



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 169**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06255939 .8**
96 Fecha de presentación : **21.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1788391**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Aparato biosensor y procedimientos de uso.**

30 Prioridad: **21.11.2005 US 284097**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.09.2011

73 Titular/es: **UNIVERSAL BIOSENSORS, Pty. Ltd.**
1 Corporate avenue
Rowville, Vic 3178, AU

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

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 169 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

Aparato biosensor y procedimientos de uso

Antecedentes de la invención

5 Sensores biomédicos convencionales, incluidos sistemas basados en inmunoensayos, se han usado para comunicar la presencia y/o concentración de una amplia variedad de analitos. En general, los inmunoensayos se clasifican en dos categorías: ensayos de competición y ensayos de tipo sándwich. En un ensayo de competición, el antígeno en la muestra de ensayo se mezcla con un complejo antígeno-sonda (normalmente denominado complejo indicador) y, después, la mezcla compete por unirse al anticuerpo. La sonda puede ser un radioisótopo, un fluoróforo o un cromóforo.

10 En un inmunoensayo de tipo sándwich, el antígeno en la muestra de ensayo se une al anticuerpo y, después, un segundo complejo anticuerpo-sonda se une al antígeno. En estos procedimientos de ensayo de la técnica anterior, normalmente se requiere una o más etapas de lavado. Las etapas de lavado introducen complejidad en el procedimiento de ensayo y pueden generar residuos líquidos biopeligrosos.

15 Normalmente, los inmunoensayos proporcionan al usuario un resultado cualitativo (p. ej., una "respuesta sí/no") obtenido, con mayor frecuencia, mediante una simple detección visual (p. ej., un cambio de color) o un resultado cuantitativo, tal como una concentración de un antígeno. La mayoría de los procedimientos cuantitativos implican caras piezas de equipo, tal como contadores de centelleo (para monitorizar la radioactividad), espectrofotómetros, espectrofluorímetros (p. ej., la patente de EE.UU. nº 5.156.972), instrumentos para resonancia en plasmón superficial (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.965.456) y similares. Por tanto, sería ventajoso desarrollar in

20 inmunoensayo que sea barato y lo suficientemente simple de usar como para que sea adecuado para usar en domicilio o en campo. Preferentemente, tal biosensor no requeriría etapas de centrifugación, dilución, pipeteo, lavado o de tiempo, y generaría una cantidad mínima de residuos.

Cada uno de los documentos WO-A-02/08763 y EP-A-1347302 describen dispositivos sensores que emplean reacciones anticuerpo-antígeno y comprenden una cámara de reacción y una cámara de detección.

Sumario de la invención

25 En el presente documento se divulgan dispositivos biosensores y procedimientos para detectar y/o cuantificar un analito de interés. La presente invención proporciona un biosensor para usar en la detección de un analito diana en una muestra de fluido como se ha definido en la reivindicación 1. Cuando una muestra se introduce en la cámara de reacción se produce una reacción de unión entre la diana de unión, la sonda-conjugado y/l el analito diana (si están presentes) inmovilizados. En una realización de ejemplo, si el analito diana está presente produce un cambio en la

30 cantidad de sonda conjugada que está unida al sitio de unión inmovilizado. Este cambio se puede detectar en la cámara de detección.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de un biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en la detección de un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo las etapas de:

proporcionar una primera capa (136);

35 eliminar una sección de la primera capa (136) para formar una parte de cámara de llenado (107), una parte de cámara de reacción (122) y una parte de cámara de detección (128);

proporcionar una segunda capa (134);

Montar un primer lado de la segunda capa (134) a un primer lado de la primera capa (136);

40 Eliminar una sección de la segunda capa (136) que se extiende sobre la parte de la cámara de llenado (107), en registro sustancial con la parte de cámara de llenado (107), extendiéndose además la segunda capa (134) sobre la parte de cámara de reacción (122) y la parte de cámara de detección (128), en el que la parte de cámara de reacción (122) y la parte de cámara de detección (128) están en comunicación fluida con la parte de cámara de llenado (107);

proporcionar una tercera capa (132);

45 montar un primer lado de la tercera capa (132) en un segundo lado de la primera capa (136), extendiéndose la tercera capa (132) sobre la parte de cámara de llenado (107), la parte de cámara de reacción (122) y la parte de cámara de detección (128);

montar un primer lado de la capa de sellado (142) a un segundo lado de la segunda capa (134);

de modo que las capas forman una tira que tiene una pluralidad de superficies exteriores;

formar un paso que se extiende a través de una superficie exterior de la tira hacia el interior de la cámara de detección de modo que forma una ventilación de la cámara de detección (130); y colocar un sitio de unión inmovilizado (44) y la sonda conjugada (50) dentro de la cámara de reacción (122).

5

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de un biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en la detección de un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo las etapas de:

proporcionar una primera capa (36);

eliminar una sección de la primera capa (36) para formar una parte de cámara de llenado (107),

10

una parte de cámara de reacción (22) y una parte de cámara de detección (28);

proporcionar una segunda capa (34);

montar un primer lado de la segunda capa (34) sobre un primer lado de la primera capa (36), extendiéndose la segunda capa (34) sobre la parte de cámara de llenado (107), la parte de cámara de reacción (22) y la parte de cámara de detección (22);

15

proporcionar una tercera capa (32);

montar un primer lado de la tercera capa (32) en un segundo lado de la primera capa (36), extendiéndose la tercera capa (32) sobre la parte de cámara de llenado (107), la

parte de cámara de reacción (22) y la parte de cámara de detección (28);

montar un primer lado de una primera capa de sellado (42) sobre un segundo lado de la segunda capa (34);

20

montar un primer lado de una segunda capa de sellado (46) sobre un segundo lado de la tercera capa (32); de modo que las capas forman una tira que tiene una pluralidad de superficies exteriores;

formar un paso que se extiende a través de una superficie exterior de la tira hacia el interior de la cámara de detección de modo que forma una ventilación de la cámara de detección (30); y colocar un sitio de unión inmovilizado (44) y la sonda conjugada (50) dentro de la cámara de reacción,

25

en el que la altura de la cámara de reacción (22) es mayor que la de la cámara de detección (28), o la cámara de reacción (22) y la cámara de detección (28) tienen igual altura y las superficies de la cámara de reacción (22) y/o la cámara de detección (28) están modificadas, o se añaden materiales de llenado a la cámara de detección (28).

30

En una realización, el sitio de unión inmovilizado incluye un anticuerpo adaptado para unirse a un antígeno diana y la sonda conjugada incluye un anticuerpo adaptado para unirse a un antígeno diana unido. Si hay un antígeno diana en una muestra de fluido, el sitio de unión inmovilizado se puede unir a un sitio sobre el antígeno diana y la sonda conjugada se puede unir a otro sitio sobre el antígeno diana. Por tanto, la presencia de un antígeno diana en la muestra de fluido tiene como resultado un incremento de la cantidad de sonda unida en la cámara de reacción y una reducción en la cantidad de sonda conjugada en la cámara de detección.

35

La diana de unión inmovilizada, la sonda conjugada y el analito diana pueden incluir los diversos ligandos conocidos. Por ejemplo, un experto en la técnica apreciará que la diana de unión inmovilizada, la sonda conjugada y el analito diana pueden incluir un antígeno o anticuerpo, una hormona o neurotransmisor y un receptor, un sustrato o efectos alostérico y una enzima, lectinas y azúcares, estructuras de ADN o ARN, tales como aptámeros y sus especies de unión (incluidas otras especies de ADN o ARN o proteína de unión) proteínas, biotina y sistemas de adivina o estreptavidina, enzimas y sus sustratos e inhibidores, sistemas de unión a lípidos, y combinaciones de los mismos. Para facilitar la comprensión de los dispositivos y procedimientos descritos en el presente documento, en adelante se describirán ligandos inmunológicos y se hará referencia al dispositivo como inmunosensor o biosensor.

40

En un aspecto, la cámara de detección mencionada con anterioridad incluye reactivos electroquímicos. A este respecto, se usa una reacción electroquímica en la cámara de detección para determinar si la cantidad de sonda

45

conjugada unida en la cámara de reacción se ha incrementado o reducido por la presencia del antígeno diana. La reacción electroquímica también se puede usar para determinar la concentración del analito (p. ej., antígeno diana) en base a la concentración de la sonda conjugada en la cámara de detección.

5 En otra realización, el sitio de unión inmovilizado incluye un antígeno diana y la sonda conjugada incluye un anticuerpo adaptado para unirse al antígeno diana. Cuando se introduce una muestra en la cámara de reacción, un antígeno diana, si está presente, se unirá a la sonda conjugada. Como resultado, la presencia de un antígeno diana en la muestra de fluido tiene como resultado una reducción en la cantidad de sonda conjugada unida al sitio de unión inmovilizado en la cámara de reacción y un incremento en la cantidad de sonda conjugada sin unir que puede viajar a una cámara de detección. La reducción en la sonda conjugada unida se puede detectar y/o cuantificar mediante una
10 reacción electroquímica en la cámara de detección. Por el contrario, el sitio de unión inmovilizado puede incluir un anticuerpo y la sonda conjugada puede incluir el antígeno diana. La presencia del antígeno diana en la muestra de fluido producirá, de forma similar, una reducción en la cantidad de sonda conjugada unida en la cámara de reacción.

15 Los sitios de unión inmovilizados y la sonda conjugada se colocan por separado en la cámara de reacción y el sitio de unión inmovilizado se coloca sobre al menos una perla magnética. Por ejemplo, los sitios de unión inmovilizados se pueden localizar sobre perlas magnéticas que se secan sobre una superficie de la cámara de reacción. Cuando se introduce una muestra líquida en la cámara de reacción, se puede usar un campo magnético para que las perlas magnéticas y los sitios de unión inmovilizados no se introduzcan en la cámara de detección.

20 En otra realización divulgada en el presente documento se proporciona un procedimiento de detectar un antígeno diana en una muestra de fluido, tal como se define en la reivindicación 15. El procedimiento incluye la etapa de liberar una muestra en un dispositivo biosensor como se describe en el presente documento. La muestra se deja reaccionar con los sitios de unión inmovilizados y una sonda conjugada se introduce en la cámara de reacción. Después, la muestra se pasa a una cámara de detección y el procedimiento comprende además la etapa de detectar electroquímicamente la sonda conjugada en la cámara de detección. La etapa de detección permite que el usuario determine si el antígeno diana está presente en la muestra en función del nivel de sonda conjugada detectado en la
25 cámara de detección. El procedimiento también puede incluir la etapa de cuantificar la cantidad de antígeno diana en la muestra en base a las señales eléctricas recibidas desde la cámara de detección.

Descripción breve de las figuras

La invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada tomada junto con las figuras adjuntas, en las que:

- 30 La FIG. 1 es una vista desde arriba de una realización de un biosensor divulgado en el presente documento;
- La FIG. 2 es una vista transversal del biosensor de la FIG. 1 a lo largo de la línea 2-2;
- La FIG. 3 es una vista desde arriba de otra realización de un biosensor divulgado en el presente documento;
- La FIG. 4A es una vista transversal del biosensor de la FIG. 3 a lo largo de la línea 4A-4A;
- La FIG. 4B es una vista transversal del biosensor de la FIG. 3 a lo largo de la línea 4B-4B;
- 35 La FIG. 4C es una vista transversal del biosensor de la FIG. 3 a lo largo de la línea 4C-4C; y
- La FIG. 4D es una vista transversal del biosensor de la FIG. 3 a lo largo de la línea 4D-4D;

Descripción detallada de la invención

40 En el presente documento se describen dispositivos biosensores y procedimientos de uso. En una realización, el sensor incluye una cámara de reacción y una cámara de detección. Dentro de la cámara de reacción hay sitios de unión inmovilizados que se unen al analito de interés o a especies relacionadas con el analito de interés. Asimismo, en esta cámara hay una especie de sonda que se puede detectar en la cámara de detección y que se puede conjugar con una especie que se puede unir al sitio de unión inmovilizado o que se puede unir a una especie que se une al sitio de unión inmovilizado. En lo sucesivo, esto se denominará la sonda conjugada. La sonda conjugada y el sitio de unión inmovilizado son tales que la presencia del analito de interés en la muestra modifica la interacción de la sonda
45 conjugada y el sitio de unión inmovilizado. Por ejemplo, cuando está presente, el analito puede bloquear la unión de la sonda conjugada al sitio de unión inmovilizado. Como alternativa, el analito puede proporcionar un sitio de unión para la sonda conjugada, de este modo se incrementa la cantidad de sonda conjugada unida. En cualquiera de las realizaciones, la presencia del analito modifica la cantidad de la sonda conjugada unida en la cámara de reacción.

La cámara de reacción se puede disponer de tal manera que, una vez que han tenido lugar las reacciones de unión con

la sonda conjugada en la medida deseada, el líquido de la cámara de reacción se transfiere a la cámara de reacción, transfiriendo con él la sonda conjugada libre y dejando atrás la sonda conjugada unida. En la cámara de detección se puede detectar la cantidad de sonda conjugada libre. Por ejemplo, los electrodos en la cámara de detección se pueden usar para detectar electroquímicamente el nivel de sonda conjugada en la cámara de detección. La reacción electroquímica puede determinar si el analito diana está presente/ausente y/o determinar la concentración del analito diana en base a la cantidad de sonda conjugada en la cámara de detección.

Un ejemplo de un biosensor 20 ilustrado en las FIG. 1 y 2 incluye una cámara de detección 28, que comprende una célula electroquímica y una cámara de reacción 22 que contiene sitios de unión inmovilizados y una sonda conjugada. La cámara de detección 28 y la cámara de reacción 22 se pueden preparar formando una abertura que se extiende a través de una lámina de material espaciador eléctricamente resistivo 36. La abertura se puede conformar de un modo tal que defina una pared lateral de la cámara de reacción 22 y la cámara de detección 28, así como un paso para la muestra 38 entre las cámaras 22, 28. Extendiendo la abertura desde un extremo proximal 24 de la cámara de reacción 22 a través de un borde 37 del sensor 20 también se forma una entrada 25 para la muestra. En una realización, el espesor de la lámina 36 define la altura de la cámara de reacción 22 y la cámara de detección 28 y las cámaras pueden tener la misma altura. De acuerdo con esta realización, la fuerza capilar en la cámara de detección debe ser mayor que la de la cámara de reacción. Esto se puede conseguir modificando las superficies de la cámara de reacción y/o la cámara de detección o mediante la adición de materiales de llenado, tales como los que se divulgan en el presente documento, a la cámara de detección.

En otro ejemplo, la altura de la cámara de reacción 22 es mayor que la de la cámara de detección 28. Se puede preparar una cámara de reacción 22 de mayor altura que la cámara de detección 28 mediante, por ejemplo, la estratificación de múltiples láminas internas 32, 34, 26 y/o láminas de sellado externas 42,46 juntas. Por ejemplo, en la FIG. 2, la lámina media 36 del sensor 20 tiene una abertura que define las paredes laterales de la cámara de reacción 22 y la cámara de detección 28, tal como se ha descrito anteriormente. Después, la lámina media 36 se introduce entre una o más capas adicionales 32, 34, teniendo las capas adicionales 32, y 34 una abertura correspondiente únicamente a la cámara de reacción 22. Con respecto a la cámara de detección 28, las capas 32 y 34 definen las paredes del fondo 60, 62 (Es decir, las superficies superior e inferior) de la cámara. En esta realización, las paredes del fondo 60 y 62 de la cámara de detección comprenden los electrodos 54 y 52, conectables eléctricamente, a través de medios de conexión, a un circuito de medición. Los electrodos se describen más detalladamente más adelante.

En un aspecto, los electrodos 52 y 54 se pueden colocar en conexión eléctrica con un medidor (no mostrado) a través del terminal de conexión 66. El terminal de conexión permite que un medidor (no mostrado) se comunique eléctricamente con los electrodos 52 y 54 en la cámara de detección 28 a través de cables conductores eléctricos (no mostrado). El medidor en conexión con el área de conexión 66 puede aplicar un potencial entre los electrodos 52 y 54 en la cámara de detección 28 y detectar las señales eléctricas generadas durante una reacción electroquímica.

En funcionamiento, el usuario introduce primero la muestra en la primera cámara, la cámara de reacción 22, del sensor a través de la entrada para muestras 25. La muestra se puede introducir en la cámara de reacción mediante la ayuda de acción capilar o de disipación. La cámara de reacción puede incluir un orificio de ventilación 26 abierto a la atmósfera, lo que permite la salida del aire desplazado por la muestra. La muestra se introducirá en la primera cámara hasta que se ha llenado hasta el orificio de ventilación 26 de la cámara de reacción, momento en el cual se dejará de llenar. El volumen de la cámara de reacción 22 se escoge de modo que sea al menos igual al, y preferentemente mayor que, volumen de la cámara de detección 28.

El círculo 30 de la FIG.1 indica una abertura que atraviesa las capas 32, 34 y/o 36, pero no las capas 42 y 46. Dado que las capas 42 y 46 no están agujereadas inicialmente, la única salida a la atmósfera de la cámara de detección 28 es a través del paso para muestras 38 que se abre desde la cámara de reacción 22. Por tanto, cuando la cámara de reacción 22 se llena con la muestra, queda aire atrapado en la cámara de detección 28, que sustancialmente evita que se mezcle con la muestra. Una pequeña cantidad de muestra puede entrar en la cámara de detección 28 durante el tiempo entre que la muestra entra en contacto por primera vez con la abertura 38 que va a la cámara de detección 28 y entra en contacto con la parte más alejada de la abertura 38. No obstante, una vez que la muestra ha pasado completamente a través de la abertura 38 hacia la cámara de detección 28, no tendrá lugar más llenado de la cámara de detección 28.

La abertura de un orificio de ventilación 56 a la atmósfera permite la salida del aire atrapado en la cámara de detección 28, de modo que permite que la cámara de detección 28 se llene con la muestra reaccionada procedente de la cámara de reacción 22. el orificio de ventilación 56 puede abrirse de diversos modos, incluidos, por ejemplo, perforando una capa externa del dispositivo, eliminando una porción de la capa externa del dispositivo y/o arrancando una porción del dispositivo.

Cuando el orificio de ventilación está abierto, la muestra que ha reaccionado se introducirá en la cámara de detección 28 debido a la mayor fuerza capilar en la cámara de detección 28 comparada con la presente en la cámara de reacción 22. En una realización, el incremento de la fuerza capilar se proporciona recubriendo de forma adecuada las superficies

de la cámara de detección 28 o, más preferentemente, escogiendo la distancia capilar para que la cámara de detección 28 sea menor que la de la cámara de reacción 22. En esta realización, la distancia capilar se define como la dimensión más pequeña de la cámara. Un experto en la técnica apreciará que las fuerzas capilares en las cámaras de reacción y/o de detección se pueden crear variando una serie de factores. Las fuerzas capilares en cámaras finas se tratan en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.823.750, titulada "Procedimiento de prevención la toma de muestras corta de un dispositivo de llenado por capilaridad o por disipación", que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Una realización de ejemplo de un biosensor 120 que incluye tres cámaras se ilustra en las FIG. 3 a D. El inmunosensor incluye una cámara de llenado 107 además de una cámara de reacción 122 y una cámara de detección 128. En un aspecto, cada capa comprende un material de aislamiento, mientras que las capas superior e inferior 132, 134 incluyen adicionalmente una película conductora de la electricidad como se trata con mayor detalle a continuación. Eliminando las porciones de las capas en diferentes puntos del sensor se forman una cámara de llenado (107), una cámara de reacción 122 y una cámara de detección 128. Además, exponiendo las porciones de la película conductora de la electricidad sobre las capas superior e inferior 132, 134 proporciona los electrodos 152, 154 para realizar las reacciones electroquímicas y proporciona áreas de contacto eléctrico 101, 102, 103 para conectar eléctricamente el sensor a un medidor.

La cámara de llenado 107 recibe la muestra del paciente y usuario y proporciona un reservorio de muestras para llenar las otras dos cámaras. La cámara de reacción 122 y la cámara de detección 128 están en comunicación fluida con la cámara de llenado 107. Para ayudar a mover el fluido entre cámaras, la cámara de detección 128 puede incluir un orificio de ventilación 130 que inicialmente está cerrado. Una vez que una muestra ha reaccionado en la cámara de reacción, el orificio de ventilación 130 se abre de modo que el aire en la cámara de detección 128 puede salir a través del orificio de ventilación, permitiendo que el líquido de la cámara de reacción 122 entre en la cámara de detección. Como se ha tratado anteriormente con respecto al orificio de ventilación 56, el orificio de ventilación 130 se puede abrir de diversos modos, incluido perforar el dispositivo, eliminar una capa externa y/o arrancar una porción del dispositivo (es decir, arrancar a lo largo de una perforación).

El sensor puede incluir un punto de conexión eléctrica 101 que permite que se establezca una conexión eléctrica con un electrodo inferior 152 y puntos de conexión eléctrica 102, 103 que permiten que se establezca una conexión eléctrica un electrodo superior 154. La línea discontinua 106 indica una rotura en la película de conducción eléctrica que define el electrodo superior 154 sobre la capa superior 132. La rotura puede verse afectada por el patrón de la película conductora cuando se ha fijado o creando la rotura durante la fabricación. La rotura se puede realizar raspando la película, retirando parte de la película, grabando químicamente la película, mediante ablación con láser de la película u otros procedimientos de uso habitual. La rotura 106 en la película conductora sirve para, en parte, definir el área del electrodo activa de la tira aislando eléctricamente el conductor recubierto en la cámara de detección del de la cámara de reacción, Esto supone una ventaja, ya que puede evitar que cualquier señal eléctrica que, por otro lado, podría fluir por las películas conductoras en la cámara de reacción, efectúe los resultados del análisis.

El sensor 120 puede también incluir un punto de contacto 103 que permita al usuario conectar eléctricamente a la porción de la película conductora en contacto con la cámara de reacción 122. A medida que la cámara de reacción 122 se llena con la muestra, la monitorización del punto de contacto 103 permite detectar una señal que indique al medidor que la tira se ha llenado con éxito y que puede comenzar una secuencia de análisis. Con el fin de conseguir esto con la realización de la invención que se muestra en las FIG. 3 a 4D, se podría establecer una conexión eléctrica con la película conductora inferior en el punto de contacto 101 y con la película conductora superior en la cámara de reacción en el punto de contacto 103. A continuación, se aplicaría un potencial entre los dos puntos de conexión (101, 103) y las actuales tensión y/o resistencia eléctrica monitorizadas para determinar cuándo ha entrado la muestra en la cámara de reacción. Este potencial puede ser un potencial de CC o puede ser un potencial que varía con el tiempo, tal como un potencial de CA o una serie de pulsos de potencial de onda cuadrada con polaridad alterna. Monitorizando la corriente que fluye como resultado de la aplicación del potencial, o la tensión requerida para pasar una corriente predeterminada, se puede obtener una indicación de cuándo las películas conductoras en la cámara de reacción comienzan a humedecerse.

El área de conexión 101 para poner en contacto eléctricamente una capa inferior 134 portando la película conductora inferior se puede formar extendiendo la capa inferior 134 hasta pasado el final de una capa espaciadora 136 y la capa superior 132. El área de contacto 102 se forma eliminando las secciones de las capas 134 y 136 para exponer una sección de la capa superior 132. El área de contacto 103 se forma de un modo similar eliminando una sección de la capa inferior 134 y la capa espaciadora 136 como se muestra en la FIG. 4D (sección transversa 4D- 4D en FIG. 3).

La cámara de llenado 107 se puede formar eliminando secciones de la capa inferior 134 y la capa espaciadora 136, pero dejando la capa superior 132 y la capa de sellado 142 intactas. La capa de sellado 142 se puede adherir a la cara externa de la capa 134 y puede servir, con los lados de las secciones de corte en las capas 134 y 136 y la capa 132,

para formar un canal capilar que sea capaz de introducir la muestra mediante acción capilar. Este canal se ilustra en la FIG. 4A (sección transversal 4A-4A en la FIG. 3).

La cámara de reacción 122 se forma eliminando una sección de la capa espaciadora 136, pero dejando las capas 134 y 132 intactas. Esto forma un espacio capilar donde la altura del espaciador capilar es menor que la altura de la cámara de llenado 122. Esto permite que las fuerzas capilares extraigan líquido de la cámara de llenado 122 y lo introduzcan en la cámara de reacción 128 mediante acción capilar. La pequeña altura de la cámara de reacción también puede permitir un mezclado relativamente rápido de los componentes en la cámara de reacción. En un aspecto, la cámara de reacción 122 se abre en el borde(s) lateral(es) de la tira para permitir que al aire salga cuando el líquido llena la cámara de reacción.

La cámara de detección 128 se forma de un modo similar al de la cámara de reacción 122 eliminando una sección de la capa espaciadora 136, pero dejando las capas 134 y 132 intactas. Inicialmente, la cámara de detección 128 se abre a la cámara de reacción 122 por un extremo, pero no tiene otras aberturas.

El orificio de ventilación 130 se incorpora en la cámara de detección 128 eliminando la secciones o perforando la capa superior 132 (o la capa inferior 134). Una capa 146 mostrada en la FIG. 4B (sección transversal 4B-4B in FIG. 3) se puede laminar en la cara superior de la tira para sellar la abertura. Como alternativa, si se elimina una porción de la capa inferior 134, la capa de sellado 142 se puede agujerear/eliminar para abrir el orificio de ventilación 130.

Cuando la muestra de líquido llena la cámara de reacción 122, como parte del procedimiento de llenado salvará la abertura de la cámara de detección 128. Por tanto, cuando el líquido llena la cámara de reacción 122 de modo que sale por la abertura de la cámara de detección 128, el aire queda atrapado en la cámara de detección 128 y evita que entre más líquido. Esto permite conservar el líquido en la cámara de reacción 122 mientras están realizándose las reacciones de unión. Después de un tiempo predeterminado en el que cualquier reacciones de unión que podrían producirse en la cámara de reacción 122 han progresado en la medida deseada, las capas 142 o 146 son perforadas por medios de perforación (o se eliminan/arrancan) para permitir que el aire salga de la cámara de detección 128, de modo que el líquido se transfiere desde la cámara de reacción 122 a la cámara de detección 128. La dimensión transversal de la cámara de detección 128 permite que la acción capilar llene la cámara de detección.

Un experto en la técnica apreciará que el inmunosensor descrito en el presente documento puede tener varias configuraciones alternativas tales como, por ejemplo, la forma del sensor, el número de cámaras, la configuración del electrodo y/o la colocación de los puntos de contacto eléctrico. Por ejemplo, otros dispositivos sensores que se ilustran en diversas realizaciones alternativas de sensores se divulgan en una solicitud de EE.UU. titulada "Procedimiento y Aparato para Análisis Electroquímicos", presentada junto con la presente. Además, un experto en la técnica apreciará que, aunque los sensores ilustrados usan orificios de ventilación para controlar el flujo de fluido entre cámaras, también se contempla otras realizaciones de dirección de fluido. Por ejemplo, una barrera física entre la cámara de reacción y la cámara de detección podría eliminarse o abrirse para permitir el flujo de fluido entre cámaras. Los sensores descritos en el presente documento podrían también incluir elementos de bombeo para mover los fluidos por el dispositivo.

El inmunosensor de la presente invención incluye los electrodos 52, 152 y 54, 154, como se ha descrito con anterioridad. En ciertas realizaciones se puede usar una configuración de electrodos distinta de la relación en opuesto ilustrada en las Figuras, por ejemplo una relación de uno al lado del otro o una relación en desplazamiento. Los electrodos pueden tener un tamaño idéntico o sustancialmente similar o pueden ser de diferentes tamaños y/o diferentes formas. Los electrodos pueden comprender el mismo material conductor o materiales diferentes. Para los expertos en la técnica serán evidentes otras variaciones en la configuración, espaciación y construcción o fabricación del electrodo.

En una realización, los electrodos se montan en una relación opuesta en paralelo a una distancia inferior o igual a 500, 450, 400, 350, 300, 250, o 200 micrómetros, y, más preferentemente, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 micrómetros a aproximadamente 75, 100, 125, 150, o 175 micrómetros. No obstante, en ciertas realizaciones puede preferirse que el espacio entre electrodos sea superior a 500 micrómetros, por ejemplo 600, 700, 800, 900, o 1000 micrómetros, o incluso superior a 1, 2, 3, 4, o 5 milímetros.

Al menos uno de los electrodos puede ser un electrodo sensor, es decir un electrodo sensible a la cantidad de agente redox reducido en el caso antioxidante o del agente redox oxidado en el caso oxidante. En el caso de un sensor potenciométrico en el que el potencial del electrodo sensor es indicativo del nivel de analito presente, está presente un segundo electrodo, que actúa como electrodo de referencia, que actúa proporcionando un potencial de referencia. En el caso de un sensor amperiométrico en el que la corriente del electrodo sensor es indicativa del nivel de analito presente en la muestra, está presente al menos otro electrodo que funciona como electrodo contador para completar el circuito eléctrico. Este segundo electrodo puede también funcionar como electrodo de referencia. Como alternativa, un electrodo adicional (no mostrado) puede realizar la función de un electrodo de referencia.

En un aspecto, la película conductora eléctrica que define los electrodos 52, 152, 54, 154 se puede adherir a una superficie del inmunosensor por medio de un adhesivo. Adhesivos adecuados incluyen, por ejemplo, adhesivos

termoactivados, adhesivos sensibles a presión, adhesivos termocurados, adhesivos curados químicamente, adhesivos de fusión en caliente, adhesivos de flujo caliente y similares. En un aspecto alternativo, la película conductora eléctrica se prepara recubriendo (p. ej., mediante recubrimiento por bombardeo o impresión con pantalla) una lámina de material eléctricamente resistente con un material adecuado conductor eléctrico, por ejemplo platino, paladio, carbono, óxido de indio, óxido de estaño, óxidos mixtos de indio/estaño, oro, plata, iridio, mezclas de los mismos, y similares. Los materiales adecuados para usar como electrodos deberían ser compatibles con los reactivos presentes en el sensor 20, 102. Materiales resistentes eléctricamente adecuado incluyen, por ejemplo, políésteres, poliestirenos, policarbonatos, poliolefinas, mezclas de los mismos, y similares.

Reactivos para usar en el inmunosensor, por ejemplo anticuerpo/antígeno inmovilizado, antígeno/anticuerpo unido a sonda, tampón, mediador, sustrato enzimático y similares, pueden estar soportados sobre las paredes de la cámara de reacción 22, 122 o un soporte independiente contenido dentro de las cámaras, dentro de una matriz, o pueden ser de autosoporte. Si los reactivos debe usar de soporte las paredes de la cámara o los electrodos, los productos químicos se pueden aplicar mediante el uso de técnicas de impresión bien conocidas en la técnica, por ejemplo impresión con horro de tinta, impresión con pantalla, litografía y similares. En una realización alternativa, se aplica una solución que contiene el reactivo a una superficie dentro de una cámara y se deja secar.

En otra realización del inmunosensor descrito en el presente documento, las especies inmunológicas y/o reactivos electroquímicos pueden estar en un soporte y/o contenidos dentro de uno o más soportes independientes que se introducen en el sensor. Soportes independientes adecuados incluyen, entre otros, materiales de malla, materiales de láminas no tejidas, materiales de llenado fibrosos, membranas macroporosas, polvos sinterizados y/o perlas. El sitio de unión inmovilizado se coloca en al menos una perla magnética. Las ventajas de los soportes independientes incluyen un área de superficie mayor, de modo que permiten incluir más sitios de unión inmovilizados y sondas conjugadas en la cámara de reacción 22, 122. En una realización, un anticuerpo inmovilizado y/o sonda conjugada se secan sobre materiales de soporte, que después se introducen en la cámara de reacción. Como alternativa, el sitio de unión inmovilizado o la sonda conjugada se incorpora sobre un material de soporte y el soporte del otro componente es la pared e la cámara de reacción. En otra realización más, las paredes de la cámara de reacción son porosas, con el sitio de unión inmovilizado y/o la sonda conjugada incorporados en ellas. Esto se puede conseguir usando una membrana macroporosa para formar la pare de la cámara de reacción y comprimiendo la membrana alrededor de la cámara de reacción para prevenir las fugas de muestra del área deseada.

Soportes independientes adecuados incluyen material tal como materiales de malla, materiales de lámina no tejida, y los materiales de relleno fibroso incluyen poliolefinas, políésteres, nylon, celulosa, poliestirenos, policarbonatos, polisulfonas, mezclas de los mismos, y similares. Las membranas macroporosas adecuadas se pueden preparar a partir de materiales poliméricos, incluidos polisulfonas, difluoruros de polivinilideno, nylon, acetatos de celulosa, polimetacrilatos, poliacrilatos, mezclas de los mismos, y similares.

En una realización, la sonda conjugada también tiene como soporte perlas. Dichas perlas pueden comprender un material polimérico, por ejemplo agarosa, poliestireno, polimetacrilato, polimetilmetacrilato, opcionalmente alojando un material magnético (tal como gamma Fe_2O_3 y Fe_3O_4). El material de perla se selecciona de tal modo que se proporciona el soporte adecuado para el anticuerpo. Dichas perlas pueden incluir las comercializadas como DYNABEADS® de Dynal Biotech of Oslo, Noruega. Opcionalmente se puede incluir un imán para mantener las perlas magnéticas en la cámara de reacción y evitar que se desplacen a la cámara de detección. Por ejemplo, el sitio de unión inmovilizado se puede colocar sobre perlas magnéticas dentro de la cámara de reacción.

Uso del sensor para determinar la presencia o ausencia de un antígeno

Como se ha tratado anteriormente, el sensor 20, 120 puede incluir un sitio de unión inmovilizado y una sonda conjugada. Aunque la siguiente descripción se realiza con respecto al sensor 20 de la FIG. 2, será evidente que también es aplicable al sensor 120.

En una realización, un sitio de unión inmovilizado 44 es un anticuerpo frente al antígeno que se va a detectar y la sonda conjugada 50 es una enzima unida al antígeno que se va a detectar o un seudo-antígeno del antígeno que se va a detectar.

Los anticuerpos 44 se pueden adsorber o, por el contrario, inmovilizar de tal modo que no se muevan de la cámara de reacción durante un análisis. Opcionalmente, tras la aplicación de los anticuerpos 44 a la superficie interna de la cámara de reacción, se puede aplicar un agente diseñado para prevenir la unión inespecífica de proteínas a esta superficie (no mostrado). Un ejemplo de tal agente bien conocido en la técnica es seroalbúmina bovina (BSA). Un tensioactivo no iónico también se puede usar como tal agente, por ejemplo TRITON X100 fabricado por Rohm & Haas of Philadelphia, Pa., o TWEEN fabricado por ICI Americas of Wilmington, Del. Preferentemente, el tensioactivo no iónico seleccionado no desnatura proteínas.

Separada de los anticuerpos está la sonda conjugada 50 (antígeno unido a enzima). Ejemplos de enzimas adecuados para usar con sondas conjugadas 50 incluyen, entre otros, glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa. El antígeno

unido a enzima 50 se puede depositar dentro de la cámara de reacción de tal modo que se puede liberar en la muestra cuando es humedecido por la muestra. Por ejemplo, el antígeno unido a enzima 50 puede secarse sobre una superficie dentro de la cámara de reacción, de modo que sólo existe una débil unión entre el antígeno unido a enzima 50 y la cámara de reacción. En un aspecto, la tasa de disolución del antígeno unido a enzima 50 se escoge de tal modo que la sonda conjugada se disolverá en una muestra durante el tiempo necesario para que la muestra llene la cámara de reacción. De este modo, el antígeno unido a enzima 50 se puede distribuir de forma uniforme a lo largo del área de la cámara de reacción después del llenado.

En un aspecto, las cantidades relativas del antígeno unido a enzima 50 y del anticuerpo 44 se pueden escoger de modo que exista un exceso de anticuerpo 44 con respecto al antígeno unido a enzima 50. En un aspecto, un exceso se define como el exceso que es pequeño cuando se compara con el número de moléculas de antígeno que se van a detectar en la muestra.

Por tanto, cuando la muestra llena la cámara de reacción, el antígeno unido a enzima 50 se mezcla con la muestra. Después, se deja suficiente tiempo para que el antígeno unido a enzima 50 entre en contacto con los anticuerpos 44. Dado que hay un exceso de anticuerpos 44, si no hay antígeno presente en la muestra, sustancialmente todo, o una gran porción, del antígeno unido a enzima 50 se unirá a los anticuerpos 44 y, de este modo, será inmovilizado de forma eficaz. Si el antígeno diana está presente en la muestra, el antígeno diana entrará en contacto y se unirá a los anticuerpos 44, bloqueando la unión de al menos parte del antígeno unido a enzima 50 con los anticuerpos 44. De este modo, cuando hay antígeno diana presente en la muestra, al final de la etapa de reacción el antígeno unido a enzima 50 (o al menos una porción mensurable del mismo) permanecerá móvil en la muestra y podrá moverse hacia la cámara de detección. Por el contrario, si no hay antígeno diana presente en la muestra, el antígeno unido a enzima 50 quedará inmovilizado en la cámara de reacción 48 (o al menos una reducción mensurable en la cantidad que quede móvil en la muestra). Un experto en la técnica apreciará que no es necesario un exceso de anticuerpo 44 y que, como alternativa, las cantidades relativas del antígeno unido a enzima 50 y el anticuerpo 44 pueden ser iguales o puede haber un exceso de antígeno unido a enzima 50.

En una segunda realización, el sitio de unión inmovilizado 44 es un anticuerpo que se puede unir a un sitio en el antígeno diana y la sonda conjugada 50 incluye una enzima acoplada a un anticuerpo que se puede unir a un antígeno diana unido. Una ventaja de usar anticuerpos para el sitio de unión inmovilizado y para la sonda conjugada es que los reactivos de unión diana pueden estar mezclados completamente y secarse juntos durante la fabricación de la tira.

La distancia por la que las dianas de unión deben difundir puede ser más corta, lo que potencialmente acorta el tiempo necesario para realizar el ensayo.

Cuando la muestra entra en la cámara de reacción, el sitio de unión inmovilizado en la cámara de reacción se puede unir a un sitio sobre el analito de interés. La sonda conjugada puede incluir un segundo anticuerpo que puede unirse a un segundo sitio sobre el antígeno diana unido al sitio de unión inmovilizado. Cuando una muestra que contiene el analito de interés llena la cámara de reacción, la sonda conjugada y el sitio de unión inmovilizado se mezclan con la muestra y el analito de interés se une en un sitio a la sonda conjugada y en un segundo sitio al de unión inmovilizado. De este modo, el analito forma un enlace que inmoviliza una fracción de la sonda conjugada, en la que la fracción inmovilizada se puede usar para detectar la presencia y/o cuantificar la concentración del analito en la muestra. Por ejemplo, la cantidad de sonda conjugada inmovilizada se puede cuantificar observando el descenso de la cantidad de sonda conjugada libre que se transfiere a la cámara de detección.

En otra realización más, el sitio de unión inmovilizado 44 puede ser un antígeno diana y la sonda conjugada 50 puede comprender una enzima acoplada a un anticuerpo que se puede unir a al analito de interés. El sitio de unión inmovilizado y la sonda conjugada se colocan por separado en la cámara de reacción para evitar o reducir cualquier reacción antes de la introducción de la muestra.

Cuando una muestra que contiene el antígeno diana llena la cámara de reacción, el antígeno diana en la muestra puede unirse a la sonda conjugada (anticuerpo), reduciendo la cantidad de sonda conjugada que se une al sitio de unión inmovilizado (antígeno). Por tanto, la presencia o ausencia del antígeno diana modifica la cantidad de la sonda conjugada unida en la cámara de reacción. La fracción inmovilizada se puede usar para detectar la presencia y/o cuantificar la concentración del analito en la muestra. Por ejemplo, la cantidad de sonda conjugada inmovilizada se puede cuantificar observando el descenso de la cantidad de sonda conjugada libre que se transfiere a la cámara de detección.

En un aspecto, los sitios de unión inmovilizados y/o la sonda conjugada están unidos a las perlas. Por ejemplo, los sitios de unión inmovilizados (antígeno) se colocan sobre perlas magnéticas que se secan sobre una superficie de la cámara de reacción y la sonda conjugada (anticuerpo) se puede secar sobre otra superficie de la cámara de reacción. Las perlas sobre las que el antígeno se inmoviliza también pueden ser perlas magnéticas cuya salida de la cámara de reacción es evitada por medio de un campo magnético. Cuando la muestra llena la cámara de reacción, el antígeno en la muestra se une al anticuerpo de la sonda conjugada y evita que el sitio de unión inmovilizado (antígeno) se una a la

sonda conjugada, lo que deja a la sonda conjugada libre para pasar a la cámara de reacción.

Como se ha mencionado anteriormente, las perlas pueden tener características tales que permanezcan en la cámara de reacción cuando la muestra se transfiere a la cámara de detección. Por ejemplo, las perlas paramagnéticas se pueden alinear con líneas de campo de un campo magnético aplicado, de modo que son sujetadas por el campo y, de este modo, se evita que se transfieran con la muestra a la cámara de detección. El campo magnético se puede aplicar por cualquier dispositivo adecuado, tal como un electroimán, o, en una realización alternativa, cuando se desee minimizar el consumo de electricidad, el campo magnético se puede aplicar mediante un imán permanente. En una realización, el imán o imanes se pudieron colocar de modo que estuvieran más cerca del lugar en la cámara de reacción de la sonda conjugada y más lejos de la localización en la cámara de reacción de las perlas paramagnéticas. Con esta disposición, las perlas tenderá a moverse hacia, y mezclarse con, la sonda conjugada bajo la influencia del campo magnético. Una vez que las perlas se han movido y se han mezclado con la sonda conjugada, el campo magnético aplicado tenderá a evitar que las perlas se muevan a ligares con una concentración menor de líneas de campo magnético, por tanto las perlas se inmovilizarán en la cámara de reacción mediante el campo magnético.

Con independencia de la configuración el sitio de unión inmovilizado y la sonda conjugada, después de las reacciones de la mezcla dentro de la cámara de reacción, la muestra que ha reaccionado se mueve hacia la cámara de detección. Esto se puede producir a un tiempo predeterminado después de que la mezcla se ha introducido en la cámara de reacción. Por ejemplo, el tiempo predeterminado se puede fijar de un modo tal que haya suficiente tiempo para que se una sustancialmente toda la sonda conjugada. En un aspecto, el tiempo de residencia de la muestra en la cámara de reacción puede calcularlo un usuario manualmente. Como alternativa, el tiempo de residencia se puede calcular electrónicamente con un medidor en contacto eléctrico con el sensor.

En una realización, el tiempo de residencia de la muestra en la cámara de reacción se monitoriza mediante electrodos. Por ejemplo, en el sensor de las FIG. 1 y 2, cuando la muestra llena la cámara de reacción 22, una pequeña porción de la cámara de detección 28 en su abertura 38 en la cámara de reacción 22 será humedecida por la muestra. Los electrodos 52 y 54 pueden colocarse en la cámara de detección 28, de modo que al menos una porción de cada electrodo 52 y 54 entra en contacto con la muestra durante el llenado de la cámara de reacción 22, de modo que la presencia de la muestra formará puentes con los electrodos 52 y 54 y crea una señal eléctrica que se puede usar para desencadenar el dispositivo de tiempo. En otra realización, ilustrada en el sensor de las FIG. 3 y 4, un contacto eléctricamente separado (contacto 103) usado junto con el electrodo inferior y el área de contacto 101, puede detectar la presencia de la muestra en la cámara de reacción.

Un tiempo predeterminado después de que la muestra ha entrado en la cámara de reacción, la fase de reacción inmunológica del análisis se considera completada. Después, el orificio de ventilación 30, 130 se puede abrir a la atmósfera. Por ejemplo, se puede usar una aguja activada por solenoide en el medidor se puede usar para agujerear el orificio de ventilación. La perforación se puede realizar de forma automática mediante el medidor o manualmente por el usuario, por ejemplo el usuario inserta una aguja a través de la(s) capa(s) que cubren el orificio de ventilación.

Opcionalmente dispuestos en la cámara de detección 28, 128 hay reactivos de secado 64 que comprenden un sustrato enzimático y un mediador capaces de reaccionar con la parte enzimática de la sonda conjugada para producir una señal detectable. El sustrato y mediador enzimáticos, si están presentes, pueden estarlo en una cantidad suficiente de modo que la velocidad de la reacción de cualquier enzima presente con el sustrato enzimático está determinada por la cantidad de enzima presente. Por ejemplo, si la enzima fuera glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa, un mediador enzimático y un sustrato enzimático adecuados, tal como glucosa (si no están ya presentes en la muestra) se dispondrían en la cámara de detección 28, 128. En una realización alternativa, suficiente glucosa se dispondría en la cámara de reacción 28, 128 de modo que cualquier variación en el nivel de glucosa en la muestra entrante no alteraría e forma significativa la velocidad de la reacción enzimática, También se puede incluir un tampón para ayudar a justar el pH de la muestra en la cámara de detección 28, 128. En una realización, el ferricianuro es un mediador adecuado. Otros mediadores adecuados incluyen diclorofenolindofenol y complejos entre metales de transición y especies heteroatómicas que contienen nitrógeno. Adicionalmente, se puede añadir un segundo mediador tal como fenazina, etosulfato y/o 2,3-dimetoxi-5-metil-p-benzoquinona, que estimula una transferencia más eficaz de electrones desde la enzima a la especie de ferricianuro. El sustrato enzimático, el mediador, el segundo mediador y los reactivos tampón 64 pueden estar presentes en cantidades suficientes de modo que la velocidad de la reacción la enzima con el sustrato enzimático está limitada por la concentración de la enzima presente.

Cuando la cámara de detección 28, 128 se llena, los reactivos 64 se disuelven en la muestra. El componente enzimático de la sonda conjugada reacciona con el sustrato enzimático y el mediador para producir mediador reducido. Este mediador reducido se oxida electroquímicamente en un electrodo actuando como un ánodo en la cámara de detección 28, 128 para producir una corriente eléctrica. En una realización, la velocidad de cambio de esta corriente con el tiempo se usa como indicador de la presencia y la cantidad de enzima que está presente en la muestra reaccionada. Si la velocidad de cambio de la corriente es menor que (o mayor que) un valor umbral predeterminado, indica que no hay presente ninguna cantidad significativa (o una cantidad significativa) de sonda conjugada 50 en la muestra reaccionada, lo que indica la presencia (o ausencia) de antígeno presente en la muestra original, Por el

contrario, la velocidad de cambio de una corriente mayor que (o menor que) un valor umbral predeterminado se puede usar para indicar la ausencia (o presencia) de un antígeno en la muestra. En una realización, la velocidad de cambio de la corriente se usa para dar una medida de la cantidad relativa de antígeno inicialmente presente en la muestra. Por ejemplo, la velocidad de cambio de la corriente se puede usar para determinar la concentración de la sonda conjugada, que se puede correlacionar con la concentración del antígeno en la muestra,

Uso de melitina como sonda.

En una realización, un antígeno unido a sonda que comprende un complejo antígeno-melitina se puede secar sobre una pared de la cámara de reacción, como se ha descrito anteriormente. La cámara de detección puede contener un mediador que comprende ferrocianuro en liposomas o vesículas lipídicas. Si el complejo antígeno-melitina alcanza los liposomas, se descargarán y liberarán el ferrocianuro. Esto conduce a una rápida amplificación de la señal, es decir una cantidad pequeña de antígeno libre compite con el complejo antígeno-melitina por los sitios de unión sobre los anticuerpos y tiene como resultado una alta concentración de ferrocianuro.

Uso de peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina en ensayos electroquímicos.

Los ELISA convencionales usan peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP) como las enzimas en un ensayo calorimétrico. No obstante, se han desarrollado sustratos que permiten que estas enzimas se usen en un ensayo electroquímico. En esta realización, la AP se puede usar con p-aminofenilfosfato y la HRP se puede usar con tetraiafluvaleno.

El siguiente ejemplo no limitante es ilustrativo de los principios y práctica de la presente invención.

Ejemplo

Se realizó un ensayo inmunosensor de ejemplo para la proteína C reactiva humana en sangre entera usando perlas magnéticas recubiertas con proteína C reactiva humana

La proteína C reactiva (CRP) se unió de forma covalente a perlas magnéticas Biomag carboxiladas de 1,5 micrómetros (nº de cat. BM570; Bangs Laboratories, Indianapolis In, EE.UU.). 21,9 ,g de perlas (1 mg) se lavaron 4 veces con MES (ácido morfolinoetanosulfónico) 50 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO EE.UU.,) tampón, pH ,5,2, mediante incubación con este tampón y usando un imán para concentrar las perlas en el lateral del tubo y, tras 2 minutos, eliminar el tampón con una pipeta de transferencia. Después del cuarto lavado, las perlas se suspendieron en un volumen final de 0,34 ml de MES 50 mM. Se añadieron 40 ul de EDAD 100 mg/ml (Sigma, St Louis, MO EE.UU.) y, tras 5 minutos se añadieron 450 ug de CRP en solución salina tamponada con fosfato (Hytest, Turku Finlandia). Se dejó incubar las perlas durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La CRP no unida se eliminó usando un imán para concentrar las perlas tal como se ha descrito con anterioridad. Después, las perlas se bloquearon incubando durante 30 minutos en un tampón que contiene Tris 20 mM (2-amino-2-hidroximetil)-1,3-propanodiol), cloruro sódico 0,15M a pH 7,4 (TBS) y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO EE.UU.) y después se lavó cuatro veces en el mismo tampón usando concentración magnética. Las perlas se almacenaron en TBS/BSA que contiene 0,05% de azida sódica (Sigma- Aldrich, St Louis, MO EE.UU.).

Conjugado glucosa deshidrogenasa/anticuerpo

La conjugación de glucosa deshidrogenasa (enzima de E. coli recombinante; Kiikoman Corporation, Chiba, Japón) GDH y el anticuerpo monoclonal 4C28 clon C2 (Hytest, Turku Finlandia) se consiguió usando el reactivo MBS (M-Maleimidobenzoil-N-Hidroxisuccinimida éster) en base al procedimiento descrito por O Sullivan y col. (Anal. Biochem. 100 100-108 1979). En este ejemplo, el MBS se hizo reaccionar con los grupos amino en GDH y el intermedio MBS-GDH se purificó. Después los grupos de maleimida en el complejo SMCC-GDH se hicieron reaccionar con los grupos sulfhidrilo libres sobre la región bisagra del anticuerpo introducido mediante la reacción con el reactivo reductor cisteamina HCl.

1. Reducción de los disulfuros de la región bisagra de la IgG

Seis mg de cisteamina HCl (Sigma-Adrich, St Louis, MO, EE.UU.) se incubaron durante 90 minutos a 37°C con 1 ml de una solución que contiene 2 mg/ml de AcMo C2 en un tampón que contiene fosfato sódico 0,1M, a pH 7,4; NaCl 0,15M y EDTA 2,5Mm. La reacción se terminó aplicando la mezcla a una columna de desalación (PD-10; Amersham) equilibrada en un tampón de reacción y la elución continuó den el mismo tampón. Se recogieron fracciones de medio millito y se combinaron las tres fracciones que contenían la mayor cantidad de proteínas. Este material se hizo reaccionar con la enzima activada con maleimida en cuanto se combinó. La concentración de proteína se determinó suponiendo una absorbancia a 280 nm de 1,35 para una solución de 1 mg/ml de anticuerpo C2.

2. Activación con maleimida de la enzima

Al mismo tiempo, 2 mg de GDH se disolvieron en 1,0 ml del tampón de reacción y se añadieron 50 ul de una solución que contenía 7,6 mg/ml de MBS (Pierce Rockford III EE.UU.) en DMSO y se dejó incubar durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se terminó aplicando la mezcla a una columna de desalación PD-10; Amersham) Equilibrada en el tampón de reacción y la elución continuo en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de medio millito y se combinaron las tres fracciones que contenían la mayor cantidad de proteínas.

3. Conjugación del anticuerpo con la enzima

La IgG reducida y la GDH reaccionada con maleimida se mezclaron en la proporción de 1 mg de Ac a 0,9 mg de GDH y se incubaron durante la noche a 4°C. La reacción se terminó añadiendo 6 mg de cisteamina HCl y se dejó incubar durante otros 15 minutos a temperatura ambiente y, después, se aplicó alícuotas de 1,5 ml para separar las columnas de desalación equilibradas y se continuó la elución en un tampón que contenía Tris 20mM y cloruro sódico 0,15M a pH 7,4 (TBS) Se combinaron las tres fracciones de 0,5 ml que contenían la concentración de proteínas más elevada de cada columna. Se añadió cloruro cálcico hasta una concentración final de 1 mM, azida sódica hasta una concentración final de 0,1% y PQQ concentración final de 0,05 mg/ml. El conjugado se almacenó a 4°C antes de usar.

Inmunoensayo convencional para la proteína C reactiva

Los niveles de CRP en las muestras también se determinaron mediante inmunoensayo enzimático convencional. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Los pocillos de microplacas Immulon 11 se revistieron con 50ul de un anticuerpo monoclonal 10 ug/ml C2 en tampón TBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se eliminó mediante inversión y tiques en la palca y, después, lavando los pocillos cuatro veces con 200 ul de tampón TBS que contiene 0,1% de TWEEN 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano; Sigma- Adrich, St Louis, MO EE.UU.).

Después, se añadieron 50 ul de patrones estándar, o muestra que contiene cantidades desconocidas de CRP, normalmente diluida 100-1000 veces en TBS/TWEEN, a cada pocillo y se dejaron incubar durante una hora más. El antígeno no unido se retiró después mediante el procedimiento de lavado descrito anteriormente. Después, se añadieron 50 ul de una solución 220 ng/ml del anticuerpo C6 biotinilado en TBS/TWEEN y se dejó incubar durante otros 60 minutos. Después de lavar el Segundo anticuerpo no unido se añadieron 50 ul de una dilución 1/1000 de neutravidina-peroxidasa de rábano (Pierce Rockford III EE.UU.) y la reacción se dejó progresar durante otros 15 minutos. Por último, después de lavar para retirar la enzima no unida, la enzima unida se detectó mediante la adición de sustrato ABTS (Pierce Rockford III EE.UU.).

La biotinilación del anticuerpo C6 se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente. Dos miligramos del anticuerpo monoclonal C6 Hytest, Turku Finlandia) se disolvieron en 1 ml de bicarbonato sódico 50 Mm y se hicieron reaccionar con 29 ul de una solución de 1 mg/ml de biotina N-hidroxisuccinimida-éster (Pierce) en dimetilsulfóxido (Sigma). La reacción se dejó progresar durante 30 minutos con agitación ocasional. La reacción se terminó aplicando la mezcla a una columna de desalación (PD-10; Amersham) equilibrada en Tris (2-amino-2-hidroximetil)-1,3 propanodiol 20 Mm, cloruro sódico 0,15M, a Ph 7,4 (TBS) y la elución continuó den el mismo tampón. Se recogieron fracciones de medio millito y se combinaron las tres fracciones que contenían la mayor cantidad de proteínas. El material se almacenó a 4 °C. La concentración de proteína se determinó mediante absorbancia a 280 nm suponiendo que una solución 1 mg/ml de C6 tenía una absorbancia de 1,2.

TIRAS SENSORAS

Las tiras sensoras se construyeron del siguiente modo:

1) Redes del electrodo estaban compuestas por Melinex de un espesor de 178 um que se recubrió mediante bombardeo con una capa de oro. La resistencia superficial del recubrimiento de oro fue 8-12 ohms/sq.

2) el electrodo se recubrió con una solución de ácido 2-mercaptoetanosulfónico 0,3 mM durante 20 segundos y, después, se secó con un chorro de aire. Este procedimiento mantiene el electrodo hidrofílico y reduce la contaminación por hidrocarburos transmitidos por el aire y otros contaminantes,

3) un procedimiento de banda se usó para secar las tiras de química (p. ej., reactivos descritos antes) sobre el electrodo. La banda se transportó hasta pasada una cuchilla fija que realizó un raspado sobre la superficie y ayudó a definir el área del electrodo de trabajo. Después, la banda se transportó pasadas dos agujas de pipeteo de acero inoxidable con extremos romos conectadas a una bomba de jeringa, que depositó:

- El reactivo electroquímico (ferricianuro, glucosa, etc.) de modo que solapó el raspado, y
- El conjugado anticuerpo-enzima en el otro lado del raspado, aproximadamente a 1-2 mm del reactivo electroquímico.

- 4) Las tiras de química se secaron sobre secadores de infrarrojos y aire caliente a 50°C.
- 5) Las formas de las cámaras de reacción y de detección se cortaron por contacto leve en el espaciador usando una herramienta de corte por compresión rotatoria.
- 6) El espaciador se laminó sobre el electrodo de un modo tal que el conjugado de anticuerpo-enzima estaba en la cámara de reacción y el reactivo electroquímico estaba en la cámara de detección.
- 7) La cámara de llenado se perforó en e bi-laminado usando una matriz macho/hembra.
- 8) El antígeno unido a perlas paramagnéticas se pasó a una película aparte del electrodo.
- 9) El electrodo con las perlas paramagnéticas se unió al bilaminado de la etapa (6) de tal modo que la tira antígeno-peral estaba opuesta al conjugado anticuerpo-enzima en la cámara de la reacción.
- 10) El orificio de ventilación en cada sensor se perforó en e tri-laminado usando una matriz macho/hembra macho/hembra.
- 11) Los orificios de ventilación y el lado abierto de la cámara de llenado se cubrieron con "cinta mágica" (3M)
- 12) La red tri-laminada se singuló para dar los sensores de trabajo.

Detección electroquímica de GDH

- 15) La solución contenía 5 mg/ml de 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (Adrich, WI EE.UU.) 326mg/ml, ferricianuro potásico 400mM glucosa en un tampón que contiene ácido citracónico 0,26mg/ml (Sigma) y citraconato dipotásico 13.3mg/ml.

Conjugado

- 20) La solución que contenía GDH 400 ug/ml se diluyó a 100 ug/ml en una solución que contenía cloruro cálcico 1 mM, BSA 10 mg/ml, ácido citracónico 0,26 mg/ml, citraconato dipotásico 13,3 mg/ml y sacarosa 10 mg/ml.

Perlas magnéticas

La solución contenía perlas recubiertas con CRP 5mg/ml, sacarosa 100 mg/ml, cloruro cálcico 1 mM, ácido citracónico 0,26 mg/ml y citraconato dipotásico 13,3 mg/ml

Preparación de la muestra

- 25) Sangre entera normal heparinizada con un hematocrito del 42% y se usó una concentración plasmática de 1 ug/ml de CRP para el experimento siguiente. (CRP sangre), A 100 ul de sangre entera se añadieron 10ul de una solución de 2,5mg/ml de CRP en solución salina tamponada con fosfato. Se añadieron 10 ul de solución salina tamponada con fosfato a otra muestra de 100 ul como control.

Procedimiento del ensayo

- 30) En la cámara de llenado (Característica 107 de FIG. 3) se añadieron aproximadamente 5 ul de sangre. La sangre fluyó para llenar la cámara de llenado 107 y la cámara de reacción 122 y se detuvo cerca de la entrada a la cámara de detección 128. La sangre disolvió el conjugado de la pared de la cámara de reacción 122 y permitió la interacción de las perlas magnéticas que fueron arrastradas hacia el fondo de la cámara de reacción 122 mediante la presencia de un imán en la cámara de reacción 122. En ausencia de la CRP añadida, la mayoría del conjugado podrá unirse a las perlas magnéticas.

- 35) Tras la incubación durante 40 segundos, se perforó el orificio de ventilación 130 en la FIG. 3. Esto permitió que la sangre, junto con toda la GDH no unida, fluyera a través de la línea de salida (106) hacia el interior de la cámara de detección, en la que se inició la medida de la corriente eléctrica que fluye entre los electrodos en la cámara de detección. La corriente generada por la presencia de GDH en la cámara de detección se midió durante los siguientes 45 segundos. Los siguientes resultados son de seis muestras por duplicado de sangre control o de sangre que contiene 250 ug/ml de CRP. Muestran la corriente en μA a 5 segundos y a 45 segundos después de llenar la cámara de detección 128. La diferencia en la corriente entre 5 y 45 segundos se usó como medida de la concentración de CRP en la muestra.

45

Muestra control			Con adición de 250 ug/ml de CRP				
	5 s	45 s	Diferencia	5 s	45 s	Diferencia	
	19,01	27,72	8,71	24,26	40,8	16,54	
	16,99	26,45	9,46	20,32	37,25	16,93	
	20,05	28,41	8,36	26,39	47,25	20,86	
	18,81	31,1	12,29	25,12	50,44	25,32	
	16,75	24,0	7,05	20,41	39,09	18,68	
	22,94	34,22	11,28	17,93	35,77	17,84	
Media			9,525			19,36	
Desviación estándar			1,77			1,55	

Como se muestra en la tabla anterior, se produjo una diferencia significativa en la velocidad de cambio de la corriente entre la muestra control y la muestra a la que se añadió 250 ug/ml de CRP. Por tanto, el inmunosensor podía detectar la presencia de CRP en la muestra.

- 5 Un experto en la técnica apreciará otras características y ventajas de la invención en base a las realizaciones descritas anteriormente. De acuerdo con lo anterior, la invención no debe limitarse a lo que se ha mostrado y descrito particularmente, a excepción de lo indicado en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor para usar en la determinación de la concentración de un analito en una muestra fisiológica, comprendiendo dicho dispositivo:
 - una cámara de llenado adaptada para llenarse por vía de acción capilar;
- 5 una cámara de reacción que incluye un sitio de unión inmovilizado y una sonda conjugada, en la que la sonda conjugada comprende una pareja de unión adaptada para unirse al sitio de unión inmovilizado, en la que el sitio de unión inmovilizado está colocado sobre al menos una perla magnética, y en la que el sitio de unión inmovilizado y la sonda conjugada están colocados sobre diferentes superficies dentro de la cámara de reacción;
- 10 una cámara de detección que incluye electrodos para detectar una reacción electroquímica en la cámara de detección; y un paso para fluido entre la cámara de reacción y la cámara de detección, en el que la presencia o ausencia de un analito diana en la muestra de fluido tiene como resultado un cambio en la cantidad de sonda conjugada unida en la cámara de reacción, siendo el cambio detectable con una reacción electroquímica en la cámara de detección.
- 15 2. El biosensor de la reivindicación 1, en el que el sitio de unión inmovilizado es un antígeno y la pareja de unión es un anticuerpo.
3. El biosensor de la reivindicación 1, en el que el sitio de unión inmovilizado es un anticuerpo y la pareja de unión es un antígeno.
4. El biosensor de la reivindicación 1, en el que la dimensión capilar de la cámara de reacción es menor en cuanto a tamaño que la de la cámara de llenado.
- 20 5. El biosensor de la reivindicación 1, en el que la cámara de detección incluye un orificio de ventilación.
6. El biosensor de la reivindicación 5, en el que el orificio de ventilación puede abrirse perforando una capa exterior del dispositivo.
7. El biosensor de la reivindicación 5, en el que el orificio de ventilación puede abrirse eliminando una porción de la capa exterior del dispositivo.
- 25 8. El biosensor de la reivindicación 5, en el que el orificio de ventilación puede abrirse desgarrando a lo largo de una perforación.
9. El biosensor de la reivindicación 1, en el que la cámara de reacción incluye una abertura hacia la atmósfera.
10. El biosensor de la reivindicación 1, en el que al menos una perla magnética es secada sobre una superficie interna de la cámara de reacción.
- 30 11. El biosensor de la reivindicación 1, que además comprende un imán.
12. El biosensor de la reivindicación 11, en el que el imán está dispuesto de modo que mueva la al menos una perla magnética para que entre en contacto íntimo con la sonda conjugada después de que la muestra de fluido se haya introducir en la cámara de reacción.
13. El biosensor de la reivindicación 1, en el que la sonda conjugada incluye una enzima.
- 35 14. El biosensor de la reivindicación 13, que además comprende un mediador y un sustrato enzimático.
15. Un procedimiento para detectar un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - suministrar una muestra a un biosensor definido en la reivindicación 1;
 - 40 permitir progresar una reacción en la cámara e reacción entre un sitio de unión inmovilizado y una sonda conjugada; y
 - mover la muestra dentro una cámara de detección y detectar electroquímicamente el nivel de la sonda conjugada, en el que la presencia de un analito diana en la muestra tiene como resultado un incremento o una disminución en la cantidad de sonda conjugada detectada en la cámara de detección.
- 45 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el sitio de unión inmovilizado incluye un antígeno diana y la sonda conjugada incluye un anticuerpo adaptado para unirse al antígeno diana.

17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la sonda conjugada incluye una enzima.
18. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la muestra se desplaza desde la cámara de reacción a la cámara de detección por acción capilar.
- 5 19. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la etapa de mover la muestra incluye abrir un orificio de ventilación.
20. El procedimiento de la reivindicación 15, que además comprende la etapa de cuantificar la cantidad de antígeno diana en la muestra en base a las señales eléctricas recibidas desde la cámara de detección.
21. Un procedimiento de fabricación de un biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en la detección de un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 10 proporcionar una primera capa (136);
- eliminar una sección de la primera capa (136) para formar una parte de cámara de llenado (107), una parte de cámara de reacción (122) y una parte de cámara de detección (128);
- proporcionar una segunda capa (134);
- montar un primer lado de la segunda capa (134) a un primer lado de la primera capa (136);
- 15 eliminar una sección de la segunda capa (136) que se extiende sobre la parte de la cámara de llenado (107), en registro sustancial con la parte de cámara de llenado (107), extendiéndose además la segunda capa (134) sobre la parte de cámara de reacción (122) y la parte de cámara de detección (128), en el que la parte de cámara de reacción (122) y la parte de cámara de detección (128) están en comunicación fluida con la parte de cámara de llenado (107);
- 20 proporcionar una tercera capa (132);
- montar un primer lado de la tercera capa (132) en un segundo lado de la primera capa (136), extendiéndose la tercera capa (132) sobre la parte de cámara de llenado (107), la parte de cámara de reacción (122) y la parte de cámara de detección (128);
- 25 montar un primer lado de una capa de sellado (142) sobre un segundo lado de la segunda capa (134); de modo que las capas forman una tira que tiene una pluralidad de superficies exteriores;
- formar un paso que se extienda a través de una superficie exterior de la tira hacia el interior de la cámara de detección de modo que forme una ventilación de la cámara de detección (130); y
- Situar un sitio de unión inmovilizado (44) y sonda conjugada (50) dentro de la cámara de reacción (122).
22. Un procedimiento de fabricación de un biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en la detección de un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 30 proporcionar una primera capa (36);
- eliminar una sección de la primera capa (36) para formar una parte de cámara de llenado (107), una parte de cámara de reacción (22) y una parte de cámara de detección (28);
- proporcionar una segunda capa (34);
- 35 montar un primer lado de la segunda capa (34) en un primer lado de la primera capa (36), extendiéndose la segunda capa (34) sobre la parte de cámara de llenado (107), la parte de cámara de reacción (22) y la parte de cámara de detección (28);
- proporcionar una tercera capa (32);
- 40 montar un primer lado de la tercera capa (32) en un segundo lado de la primera capa (36), extendiéndose la tercera capa (32) sobre la parte de cámara de llenado (107), la parte de cámara de reacción (22) y la parte de cámara de detección (28);
- montar un primer lado de una primera capa de sellado (42) en un segundo lado de la segunda capa (34);
- montar un primer lado de una segunda capa de sellado (46) en un segundo lado de la tercera capa (32); de modo que las capas forman una tira que tiene una pluralidad de superficies exteriores;
- 45 formar un paso que se extienda a través de una superficie exterior de la tira hacia el interior de la cámara de

detección de modo que forme una ventilación de la cámara de detección (30); y

colocar un sitio de unión inmovilizado (44) y una sonda conjugada (50) dentro de la cámara de reacción, en el que bien la altura de la cámara de reacción (22) es mayor que la de la cámara de detección (28), o la cámara de reacción (22) y la cámara de detección (28) tienen igual altura y las superficies de la cámara de reacción (22) y/o la cámara de detección (28) están modificadas, o se añaden materiales de llenado a la cámara de detección (28).

5

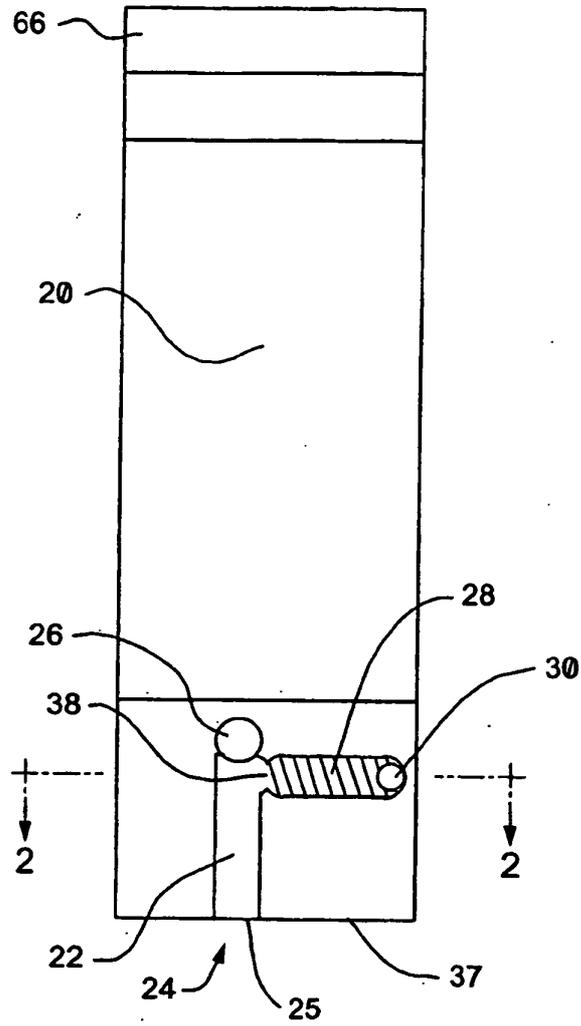


FIG. 1

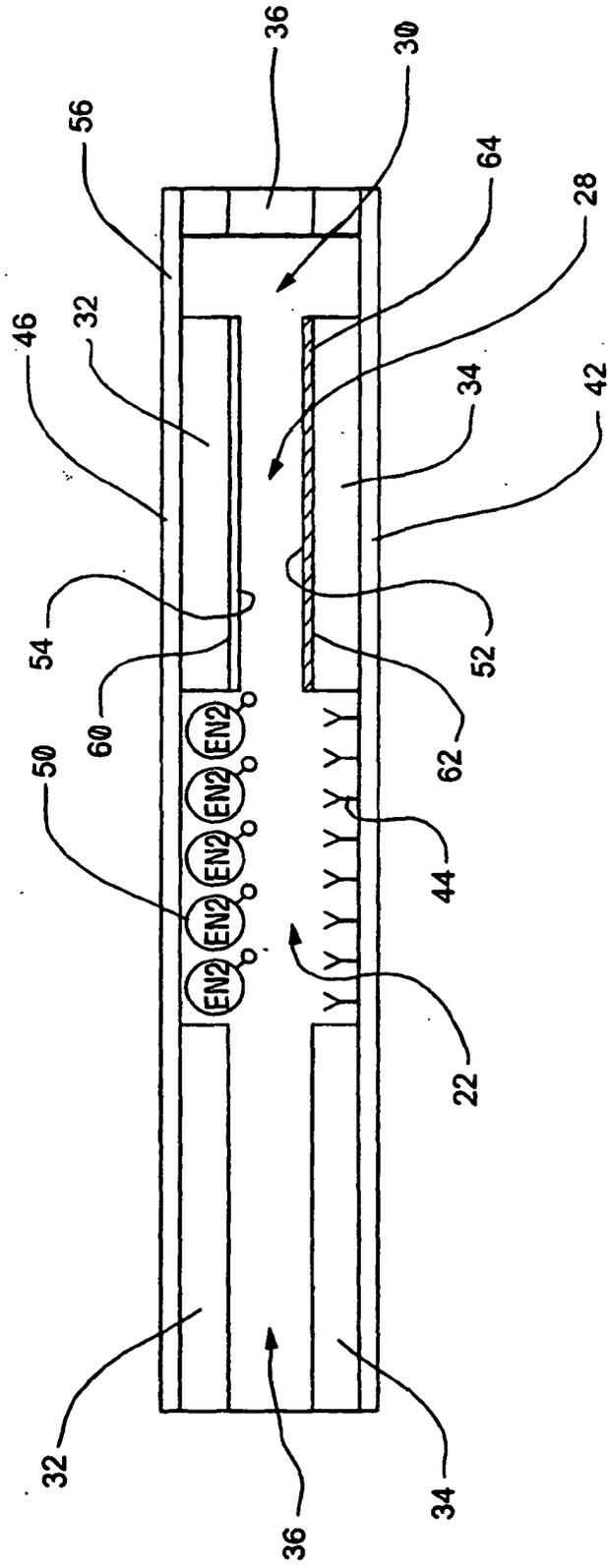


FIG. 2

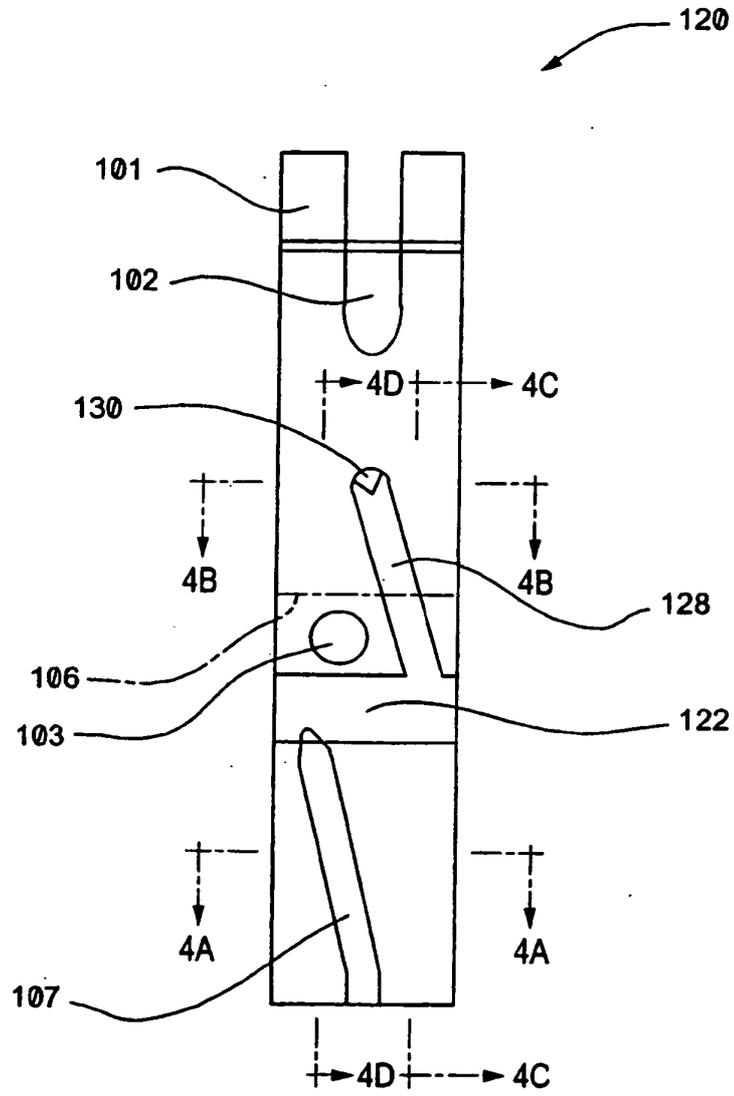


FIG. 3

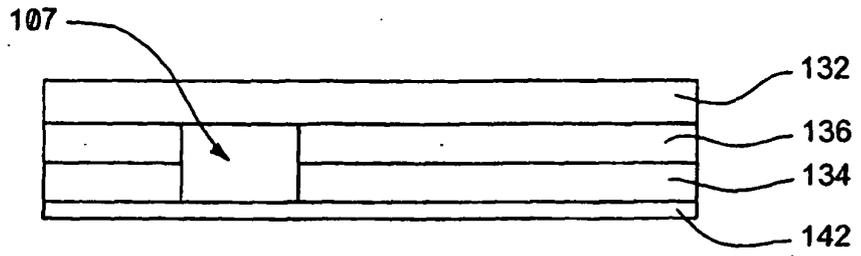


FIG. 4A

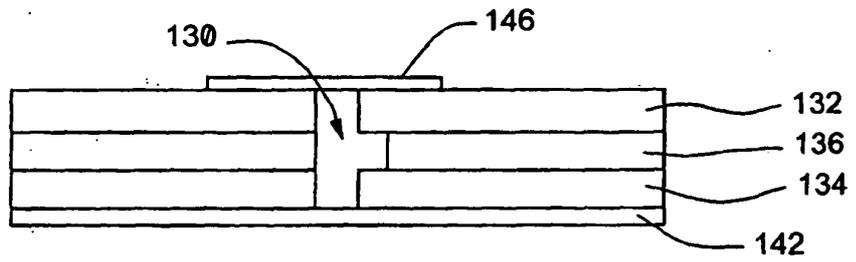


FIG. 4B

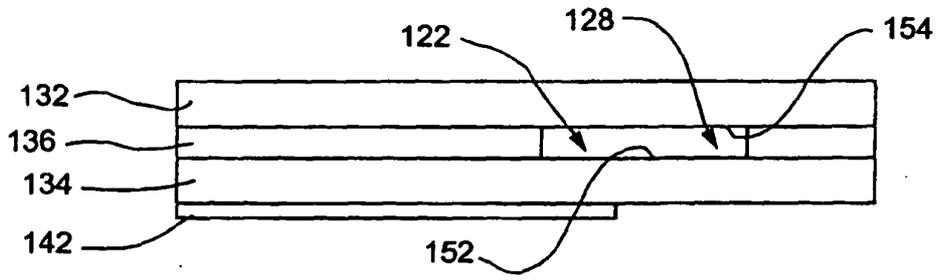


FIG. 4C

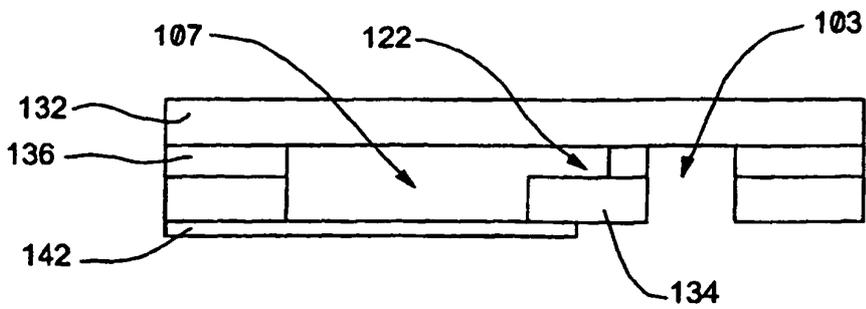


FIG. 4D