor y un electrodo contador/de referencia. Opcionalmente puede estar presente un tercer electrodo, sirviendo como un electrodo de referencia por separado.

Cuando se utilizan métodos de detección potenciométrica el contador es capaz de medir la diferencia de potencial entre un electrodo sensor y un electrodo de referencia, pero no es necesario que sea capaz de aplicar un potencial entre los electrodos.

En realizaciones en donde la detección visual, o la espectroscopía de reflectancia, es el método de detección utilizado, las capas (32) y (46) y/o las capas (34) y (42) son transparentes a la longitud de onda de radiación que ha de ser observada. En el caso de la detección visual es observado un simple cambio de color en la cámara de detección (28). En el caso de la

espectroscopía de reflectancia la radiación de detección es emitida a través de las capas (32) y (46) y/o de las capas (34) y (42), y es analizada la radiación reflejada por la solución en la cámara de detección (28). En el caso de espectroscopía de transmisión como método de detección, las capas (32), (46), (34) y (42) son transparentes a la radiación en la longitud de onda de elección. La radiación es emitida a través de la muestra en la cámara de detección (28) y es medida la atenuación del rayo de luz.

En una realización preferida la capa (36) comprende un sustrato con una capa de adhesivo (no mostrada) que recubre su superficie superior (70) y su superficie inferior (72). Ejemplos de materiales adecuados para el sustrato de la capa (36) incluyen el poliéster, el poliestireno, el policarbonato, las poliolefinas y, preferiblemente, el tereftalato de polietileno. Estos pueden ser materiales nativos o pueden estar rellenos con rellenos adecuados para conferir propiedades ópticas o mecánicas deseables. Ejemplos de materiales adecuados como relleno incluyen, aunque sin estar limitados a los mismos, el dióxido de titanio, el carbono, el sílice y el cristal. Ejemplos de adhesivos adecuados son los adhesivos sensibles a la presión, los adhesivos de curado por calor o químicamente, y los adhesivos de fusión en caliente y de viscosidad caliente. Alternativamente, las capas espaciadoras por sí mismas pueden ser un adhesivo adecuado.

Si un acceso (24) de la muestra no ha sido formado aún, previamente durante el proceso de fabricación, entonces es proporcionado uno, por ejemplo, formando una incisión (no ilustrada) en el extremo (37) del dispositivo (20) que cruza la cámara de reacción (22).

El círculo rayado en la Figura 1 denota una abertura (30) que perfora las capas (32), (34) y (36), pero no las capas (42) y (46), abriéndose la abertura en la capa (34) hacia la cámara de detección (28). Debido a que las capas (42) y (46) no se encuentran perforadas inicialmente, la única abertura a la atmósfera de la cámara de detección (28) es el paso para la muestra (38) que abre en la cámara de reacción (22). De esta forma, cuando la cámara de reacción (22) se llena con la muestra, el paso para la muestra (38) hacia la cámara de detección (28) se encuentra bloqueado. Esto atrapa el aire en la cámara de detección (28) y evita sustancialmente que ésta se llene de la muestra. Una pequeña cantidad de la muestra entrará en la cámara de detección (28) durante el tiempo que transcurre desde que la muestra contacta por primera vez con el paso (38) hacia la cámara de detección (28) hasta que la muestra contacta con el lado más alejado del paso (38). Sin embargo, una vez que la muestra ha pasado en su totalidad a través del paso (38) hasta la cámara de detección (28), no tendrá lugar más llenado de la cámara de detección (28). El volumen de la cámara de reacción (22) es escogido normalmente para que sea al menos igual, y preferiblemente mayor, que el volumen de la cámara de detección (28). Al abrir el orificio de aireación (30) hacia la atmósfera, la muestra es transferida para llenar la cámara de detección (28). El orificio puede ser abierto por medio de una aguja conectada a un solenoide en el contador.

Un inmunosensor (100) de otra realización, conforme es representado en las Figuras 3 y 4, puede ser preparado como sigue. Una primera capa conformada (112) y una segunda capa espaciadora conformada (114) de grosor similar son situadas cada una de

ellas encima de una capa inferior (116). La primera capa espaciadora (112) es de forma rectangular y está situada en el extremo proximal (118) de la capa inferior (116). La segunda capa espaciadora (114) es también de forma rectangular y está situada sobre la capa inferior (116) separada a una cierta distancia de la primera capa espaciadora (112). El extremo distal (120) de la primera capa espaciadora (112) y el extremo proximal (122) de la segunda capa espaciadora (114) forman las porciones (120), (122) de las paredes laterales de la cámara de reacción (124). La capa inferior (116) forma la pared inferior (126) de la cámara de reacción (124). Los anticuerpos (164) son fijados al fondo (126) de la cámara de reacción (124). El antígeno-sonda, o el pseudo antígeno-sonda, (162) es unido a los anticuerpos (164) fijados.

Una tercera capa espaciadora conformada (128), similar en forma a la primera capa espaciadora conformada (112), es situada encima de la primera capa espaciadora conformada (112). Una cuarta capa espaciadora (130) posee una ranura (132) que se extiende a través del extremo proximal (134) de la capa espaciadora (130) hacia el centro de la capa espaciadora (130). La cuarta capa espaciadora (130) es situada encima de la segunda capa espaciadora conformada (114) con los extremos proximales (122), (134) alineados. La ranura (132) en la cuarta capa espaciadora forma las paredes laterales (no ilustradas) de la cámara de detección (132). La porción (138) de la segunda capa espaciadora expuesta por la ranura (132) en la cuarta capa espaciadora (130) forma el fondo (138) de la cámara de detección (132). El extremo proximal (140) de la ranura (132) forma el paso (140) entre la cámara de reacción (124) y la cámara de detección (132). El extremo proximal (134) de la cuarta capa espaciadora (130) forma una porción (134) de la pared lateral de la cámara de reacción (124).

Una quinta capa espaciadora conformada (142), similar en forma a la primera capa espaciadora conformada (112) y a la tercera capa espaciadora conformada (128), es situada encima de la tercera capa espaciadora (128). Una sexta capa espaciadora conformada (144), similar en forma a la segunda capa espaciadora conformada (114), es colocada encima de la cuarta capa espaciadora conformada (130), con los extremos proximales (146), (122) alineados. La porción (170) de la sexta capa espaciadora expuesta por la ranura (132) en la cuarta capa espaciadora (130) forma la parte superior (170) de la cámara de detección (132). Una abertura (148) se extiende a través de la sexta capa espaciadora conformada (144). El extremo distal (150) de la abertura (148) y el extremo distal (152) de la ranura (132) están alineados. La abertura (148) forma una porción (150) de una pared lateral de un orificio de aireación (154), permitiendo el desplazamiento del aire desde la cámara de detección (132) cuando ésta se llena con la muestra. Una capa superior (156) es situada sobre la quinta capa espaciadora (142) y la sexta capa espaciadora (144). La capa superior (156) incluye también una abertura (158) de tamaño y forma similares, y alineada con la abertura (148) en la sexta capa espaciadora (144).

En ciertas realizaciones puede ser preferido el retrasar el llenado de la cámara de detección (132) hasta algún tiempo después de que la muestra haya llenado la cámara de reacción (124), con el fin de permitir que pase el tiempo suficiente para que tengan lugar las inmunoreacciones en la cámara de reacción

(124). En estas realizaciones esto se consigue creando un agujero de aireación (158) en la capa (116) y/o en la (156) después de que terminen las inmunoreacciones. Cuando la cámara de reacción (124) se llena con la muestra, el aire es atrapado en la cámara de detección (132), lo cual evita que ésta se llene con la muestra. Un tiempo adecuado después de que la muestra haya llenado la cámara de reacción (124), al menos una de las capas, la capa superior (156) o la capa inferior (116), puede ser perforada por encima del agujero de aireación (148) o por debajo del agujero de aireación (154) por medio de un dispositivo adecuado, como una aguja o cuchilla. Cuando esto tiene lugar, el aire de la cámara de detección (132) puede ser expulsado a través del agujero (148), o del agujero (154), creado en la capa (116) y/o en la (156), a través de la abertura (148) o (154), permitiendo de esta manera que la muestra pase a la cámara de detección (132) desde la cámara de reacción (124) por acción capilar, y que el aire desplazado sea expulsado.

La altura de la cámara de detección (132) es seleccionada usualmente para que sea menor que la altura de la cámara de reacción (124), de tal forma que, en combinación con las energías de superficie de las caras de las cámaras (132) y (124), la fuerza de capilaridad en la cámara de detección (132) sea mayor que la de la cámara de reacción (124). La mayor fuerza de capilaridad en la cámara de detección (132) sirve para atraer a la muestra hacia la cámara de detección (132) al tiempo que se vacía la cámara de reacción (124). Este método de utilización de los diferenciales en la fuerza de capilaridad para llenar una cámara es descrito en detalle en la Solicitud conexa nº 09/536.234, archivada el 27 de marzo de 2000.

En realizaciones preferidas la altura de la cámara de reacción es usualmente mayor que la altura de la cámara de detección. La altura de la cámara de detección es usualmente de alrededor de 500 micrones o menos, preferiblemente de alrededor de 450, 400, 350, 300, 250 micrones o menos y, más preferiblemente, desde alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 micrones hasta alrededor de 75, 100, 125, 150, 175 o 200 micrones. Estas alturas de la cámara de detección se adecuan particularmente bien a las aplicaciones en donde las paredes superior e inferior de la cámara de detección comprenden capas de electrodos. Sin embargo, pueden existir ciertas realizaciones en donde se emplee detección electroquímica en donde sean preferidas alturas de célula superiores a alrededor de 500 micrones. Estas alturas de cámara de detección pueden ser adecuadas también cuando sean empleados métodos de detección diferentes de la detección electroquímica. Cuando es utilizado otro método de detección, por ejemplo, un método de detección óptico, pueden ser preferidas distintas alturas de célula. En tales realizaciones puede ser preferida una altura de célula de alrededor de 600, 700, 800 o 900 micrones, o más, o incluso alrededor de 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 mm o más. La altura de la cámara de reacción es usualmente mayor que la de la cámara de detección. Sin embargo, en ciertas realizaciones puede ser preferido el utilizar una cámara de reacción que tenga la misma altura, o una similar, que la cámara de detección, o incluso una altura inferior que la cámara de detección. La altura de la cámara de detección es usualmente desde alrededor de 5 micrones, o menos, hasta alrededor de 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 mm, o más, preferiblemente alrede-

dor de 900, 800, 700, 600 o 500 micrones, o menos, más preferiblemente alrededor de 450, 400, 350, 300 o 250 micrones, o menos y, más preferiblemente, desde alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 micrones hasta alrededor de 75, 100, 125, 150, 175, 200 o 250 micrones.

Cuando el inmunosensor (100) es un sensor electroquímico (100), la superficie superior de la segunda capa espaciadora (138) y la superficie inferior (160) de la sexta capa espaciadora (144), las cuales se encuentran expuestas a través de la ranura (132) en la cuarta capa espaciadora (130), pueden estar parcial o completamente recubiertas con un material conductor. Alternativamente, las capas (114) y (144) pueden ellas mismas estar realizadas en materiales eléctricamente conductores. La conexión eléctrica entre las dos capas conductoras (no ilustradas) y un contador (no ilustrado) permiten que sean realizadas mediciones electroquímicas dentro de la cámara de detección.

#### *Métodos de Fabricación*

Los detalles de la fabricación de sensores de las realizaciones preferidas, en relación con el sensor representado en las Figuras 3 y 4, son expuestos a efectos ilustrativos. La tira sensor (100) es construida usualmente en capas de material laminado junto. Son utilizadas una o más capas espaciadoras (128), (130) para espaciar las capas (112) y (114) de las capas (142) y (144). Las capas espaciadoras poseen caras adhesivas con el fin de permitir que las capas (112), (128) y (142) y las capas (114), (130) y (144) se mantengan juntas. Alternativamente, las mismas capas espaciadoras pueden consistir en un adhesivo, o pueden comprender un material capaz de adherirse a capas adyacentes por medio de la aplicación de calor y/o presión en un método de laminado.

La cámara de detección (132) es un espacio capilar, donde las capas (114) y (144) forman las paredes del extremo del espacio y el grosor de las capas (128), (130) define la altura. Las capas (114) y (144) pueden servir también como sustratos para los recubrimientos de electrodos (no ilustrados) que forman los electrodos de una célula electroquímica, o pueden actuar como los mismos electrodos por ser construidas en materiales eléctricamente conductores. En cuanto a su construcción, la cámara de detección (132) es formada usualmente al perforar, o eliminar, una porción de la capa (130). Esta porción perforada de la capa (130) puede servir también para definir el área de electrodos de la célula electroquímica.

La cámara de reacción (124) puede ser creada al perforar, o eliminar, una porción de las capas espaciadoras, con las áreas eliminadas situadas de tal modo que la cámara de reacción solapa a la cámara de detección (132), haciendo de esta forma que la cámara de detección (132) se abra a la cámara de reacción (124). Las capas (116) y (156) pueden ser laminadas entonces en la cara externa de las capas (112), (114) y de las capas (142), (144), respectivamente, para formar las paredes del extremo (126), (174) de la cámara de reacción (124). Las sustancias inmunoquímicas (164) y (162) pueden recubrir una cara interna (126) y/o (174) de las capas (116) y/o (156) antes del laminado, o después del mismo, de (116) y (156) sobre las capas (112), (114) y sobre las capas (142), (144), respectivamente. Las capas (116) y (156) pueden ser adheridas a las capas (112), (114) y a las capas (142), (144), respectivamente, por medio de una capa adhesiva sobre la cara externa de las capas (112), (114) y

de las capas (142), (144), respectivamente, o sobre la cara interna de las capas (116) y (156).

El orificio de aireación (148) y/o (154) puede ser creado de forma ventajosa al perforar un agujero a través de las capas (114), (130) y (144). Desde el punto de vista de la simplificación del proceso de fabricación de la tira, es particularmente ventajoso el crear el orificio de aireación (148) y/o (154) al mismo tiempo que son creadas la porción eliminada para la cámara de reacción (124) y/o para la cámara de detección (132), ya que esto hace más fácil de conseguir una relación espacial reproducible entre la cámara(s) y el orificio de aireación, y reduce también el número de fases en el proceso.

En una realización diferente, el orificio de aireación (148), (154), (158) puede ser creado al perforar a través de las capas (114), (116), (130), (144) y (156), y capas adicionales adhesivas (no ilustradas) laminadas sobre ambos extremos del agujero así formado. Esto posee la ventaja de permitir la optimización de las propiedades de las capas (116) y (156) y de las capas adhesivas (no ilustradas) que cubren el orificio de aireación, por separado. Alternativamente, el orificio de aireación (148), (154), (158) puede ser creado perforando las capas (114), (130), (144) y (116) o (156) antes del laminado de las capas (116) o (156), respectivamente. Esto deja una abertura de (158) en una única cara de la tira (100) y, de esta forma, es utilizada únicamente una capa adhesiva de cobertura.

En una realización adicional las capas (116) y (156) pueden ser formadas y laminadas sobre las capas (114) y (144), de tal forma que las capas (116) y (156) no se extienden para cubrir el área donde es creado el orificio de aireación (158). Entonces, únicamente es necesario perforar a través de las capas (114), (130) y (144) para crear el orificio de aireación (148), (154), (158), y de las capas adhesivas adicionales (no ilustradas) laminadas sobre ambos extremos del agujero así formado.

Las capas pueden ser adheridas entre sí por medio de cualquier método adecuado, por ejemplo, adhesivo sensible a la presión, adhesivos curables, adhesivos de fusión en caliente, laminado por aplicación de calor y/o presión, sujeciones mecánicas y similares.

Las configuraciones para el sensor anteriormente descritas son solamente dos de las muchas posibles configuraciones para el sensor, conforme será apreciado por un experto en este campo. Por ejemplo, el orificio de aireación puede ser proporcionado a través de la parte superior de la tira, de la parte inferior de la tira, tanto de la parte superior como de la parte inferior de la tira, o a través de uno o más lados de la tira. El orificio de aireación puede tener cualquier tipo de configuración adecuada, y puede extenderse directamente hasta una porción de la cámara de detección, o puede seguir una trayectoria indirecta hasta la cámara de detección. La cámara de detección puede presentar cualquier forma adecuada, por ejemplo, rectangular, cuadrada, circular o irregular. La cámara de detección puede lindar con la cámara de reacción, o puede ser proporcionado un paso separado para la muestra entre la cámara de reacción y la cámara de detección. La muestra puede ser admitida a la cámara de reacción por cualquier lado de la tira, como en el sensor de las Figuras 4 y 3, o únicamente a través de un lado de la tira, con la cara opuesta bloqueada por un espaciador, como en las Figuras 1 y 2. La cámara de detección puede presentar cualquier forma adecuada,

por ejemplo, rectangular, cuadrada, circular o irregular. La cámara de detección puede encontrarse dentro del cuerpo de la tira, y el acceso a la cámara de detección puede ser proporcionado a través de una o más entradas de la muestra por la parte superior, por la parte inferior o por los laterales de la tira. Usualmente es seleccionada una configuración determinada, de tal modo que el método de fabricación pueda simplificarse, e.g., al realizar menos fases o utilizando menos componentes.

#### *Detección Electroquímica*

Cuando el sensor es una célula electroquímica las capas de electrodos, por ejemplo las capas (52) y (54) del sensor de las Figuras 1 y 2, son proporcionadas con un conector eléctrico que permite al sensor (20) ser colocado en un circuito de medición. Al menos uno de los electrodos (52) o (54) en la célula (28) es un electrodo sensor, i.e., un electrodo sensible a la cantidad de forma oxidada o reducida de un analito en la muestra. En el caso de un sensor potenciométrico (20), en donde el potencial del electrodo sensor (52) o (54) es indicativo del nivel de analito presente, se encuentra presente un segundo electrodo (54) o (52) actuando como electrodo de referencia, el cual actúa para proporcionar un potencial de referencia. En el caso de un sensor amperométrico (20), en donde el actual electrodo sensor es indicativo del nivel de analito en la muestra, se encuentra presente al menos uno de los otros electrodos (54) o (52), el cual funciona como un electrodo contador con el fin de completar el circuito eléctrico. Este segundo electrodo (54) o (52) puede funcionar también como un electrodo de referencia. Alternativamente, un electrodo por separado (no mostrado) puede realizar la función de un electrodo de referencia.

Si el inmunosensor (20) es operado como una célula electroquímica (28), entonces la hoja (36), conteniendo las aberturas definiendo la cámara de reacción (22) y/o la cámara de detección (28), comprende un material eléctricamente resistente. En una realización preferida las hojas (32) y (34) comprenden también un material eléctricamente resistente. Los materiales eléctricamente resistentes adecuados incluyen, por ejemplo, los poliésteres, los poliestirenos, los policarbonatos, las poliolefinas, mezclas de los mismos y similares. El poliéster preferido es el tereftalato de polietileno. En el sensor representado en las Figuras 1 y 2 las capas (32) y (34) son sustratos recubiertos con material eléctricamente conductor (52) y (54). El material eléctricamente conductor (52) y (54) recubre la superficie (60) o (62) que da a la cámara de detección (28), y una capa adhesiva (no mostrada) recubre la superficie (33) o (35) que da a la capa (42) o (46), respectivamente.

En la realización representada en las Figuras 3 y 4 la cámara de detección (132) tiene recubrimientos eléctricamente conductores (no ilustrados) sobre la cara interna de (138) y (170), los cuales son adecuados para su utilización como electrodos en una célula sensora electroquímica. También contenida dentro de la cámara de detección (132) se encuentra una capa de reactivo seco (172) comprendiendo un sustrato para la enzima sonda y, si es necesario, una especie redox capaz de ciclar la enzima entre sus formas oxidada y reducida, y capaz de ser oxidada y reducida en los electrodos de la célula. Puede encontrarse también presente un tampón, con el fin de controlar el pH en la cámara de detección (132). Cuando el inmunosen-

sor se encuentra en uso, los electrodos están conectados a un dispositivo contador electrónico externo (no ilustrado) a través de conectores externos (no ilustrados), por ejemplo, conectores macho con lengüeta, conforme son conocidos en este campo. Los conectores adecuados son indicados en la Solicitud conexa nº 09/399.512, archivada el 20 de septiembre de 1999, y la Solicitud conexa nº 60/345.743, archivada el 4 de enero de 2002.

Si el inmunosensor (20), (100) es operado utilizando un método de detección distinto del método de detección electroquímico, entonces no es necesario que los materiales con los que es construido el sensor sean resistentes a la electricidad. Sin embargo, los materiales poliméricos descritos con anterioridad son los preferidos para su uso en la construcción de los inmunosensores de las realizaciones preferidas, debido a su facilidad de procesamiento, bajo coste y falta de reactividad a los reactivos y muestras.

#### *Detección Óptica*

En una realización alternativa es utilizado un sistema de detección óptico en lugar de uno electroquímico. Conforme a esta realización alternativa, no son necesarios los electrodos y son utilizadas una fuente de luz externa y una fotocélula para analizar la luz transmitida a través de la solución, o reflejada por la misma, en la cámara de detección. En una realización se prefiere emitir la luz a través de la superficie superior del sensor, después a través de la muestra, donde es reflejada en la capa inferior del sensor y, a continuación, de vuelta a través de la muestra y de la capa superior, donde es detectada. En otra realización la luz es emitida a través del lateral de la cámara de detección y es reflejada internamente en su totalidad entre las caras del extremo de la cámara de detección hasta que ésta pasa a través del otro lado de la cámara de detección, donde es detectada. En estas realizaciones las capas por encima, por el lateral y/o por debajo de la cámara de detección son sustancialmente transparentes a la luz que se analiza, que es pasada a través de la capa o capas. Las técnicas descritas en la Solicitud conexa nº 09/404.119, archivada el 23 de septiembre de 1999, pueden ser adaptadas para su uso con los inmunosensores de las realizaciones preferidas, utilizando sistemas de detección óptica. Alternativamente, en ciertas realizaciones puede ser preferida la utilización de una combinación de métodos de detección electroquímica y de detección óptica, lo cual es descrito también en la Solicitud nº 09/404.119.

#### *Reactivos y Otros Materiales presentes en el Inmunosensor*

Los reactivos para su utilización en la cámara de reacción, e.g., anticuerpo inmovilizado, pseudo antígeno-sonda, tampón, mediador y similares pueden ser soportados sobre las paredes de la cámara de reacción, o sobre las paredes de la cámara de detección, sobre un soporte independiente dentro de las cámaras, dentro de una matriz, o pueden soportarse a sí mismos. Si los reactivos han de ser soportados sobre las paredes de la cámara o los electrodos, las sustancias químicas pueden ser aplicadas utilizando técnicas de impresión de sobra conocidas en este campo, e.g., impresión por inyección de tinta, impresión por serigrafía, recubrimiento de ranura, litografía y similares. En una realización preferida es aplicada a una superficie dentro de una cámara una solución conteniendo el reactivo, y se deja que seque.

En lugar de inmovilizar o secar los reactivos u otras sustancias químicas sobre las superficies de la cámara de reacción o de la cámara de detección, podría ser ventajoso colocarlos sobre uno o más soportes independientes, o meterlos dentro de los mimos, siendo introducidos éstos a continuación dentro de una cámara. Soportes independientes adecuados incluyen, aunque sin estar limitados a los mismos, materiales reticulados, materiales de lámina no tejida, materiales de relleno fibrosos, membranas macroporosas, polvos sinterizados, geles o perlas. Las ventajas de los soportes independientes incluyen un aumento en el área de la superficie, permitiendo de esta manera que, si así se desea, sea introducida en la cámara de reacción más cantidad de anticuerpo y de pseudo antígeno-sonda. En una realización de este tipo el anticuerpo unido al pseudo antígeno-sonda es secado sobre un trozo de material poroso, el cual es colocado a continuación en la cámara de reacción. Es más sencillo también durante la fabricación el lavar la proteína no unida de los soportes independientes, tales como perlas, en comparación a lavar la proteína no unida de la superficie de la cámara de reacción.

En una realización especialmente preferida el anticuerpo unido al pseudo antígeno-sonda es soportado sobre perlas. Tales perlas pueden comprender un material polimérico, e.g., látex o agarosa, encerrando opcionalmente un material magnético (como gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). El material de la perla es seleccionado de tal modo que es proporcionado un soporte adecuado para el anticuerpo. Las perlas adecuadas pueden incluir aquéllas comercializadas como DYNABEADS<sup>®</sup> por Dynal Biotech de Oslo, Noruega. Opcionalmente, puede ser incluido un imán en el contador para mantener las perlas magnéticas en la cámara de reacción y para evitar que se muevan hacia la cámara de detección.

En otra realización más las paredes de la cámara de reacción son porosas, con el anticuerpo unido al pseudo antígeno-sonda incorporado a los poros. En esta realización la muestra de líquido es capaz de empujar la pared porosa, pero no de escaparse del área definida. Esto se consigue utilizando una membrana macroporosa que forme la pared de la cámara de reacción y comprimiendo la membrana alrededor de la cámara de reacción para evitar el escape de la muestra fuera del área deseada, conforme es descrito en la Patente US nº 5.980.709 de Hodges *et al.*

Soportes independientes adecuados tales como perlas, materiales reticulados, materiales de lámina no tejida y materiales de relleno fibrosos incluyen las poliolefinas, los poliésteres, los nylons, la celulosa, los poliestirenos, los policarbonatos, las polisulfonas, mezclas de los mismos y similares. Las membranas macroporosas adecuadas pueden ser preparadas en materiales poliméricos, incluyendo las polisulfonas, los difluoruros de polivinilideno, los nylons, los acetatos de celulosa, los polimetacrilatos, los poliácridatos, mezclas de los mismos y similares.

El anticuerpo unido al pseudo antígeno-sonda puede estar dentro de una matriz, e.g., acetato de polivinilo. Variando las características de solubilidad de la matriz en la muestra puede ser conseguida la liberación controlada de la proteína o del anticuerpo en la muestra.

Conforme es ilustrado en la Figura 2 los reactivos secados (64) pueden ser colocados opcionalmente en

la cámara de detección (28). Estos reactivos pueden incluir un sustrato enzimático (utilizado como una sonda) y un mediador, capaz de reaccionar con la parte de la enzima en el pseudo antígeno-sonda enzimática (50) para producir una señal detectable. El sustrato enzimático y el mediador, si se encuentran presentes, tienen que estarlo en una cantidad suficiente como para que la velocidad de reacción de cualquier enzima presente con el sustrato enzimático (64) sea determinada por la cantidad de enzima presente. Por ejemplo, si la enzima es glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa, es dispuesto dentro de la cámara de detección (28) un mediador enzimático (64) adecuado y glucosa (si no se encuentra ya presente en la muestra).

En una realización en donde es utilizado un sistema de detección electroquímico la ferricianida es un mediador adecuado. Otros mediadores adecuados incluyen el diclorofenolindofenol y complejos entre metales de transición y especies heteroatómicas conteniendo nitrógeno. Si fuera necesario puede ser incluido también tampón para ajustar el pH de la muestra en la cámara de detección (28). La glucosa, el mediador y los reactivos tampón (64) se encuentran presentes en cantidades suficientes como para que la velocidad de reacción de la enzima con el sustrato enzimático (64) se vea limitada por la concentración de la enzima presente.

La superficie interna (40) del sustrato (42), la cual forma la base de la cámara de reacción (22), es recubierta con pseudo antígeno-sonda (50) unido a anticuerpos (44) para el antígeno a ser detectado en la muestra. Los anticuerpos (44) son adsorbidos, o inmovilizados, sobre la superficie (40) del sustrato (42), de tal modo que no son separados del sustrato (42) durante una prueba. Opcionalmente, durante la aplicación de los anticuerpos (44) a la superficie interna (40) del sustrato (42), o de después de la misma, puede ser aplicado un agente diseñado para evitar la unión no específica de proteínas a esta superficie (no mostrado). Un ejemplo de un agente de este tipo, de sobra conocido en este campo, es la albúmina sérica bovina (BSA). Puede ser utilizado también un surfactante no iónico como un agente de este tipo, e.g., el surfactante TRITON® X100, fabricado por Rohm & Haas de Philadelphia, Pennsylvania, o los surfactantes TWEEN®, fabricados por ICI Americas de Wilmington, Delaware. Los surfactantes no iónicos seleccionados no desnaturalizan las proteínas. El recubrimiento (44) sobre la superficie interna (40) del sustrato (42) se encuentra en estado seco cuando está listo para ser utilizado en una prueba.

En realizaciones preferidas en donde es utilizada la detección electroquímica, pueden ser utilizadas enzimas como la sonda. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero sin estar limitadas a las mismas, la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa y la glucosa deshidrogenasa, por ejemplo, la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ o la glucosa deshidrogenasa dependiente de NAD.

La sonda puede ser también un cofactor enzimático. Ejemplos de cofactores adecuados incluyen, pero sin estar limitados a los mismos, la flavina mononucleótida, la flavina-adenina-dinucleótida, la nicotinamida adenina dinucleótida y la pirroloquinolina quinona. El cofactor está ligado preferentemente al antígeno por medio de un espaciador flexible, con el fin de permitir que el cofactor se una a la apoenzima. Cuando la sonda es un cofactor la apoenzima puede ser op-

cionalmente secada junto con el sustrato enzimático y el mediador en la cámara de reacción.

La sonda puede ser también un regulador de la actividad enzimática. Ejemplos de reguladores enzimáticos adecuados incluyen, aunque sin estar limitados a los mismos, las quinasas o las fosforilasas. Los reguladores enzimáticos pueden alterar la actividad de la enzima al cambiar el estado de fosforilación, metilación, adenilación, uridilación o adenosin difosforilación de la enzima. Los reguladores enzimáticos pueden alterar también la actividad de la enzima al clivar un péptido de la enzima. Cuando la sonda es un regulador enzimático la enzima es secada junto con el sustrato enzimático y el mediador en la cámara de reacción.

La sonda puede ser una subunidad proteica, la cual es una parte de un complejo de multi-subunidades. Un ejemplo de una subunidad proteica de este tipo es una de las subunidades en la multi-subunidad enzimática citocromo oxidasa.

El anticuerpo y el pseudo antígeno-sonda pueden ser conjugados antes de ser secados en la cámara de reacción. Las condiciones para formar el complejo son escogidas para minimizar la cantidad de pseudo antígeno-sonda libre (sin formar complejo), ya que esta especie incrementará la señal de fondo en el ensayo. La cantidad de anticuerpo libre es minimizada también, ya que esta especie se unirá al antígeno y evitará que éste desplace al pseudo antígeno-sonda, reduciendo de esta forma la sensibilidad del ensayo. Por ejemplo, es posible el optimizar la formación de complejos de los pseudo antígenos-sondas con anticuerpos al "poblar" las soluciones con macromoléculas inertes, como el polietileno glicol, las cuales restan volumen a las proteínas y, de esta manera, elevan su actividad termodinámica y mejoran la afinidad de unión entre ellas. Ver, e.g., Minton, *Biopolymers*, Vol. 20, pag. 2093-2120 (1981).

Es beneficioso el mantener al anticuerpo inmovilizado en perlas antes de que se forme el complejo con el pseudo antígeno-sonda. Esto permite que todos los sitios de unión a anticuerpo sean ocupados, exponiéndolos a una alta concentración del pseudo antígeno-sonda. A continuación, el exceso de pseudo antígeno-sonda es eliminado fácilmente por medio del centrifugado y lavado de las perlas.

El inmunosensor es más sensible a concentraciones de antígeno desde alrededor de 1 nM a alrededor de 10  $\mu$ M (micromolar). Para un antígeno con una masa molar relativa de 100.000 esto corresponde a desde alrededor de 0,1  $\mu$ g/mL (microgramos/mL) hasta alrededor de 1000  $\mu$ g/mL (microgramos/mL). Sin embargo, el sensor puede ser modificado (e.g., cambiando la separación entre los electrodos, o aplicando un patrón diferente de pulsos de voltaje) para analizar las concentraciones de antígeno en el rango de desde 0,1 nM, o menos, hasta 0,1 mM, o más.

El límite máximo detectable del ensayo es determinado por la concentración de pseudo antígeno-sonda/anticuerpo en la cámara de reacción. Por lo tanto, esta concentración molar es fijada para que corresponda con el rango esperado de concentraciones molares de antígeno que son encontradas usualmente en las muestras de interés. Por ejemplo, la concentración de proteína C reactiva encontradas en un laboratorio patológico normal es desde alrededor de 10 nM hasta alrededor de 10  $\mu$ M (micromolar).

Ejemplos de antígenos que pueden ser sometidos a

ensayo incluyen, aunque sin estar limitados a los mismos, la alfa-fetoproteína, el antígeno carcinoembrionario, la proteína C reactiva, el troponin I cardíaco, el troponin T cardíaco, la digoxina, la ferritina, la gamma glutamil transferasa, la hemoglobina glicada, la proteína glicada, la hepatitis A, B y C, la gonadotropina coriónica, el virus de inmunodeficiencia humano, la insulina, el suero amiloide A, la tromblastina, el antígeno específico de la próstata, la protrombina, la tiroxina, el antígeno tumoral CA125, el antígeno tumoral CA15-3, el antígeno tumoral CA27/29, el antígeno tumoral CA19-9 y el antígeno tumoral NMP22.

Los sensores de las realizaciones preferidas no se encuentran limitados al ensayo con antígenos humanos, sino que son adecuados también para su utilización en aplicaciones veterinarias y de agricultura animal. También, si un antígeno es demasiado pequeño para ser inmunogénico, entonces éste puede ser unido a un portador, como un hapteno, y de esta forma pueden ser estimulados los anticuerpos para el mismo. Por lo tanto, la invención no está limitada al ensayo de antígenos de proteínas o a grandes moléculas, sino que es aplicable también a pequeños antígenos.

Los anticuerpos adecuados para su utilización en los sensores de las realizaciones preferidas incluyen, aunque sin estar limitados a los mismos, los anticuerpos naturales, tales como IgG, IgM e IgA. Los anticuerpos adecuados pueden ser preparados también a partir de fragmentos de anticuerpos naturales, tales como F(ab)<sub>2</sub> o Fab. El anticuerpo puede ser preparado con fragmentos sintéticos, o fabricados genéticamente, de anticuerpos naturales, tales como especies scFv (fragmentos variables de cadena sencilla).

Los anticuerpos pueden ser conjugados con sondas de antígeno nativo o con sondas de "pseud antígeno". Ejemplos de pseudo antígenos incluyen a antígenos procedentes de otras especies. Por ejemplo, si ha de ser sometida a ensayo la proteína C reactiva humana, entonces el pseudo antígeno puede incluir proteína C reactiva canina, felina, equina, bovina, ovina, porcina o aviar. Los pseudo antígenos pueden ser creados también al modificar el antígeno nativo. Por ejemplo, si ha de ser sometida a ensayo la proteína C reactiva humana, entonces el pseudo antígeno puede incluir una forma monomérica del pentámero nativo, o proteína C reactiva a la cual le hayan sido modificados químicamente sus grupos amina, carboxilo, hidroxilo, tiol o disulfuro.

*Utilizando el Sensor para determinar la presencia o ausencia de un Antígeno*

El sensor puede ser utilizado para determinar la presencia o ausencia de un antígeno en una muestra como sigue. Refiriéndonos a las Figuras 3 y 4, el sensor tira (100) contiene una cámara de reacción (124) y una cámara de detección (132). La muestra es introducida en la cámara de reacción (124) a través de un puerto (166) o (168). La separación entre las capas (116) y (156) y la energía de superficie de sus superficies internas es tal, que la muestra será atraída hacia la cámara de reacción (124) por acción capilar. La cámara de reacción (124) contiene anticuerpos (164) inmovilizados en una cara interna (126) de la cámara de reacción (124). Los complejos de pseudo antígeno-sonda (162) son unidos a los anticuerpos (164) de tal modo que sustancialmente todos los sitios de reconocimiento de anticuerpos para el antígeno son bloqueados por el pseudo antígeno-sonda (162). En esta realización la sonda es una enzima.

En la Figura 4 el anticuerpo es mostrado recubriendo únicamente una cara (126) de la cámara de reacción (124), pero éste puede recubrir ventajosamente más de una cara (126) de la cámara de reacción (124), o recubrir un soporte aparte (no ilustrado) que se encuentre dentro de la cámara de reacción (124). Sin embargo, a efectos de facilidad de fabricación, se prefiere que los anticuerpos (164) recubran únicamente una parte de la cámara de reacción (124), o un único material soporte. Cuando es utilizado para inmovilizar los anticuerpos (164) un soporte por separado, el soporte es tal que no entra en la cámara de detección (132) durante la prueba. Esto puede ser conseguido, por ejemplo, al adherir el soporte a, al menos, una cara (126) de la cámara de reacción (124), o seleccionando el tamaño o forma del soporte para que éste no pueda entrar a través del paso de la muestra (134) hasta la cámara de detección (132), o seleccionando un soporte con una densidad suficiente como para que permanezca sobre la cara inferior (126) de la cámara de reacción (124) cuando la muestra es transferida a la cámara de detección (132).

Cuando la muestra llena la cámara de reacción (124), el pseudo antígeno-sonda enzimática (162) unido al anticuerpo (164) se pone en contacto con la muestra y una pequeña fracción del pseudo antígeno-sonda se separa del anticuerpo (164) y queda en la muestra. A continuación se permite que pase el tiempo suficiente para que se establezca el equilibrio dinámico entre el pseudo antígeno-sonda enzimática (162) unido y el no unido. Si se encuentra antígeno presente en la muestra, el antígeno -el cual se une con mayor fuerza al anticuerpo (164) que el pseudo antígeno-sonda enzimática (162)- desplaza finalmente al pseudo antígeno-sonda enzimática (162). De esta manera, cada antígeno que se une a un anticuerpo inmovilizado (164) desplazará un pseudo antígeno-sonda enzimática (162) a la solución.

El fin de la fase de reacción es un tiempo predeterminado después de que la muestra es introducida en la cámara de reacción (124). El tiempo predeterminado es fijado de tal modo que haya tiempo suficiente para que sustancialmente todo el antígeno en la muestra desplace al pseudo antígeno-sonda enzimática (162) para unirse con el anticuerpo (164). Alternativamente, el tiempo predeterminado puede ser fijado de forma que una fracción conocida del antígeno desplace al pseudo antígeno-sonda (162) para unirse al anticuerpo (164).

El tiempo en que la muestra es introducida en la cámara de reacción (124) puede ser indicado por el usuario, por ejemplo, pulsando un botón en un contador (no ilustrado) conectado al sensor (100). Esta acción es utilizada para encender un dispositivo de sincronización (no ilustrado). En el caso de detección visual no es necesario un dispositivo contador. En una realización de este tipo el usuario mide el tiempo del período de reacción manualmente.

En el caso en donde es utilizada detección electroquímica para detectar el resultado de las inmunorreacciones, la indicación de que la muestra ha sido introducida en la cámara de reacción (124) puede ser automatizada. Conforme es descrito más arriba, cuando la muestra llena la cámara de reacción (124) una pequeña parte de la cámara de detección (132) en su abertura (140) hacia la cámara de reacción (124) será mojada por la muestra. Si es empleada detección electroquímica, entonces al menos dos electrodos (no

ilustrados) se encuentran presentes en la cámara de detección (132). Si estos electrodos (no ilustrados) son colocados en la cámara de detección (134) de tal modo que al menos una parte de cada electrodo (no ilustrado) es contactada por la muestra durante el llenado de la cámara de reacción (124), la presencia de la muestra hará de puente entre los electrodos (no ilustrados) y producirá una señal eléctrica que puede ser utilizada para poner en funcionamiento el dispositivo de sincronización.

Un tiempo predeterminado después de que el dispositivo de sincronización haya sido puesto en funcionamiento, bien por el usuario o automáticamente, la fase de inmunoreacción de la prueba se da por concluida. Cuando la fase de inmunoreacción de la prueba se ha completado es abierto el orificio de aireación (158) hacia la atmósfera. Por ejemplo, puede ser utilizada una aguja activada por solenoide en el contador para perforar la capa (156) y/o la capa (116), o las capas adicionales (114) y (44), abriendo de esta forma el extremo distal (152) de la cámara de detección (132) hacia la atmósfera. La perforación puede ser llevada a cabo automáticamente por el contador, como en el anterior ejemplo, o manualmente por el usuario en el caso de detección visual, en donde no hace falta el uso de contador, e.g., el usuario inserta una aguja a través de las capas (156), (116), (114) y/o (144) en la cámara de detección, creando de esta manera el orificio de aireación (158).

La abertura del orificio de aireación (158) a la atmósfera permite que el aire atrapado en la cámara de detección (132) escape, permitiendo de esta forma que la cámara de detección (132) se llene con la muestra reaccionada procedente de la cámara de reacción (124). La muestra reaccionada será atraída hacia la cámara de detección (132) debido al aumento de la fuerza de capilaridad en la cámara de detección (132) en comparación con la presente en la cámara de reacción (124). En una realización preferida el incremento en la fuerza de capilaridad es proporcionado al recu-

brir adecuadamente las superficies (138) y (160) de la cámara de detección (132) o, más preferiblemente, escogiendo que la distancia de capilaridad para la cámara de detección (132) sea inferior a la de la cámara de reacción (124). En esta realización la distancia de capilaridad es definida para que sea la dimensión más pequeña de la cámara.

Cuando la cámara de detección (132) se encuentra llena, los reactivos (172) se disuelven en la muestra. El componente enzimático de la capa reactiva (172) reacciona con el sustrato enzimático y el mediador para producir mediador reducido. Este mediador reducido es oxidado electroquímicamente en un electrodo (no ilustrado), actuando como un ánodo en la cámara de detección (132) para producir una corriente eléctrica. En una realización la velocidad de cambio de esta corriente con el paso del tiempo es utilizada como un indicador de la presencia y cantidad de enzima que se encuentra presente en la muestra reaccionada. Si la velocidad de cambio de la corriente es inferior a un determinado valor umbral (tomando en consideración que algo del pseudo antígeno-sonda enzimática (162) es liberado en la solución como resultado del equilibrio dinámico que es establecido entre el pseudo antígeno-sonda enzimática (162) libre y el unido), entonces ello es indicativo de que no hay presencia de cantidad significativa de pseudo antígeno-sonda enzimática (162) en la muestra reaccionada, indicando la falta de antígeno presente en la muestra original. Si la velocidad de cambio de la corriente es mayor que la velocidad umbral, ello indica que el pseudo antígeno-sonda enzimática (162) se encuentra presente en la muestra reaccionada en una cantidad mayor que la del valor umbral y, de esta forma, el antígeno se encuentra presente también en la muestra inicial. En una realización la velocidad de cambio de la corriente es utilizada para proporcionar una medida de la cantidad relativa de antígeno inicialmente presente en la muestra.

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo desechable para su utilización en la detección de un antígeno diana en una muestra de fluido, comprendiendo el dispositivo una cámara de reacción; un anticuerpo inmovilizado fijado en la cámara de reacción; un complejo reportero comprendiendo una sonda y un antígeno complejo reportero, en donde el antígeno complejo reportero es un antígeno diana, un pseudo antígeno o un antígeno modificado, en donde la sonda es ligada al antígeno complejo reportero, en donde el antígeno complejo reportero es unido al anticuerpo inmovilizado, y en donde el antígeno complejo reportero se une con una fuerza menor que la del antígeno diana al anticuerpo inmovilizado; una cámara de detección; una entrada para la muestra a la cámara de reacción; y un paso para la muestra entre la cámara de reacción y la cámara de detección.

2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la sonda es un radioisótopo, cromóforo, fluoróforo o enzima.

3. El dispositivo de la reivindicación 2, comprendiendo adicionalmente un sustrato enzimático.

4. El dispositivo de la reivindicación 3, en donde el sustrato enzimático es un sustrato oxidable.

5. El dispositivo de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el sustrato enzimático es soportado sobre una superficie interior de la cámara de detección.

6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 5, en donde la enzima comprende una glucosa deshidrogenasa.

7. El dispositivo de la reivindicación 6 cuando depende de cualquiera de las reivindicaciones de la 3 a la 5, en donde el sustrato enzimático comprende glucosa.

8. El dispositivo de la reivindicación 3 o de cualquiera de las reivindicaciones dependientes de la misma, comprendiendo adicionalmente un mediador.

9. El dispositivo de la reivindicación 8, en donde el mediador es el diclorofenolindofenol, un complejo entre un metal de transición y una especie heteroatómica conteniendo nitrógeno, o la ferricianida.

10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, en donde la muestra tiene un pH, y en donde el dispositivo comprende adicionalmente un tampón que ajusta el pH de la muestra.

11. El dispositivo de la reivindicación 10, en donde el tampón comprende un fosfato o un melitato.

12. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11, comprendiendo adicionalmente un estabilizador, en donde el estabilizador estabiliza, al menos, uno de entre: el antígeno diana, el antígeno complejo reportero, la enzima o el anticuerpo inmovilizado.

13. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12, en donde el anticuerpo inmovilizado es soportado sobre una superficie interior de la cámara de reacción.

14. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13, comprendiendo adicionalmente un material soporte.

15. El dispositivo de la reivindicación 14, en donde el material soporte se encuentra dentro de la cámara de detección, y en donde:

bien un sustrato enzimático, un mediador o un tampón;

ó el anticuerpo inmovilizado, el complejo reportero o un agente que evite la unión no específica de

proteínas a una superficie interna de la cámara de reacción

es soportado en el material soporte, o se encuentra dentro del mismo.

16. El dispositivo de la reivindicación 15, en donde el material soporte comprende un material reticulado, un material de relleno fibroso, un material poroso, un polvo sinterizado, una membrana macroporosa o una perla.

17. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16, en donde la cámara de detección comprende un primer electrodo y un segundo electrodo.

18. El dispositivo de la reivindicación 17, en donde, al menos uno de los dos electrodos -el primer electrodo y el segundo electrodo- comprende aluminio, cobre, níquel, cromo, acero, acero inoxidable, paladio, platino, oro, iridio, carbono, carbono mezclado con aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño, un polímero conductor o mezclas de los mismos.

19. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 18, en donde una pared de la cámara de detección es transparente a una radiación emitida o absorbida por la sonda, en donde la radiación es indicativa de la presencia o ausencia del complejo reportero en la cámara de detección.

20. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 19, comprendiendo adicionalmente un detector que detecta un estado en donde la cámara de reacción se encuentra sustancialmente llena.

21. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20, en donde el antígeno diana comprende una proteína C reactiva humana.

22. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 21, en donde el antígeno complejo reportero es una proteína C reactiva monomérica, una proteína C reactiva derivada de una especie no humana o una proteína C reactiva modificada químicamente, en donde una afinidad de la proteína C reactiva modificada químicamente para el anticuerpo es menor que una afinidad de la proteína C reactiva humana para el anticuerpo.

23. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 22, en donde una pared de la cámara de detección, o una pared de la cámara de reacción, comprende adicionalmente un relleno.

24. El dispositivo de la reivindicación 23, en donde el relleno es dióxido de titanio, carbono, sílice, cristal o una mezcla de los mismos.

25. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 24, en donde la sonda comprende un cofactor enzimático.

26. El dispositivo de la reivindicación 25, en donde el cofactor enzimático es la flavina mononucleótida, la flavina-adenina-dinucleótida, la nicotinamida adenina dinucleótida o la pirroloquinolina quinona.

27. El dispositivo de la reivindicación 25 o de la reivindicación 26, en donde el cofactor enzimático se encuentra ligado al antígeno complejo reportero a través de un espaciador flexible.

28. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 25 a la 27, comprendiendo adicionalmente una apoenzima.

29. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 24, en donde la sonda comprende un regulador de la actividad enzimática.

30. El dispositivo de la reivindicación 29, en don-

de el regulador de la actividad enzimática comprende una quinasa o fosforilasa.

31. El dispositivo de la reivindicación 29 o de la reivindicación 30, comprendiendo adicionalmente una enzima.

32. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 24, en donde la sonda comprende una subunidad proteica de una enzima multi-subunitaria.

33. Un método para determinar una cantidad de un antígeno diana en una muestra de fluido, comprendiendo el método las fases de:

colocación de la muestra de fluido en una cámara de reacción conteniendo un anticuerpo inmovilizado y un complejo reportero, comprendiendo una sonda ligada a un antígeno complejo reportero, en donde el anticuerpo es fijado dentro de la cámara de reacción, en donde el antígeno complejo reportero es unido al anticuerpo inmovilizado, y en donde el antígeno complejo reportero se une con una fuerza menor que el antígeno diana al anticuerpo inmovilizado;

disociación de una parte del antígeno complejo reportero del anticuerpo inmovilizado en la muestra de fluido;

unión de una parte del antígeno diana al anticuerpo inmovilizado;

transferencia de la muestra de fluido a una cámara de detección; y

determinación de una cantidad de complejo reportero en la muestra de fluido, en donde la cantidad de complejo reportero es indicativa de la cantidad de antígeno diana inicialmente en la muestra de fluido.

34. El método de la reivindicación 33, en donde la fase de transferencia de la muestra de fluido a una cámara de detección comprende el transferir la muestra de fluido a una célula electroquímica, comprendien-

do la célula electroquímica un primer electrodo y un segundo electrodo.

35. El método de la reivindicación 34, en donde la fase de determinación de una cantidad de complejo reportero en la muestra de fluido comprende:

la aplicación de un potencial entre el primer electrodo y el segundo electrodo; y

la medición de una corriente, en donde la corriente es indicativa de una cantidad de complejo reportero presente en la muestra de fluido, y en donde la cantidad de complejo reportero es indicativa de la cantidad de antígeno diana inicialmente en la muestra de fluido.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 33 a la 35, en donde la fase de transferencia de la muestra de fluido hasta una cámara de detección comprende el transferir la muestra de fluido hasta una cámara de detección comprendiendo una parte transmisora de radiación electromagnética.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la fase de determinación de una cantidad de complejo reportero en la muestra de fluido comprende las fases de:

exposición de la parte transmisora de radiación electromagnética a radiación electromagnética, por lo que la radiación electromagnética pasa a través de la muestra de fluido o es reflejada por la muestra de fluido; y

monitorización de una propiedad de la radiación electromagnética después de que ésta pase a través de la muestra de fluido, o sea reflejada por la muestra de fluido, en donde la propiedad es indicativa de una cantidad de complejo reportero presente en la muestra de fluido, y en donde la cantidad de complejo reportero es indicativa de la cantidad de antígeno diana inicialmente en la muestra de fluido.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

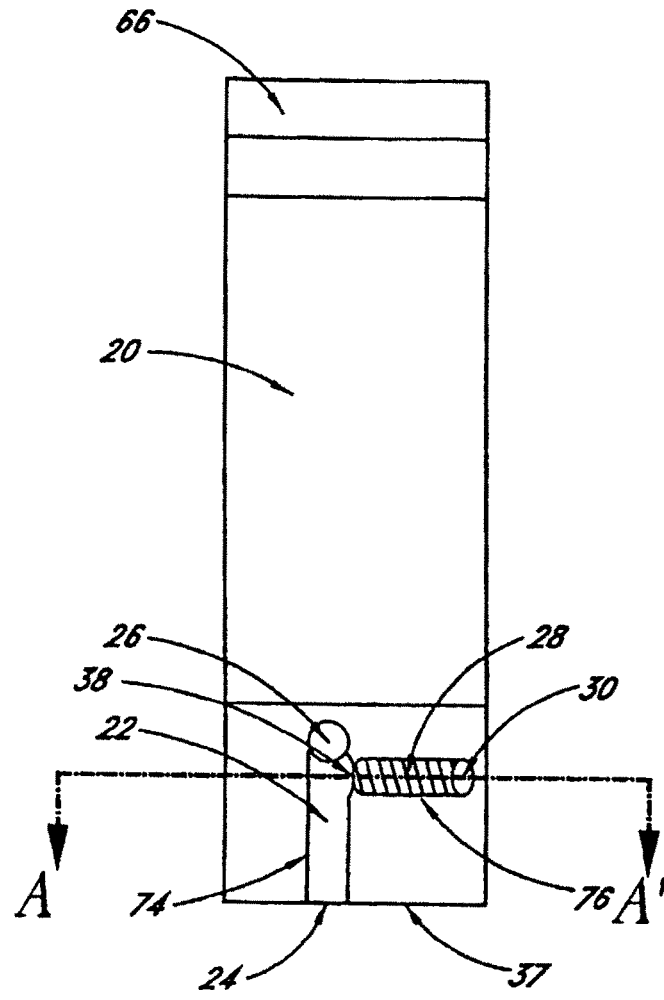


FIG. 1

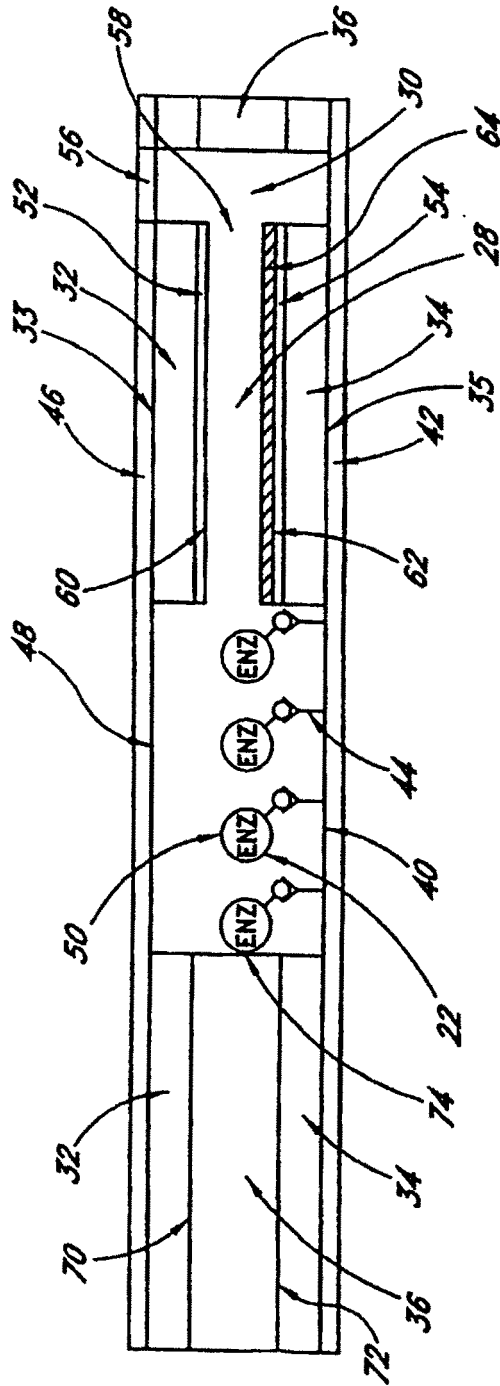


FIG. 2

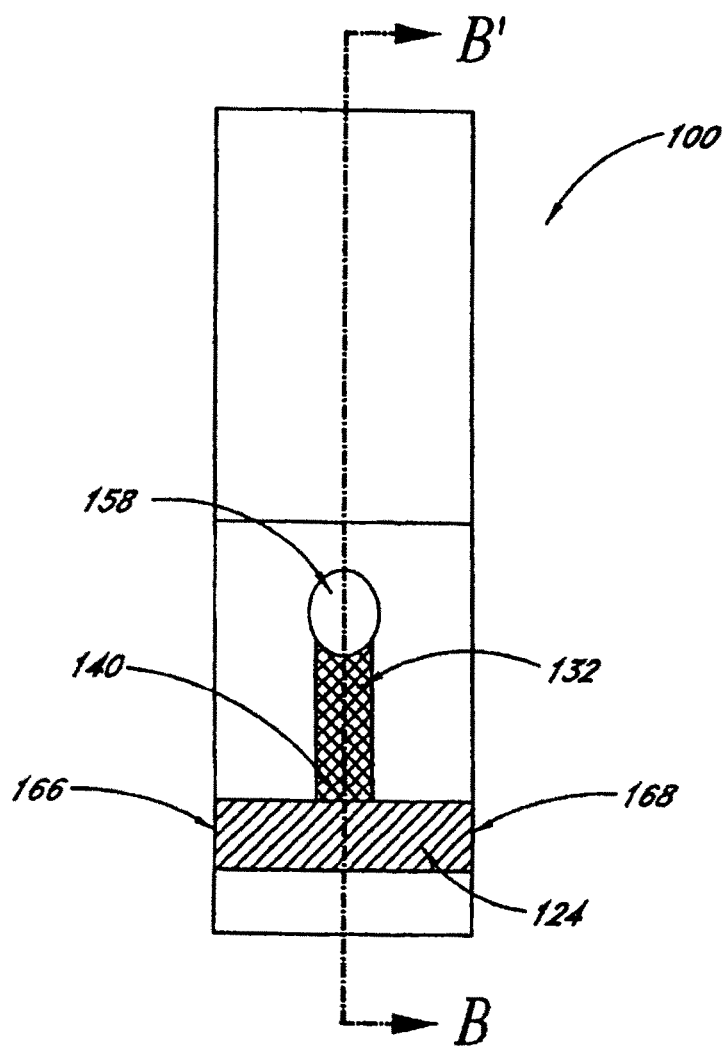


FIG. 3

