

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 252**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2009 E 09794067 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2318837**

54 Título: **Sensor de inmunoensayo mejorado**

30 Prioridad:

**11.07.2008 US 129688 P**

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

**28.04.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSAL BIOSENSORS, PTY. LTD. (100.0%)  
1 Corporate Avenue  
Rowville, VIC 3178, AU**

72 Inventor/es:

**RYLATT, DENNIS y  
HODGES, ALASTAIR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 568 252 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**

Sensor de inmunoensayo mejorado

Se citan las siguientes referencias: documentos (1) EPO 0300628; (2) JP 7227298; (3) US 4.622.294; (4) US 2006226008; (5) US 2007131549; (6) WO 02012885; (7) WO 0240058A2; (8) WO 0207635; (9) WO 02082078; (10) WO 02082078; (11) WO 03097863; (12) WO 03101427; (13) WO 04041774; (14) WO 05000902; (15) WO 05116654; (16) WO 06035431; (17) WO 1992003730; (18) WO 2000062351; (19) WO 2004046717; (20) WO 2006046524; (21) WO 2006096619; (22) WO 2006127167; (23) WO 9203730; (24) WO 9203730A1; (25) WO 9820332; (26) WO 96024062; (27) WO 98004743; (28) WO 99010743; y (29) Thomas R. DeCory, Richard A. Durst, Scott J. Zimmerman, Linda A. Gattlinger, Gary Paluca, Heleen H. DeCory y Richard A. Montagna. "Development of an Immunomagnetic Bead-Immunoliposome Fluorescence Assay for Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 in Aqueous Samples and Comparison of the Assay with a Standard Microbiological Method", Appl. Environ Microbiol. 2005, 77: 1856-1864.

**Antecedentes**

Se han utilizado sensores biomédicos convencionales, incluyendo los sistemas basados en inmunoensayos, para informar de la presencia y/o la concentración de una amplia variedad de analitos. Los inmunoensayos se clasifican generalmente 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 (comúnmente referido como un complejo reportero) y la mezcla a continuación, compete por la unión al anticuerpo. En un inmunoensayo 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 métodos de ensayo de la técnica anterior, se requieren generalmente una o más etapas de lavado. Las etapas de lavado pueden introducir complejidad en el procedimiento de ensayo y pueden generar residuos líquidos biológicos peligrosos.

Los inmunoensayos por lo general proporcionan a un usuario tanto un resultado cualitativo (por ejemplo, una respuesta "sí/no") obtenido, lo más a menudo mediante una simple detección visual (por ejemplo, cambio de color), como un resultado cuantitativo, tal como una concentración de un antígeno. La mayoría de los métodos cuantitativos implican piezas caras de equipos, tales como contadores de centelleo (para el control de la radiactividad), espectrofotómetros, espectrofluorímetros (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.156.972), instrumentos de resonancia de plasmón de superficie (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.965.456), y similares. Por consiguiente, sería ventajoso desarrollar un inmunoensayo que sea tanto barato como suficientemente simple para un uso conveniente para el hogar o el campo. Tal biosensor de preferencia no requeriría de centrifugación, dilución, pipeteado, lavado, o pasos de tiempo, y generaría un mínimo de desperdicios.

**Compendio**

La presente invención está en su sentido más amplio definida por las reivindicaciones adjuntas.

Se describe un dispositivo para detectar un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo el dispositivo: una cámara de reacción, en donde la cámara de reacción comprende superficies internas, un agente de unión inmovilizado y un agente de sonda, comprendiendo el agente de sonda una pareja de unión y un vehículo, en donde la pareja de unión se une al vehículo, en donde el analito diana en la muestra de fluido puede reaccionar con el agente de unión o la pareja de unión; en donde el vehículo comprende una pluralidad de copias de un agente de activación; una cámara de detección; en donde la cámara de detección comprende un agente de detección; en donde el agente de activación puede activar el agente de detección; y un paso de fluido entre la cámara de reacción y la cámara de detección,

en donde el dispositivo está adaptado para mover la muestra de fluido reaccionada desde la cámara de reacción a la cámara de detección a través del paso de fluido a través de la acción capilar, y

en donde la presencia del analito diana en la muestra de fluido a una concentración resulta en un cambio en la cantidad del agente de sonda unido al agente de unión inmovilizado y en la cantidad del agente de sonda no inmovilizado que se mueve con la muestra de fluido reaccionada a la cámara de detección, en donde el cambio es detectable en la cámara de detección y dependiente de al menos un umbral de la concentración.

El dispositivo puede comprender además una cámara de llenado, en donde la cámara de llenado comprende superficies internas. Las superficies internas de la cámara de reacción y la cámara de llenado pueden comprender paredes internas y/o las superficies de al menos un material de soporte. La cámara de reacción puede comprender una abertura a la atmósfera.

La cámara de reacción y/o la cámara de llenado pueden comprender un agente de bloqueo, en donde el agente de bloqueo es capaz de evitar la unión no específica de partículas de las proteínas o lipídicas a las superficies internas de la cámara de reacción. Una partícula lipídica puede comprender liposomas, vesículas, orgánulos celulares y similares. El agente de bloqueo puede comprender al menos uno seleccionado de un agente tensioactivo y una proteína de bloqueo. La proteína de bloqueo puede comprender albúmina de suero bovino.

Las moléculas del agente de unión y las moléculas del agente de sonda se pueden unir a diferentes superficies internas de la cámara de reacción.

5 El agente de unión puede comprender al menos una perla magnética. El dispositivo puede comprender un campo magnético que sirve para confinar el agente de unión revestido sobre las perlas magnéticas en la cámara de reacción.

10 El vehículo puede comprender de aproximadamente 10 a aproximadamente 100.000 copias de un agente de activación. El agente de activación puede ser encapsulado dentro de un vehículo que puede comprender al menos una partícula lipídica. Una partícula lipídica puede comprender liposomas, vesículas, orgánulos celulares y similares. El agente de activación puede ser unido a un vehículo que puede comprender al menos un polímero. El polímero puede comprender un dendrímero.

La pareja de unión del agente de sonda puede ser adaptada para unirse al agente de unión, o el analito diana que se une al agente de unión, o el analito diana que no está unido al agente de unión.

15 La cámara de reacción puede comprender un agente no activado inmovilizado en la cámara de reacción, en donde el agente no activado se puede unir a un agente de activación no unido o no encapsulado. El agente no activado puede comprender al menos una perla magnética, y puede ser confinado dentro de la cámara de reacción por un campo magnético.

La cámara de llenado y/o la cámara de reacción pueden comprender un tampón que pueda ajustar el pH de una muestra de fluido. El tampón puede comprender una sustancia seleccionada de fosfato, citrato, citraconato, melitato, Tris, PIPES, MOPS, HEPES, ftalato, imadazol.

20 La cámara de detección puede comprender un agente de liberación, en donde el agente de liberación puede liberar el agente de activación del vehículo. El agente de liberación puede comprender al menos un agente seleccionado de un detergente suave, un péptido lítico, una enzima, una fuente de calentamiento, enfriamiento, aplicación de ultrasonidos y luz junto con un agente de lisis fotoquímicamente activado que se incorpora en el vehículo. El detergente suave puede comprender un detergente seleccionado de n-octil-B-D-glucopiranosido, Tween 20, Brij 35 y Triton X-100. El péptido lítico puede comprender un péptido seleccionado de melitina, y uno de una clase de fosfolipasas, un componente del sistema del complemento. La enzima comprende una enzima seleccionada entre una proteasa y una tripsina. El agente de liberación puede comprender un medio físico, tal como, por ejemplo, un medio de enfriamiento, calentamiento, tratamiento con ultrasonidos, o una combinación de medios físicos y químicos, tales como, por ejemplo, una reacción fotoquímica iniciada por una fuente de luz dirigida a dentro del sensor.

30 El agente de activación puede comprender un cofactor para una apoenzima. La cámara de detección puede comprender una apo-enzima que puede ser activada por el cofactor. La enzima puede comprender glucosa oxidasa. El par cofactor/apoenzima puede comprender flavina adenina dinucleótido y apo-glucosa oxidasa. La enzima puede comprender una glucosa deshidrogenasa. El par cofactor/apo-enzima puede comprender pirroloquinolina quinona (PQQ) y apo-glucosa deshidrogenasa (GDH). La cámara de detección puede comprender, además, un sustrato enzimático. El sustrato de la enzima puede comprender un sustrato oxidable. El sustrato oxidable puede comprender un sustrato seleccionado entre galactosa, maltosa, xilosa y ácido acético. El sustrato de la enzima puede comprender glucosa. La cámara de detección puede comprender además al menos un mediador. El mediador puede comprender al menos una sustancia seleccionada de diclorofenolindofenol, etosulfato de fenazina, ferricianuro, ferroceno y complejos entre metales de transición y especies heteroatómicas que contienen nitrógeno.

La cámara de detección puede comprender un orificio de ventilación en el extremo distal. La ventilación se puede abrir por la perforación de una capa exterior del dispositivo, o mediante la eliminación de una parte de una capa exterior del dispositivo.

45 La cámara de detección puede comprender al menos dos electrodos para la detección de una reacción electroquímica en la cámara de detección. Al menos uno de los electrodos se puede formar a partir de una capa eléctricamente conductora. La cámara de detección puede comprender una rotura en la capa eléctricamente conductora que puede servir para definir al menos un borde del electrodo en la cámara de detección. Al menos un electrodo puede comprender paladio, platino, oro, iridio, carbono, carbono mezclado con aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño o una mezcla de los mismos. Un cambio en la cantidad del agente de sonda en la cámara de detección puede ser detectado a través de una reacción electroquímica en la cámara de detección.

La muestra se puede enviar al dispositivo a través de una cámara de llenado del dispositivo a través de una acción capilar. El agente de detección puede comprender una apo-enzima.

55 La invención proporciona un método para detectar un analito diana en una muestra de fluido, que comprende: suministrar la muestra de fluido al dispositivo de la invención; permitir que una reacción proceda en la cámara de reacción entre el agente de unión y el agente de sonda, en donde la presencia del analito diana en la muestra de fluido a una concentración resulta en cambios en la cantidad del agente de sonda unido al agente de unión

inmovilizado en la cámara de reacción y en la cantidad de agente de sonda no unido, en donde los cambios son dependientes de la concentración del analito diana;

mover el fluido de muestra reaccionado de la cámara de reacción en la cámara de detección por acción capilar de manera que el agente de sonda no unido se mueva a la cámara de detección; y

- 5 detectar la presencia del agente de sonda en la cámara de detección a través de un agente de detección, en donde una copia del agente de activación puede activar al menos una copia del agente de detección, en donde la presencia del agente de sonda en la cámara de detección es una medida de la concentración del analito diana unido al agente de unión inmovilizado en la muestra del fluido.

- 10 Mover la muestra desde la cámara de reacción a la cámara de detección puede comprender la abertura de un orificio de ventilación. La detección puede comprender la cuantificación de las señales eléctricas recibidas desde la cámara de detección, en donde la magnitud de las señales eléctricas puede ser dependiente de la concentración del analito objetivo en el fluido de muestra.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La figura 1A ilustra un ejemplo de un biosensor ilustrativo en forma de U. La parte 8 es donde pueden ocurrir la reacción y la detección;

La figura 1 B ilustra un biosensor ilustrativo en árbol. La parte 8 es donde pueden ocurrir la reacción y la detección;

La Figura 2 es una vista superior de una realización de un biosensor descrito en este documento;

La figura 3 es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 2 a lo largo de la línea 2-2;

La Figura 4 es una vista superior de otra realización de un biosensor descrito en este documento;

- 20 La Figura 5A es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4A-4A;

La figura 5B es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4B-4B;

La Figura 5C es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4C-4C; y

La Figura 5D es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4D-4D;

La Figura 6 es una vista superior de otra realización de un biosensor descrito en este documento;

- 25 La Figura 7 es una vista en sección transversal del biosensor de la Figura 4 o la Figura 6, que ilustra la ubicación de la química.

Descripción detallada

- 30 Se discuten en detalle a continuación varias realizaciones ejemplares, incluyendo una realización preferida. Aunque se discuten implementaciones específicas, se debe entender que esto se hace sólo con fines de ilustración. Una persona experta en la técnica relevante puede reconocer que los sistemas, métodos y características proporcionados en este documento pueden ser utilizados sin separarse del alcance de las reivindicaciones.

- 35 En una realización ejemplar, el biosensor puede comprender una celda electroquímica que usa un potencióstato capaz de medir los cambios de 1 microamperio por minuto; se puede estimar que 1 µg/ml de GDH añadida a sangre completa se puede detectar electroquímicamente utilizando una solución de glucosa que contiene ferricianuro potásico previamente secado en la cámara. El ferricianuro de potasio puede actuar como mediador para el transporte de electrones desde el sustrato al electrodo. Si, además, un segundo mediador, tal como fenazina etosulfato (PES), que puede hacer que este proceso de transferencia sea más eficiente, puede también secarse en la cámara del biosensor, tan poco como 50 ng/ml de GDH pueden ser detectados de forma fiable usando el mismo potencióstato.

- 40 En una realización ejemplar, si la GDH puede ser acoplada al anticuerpo de una manera que mantenga tanto la actividad de unión del anticuerpo como la actividad de GDH, entonces, utilizando el sistema de detección electroquímico descrito anteriormente, se pueden detectar 50 ng/ml para un antígeno del mismo tamaño que GDH, o 500 pM, en términos molares. Para muchos antígenos, por ejemplo, la proteína C reactiva y el dímero D, esto puede ser suficiente para permitir la medición de toda la gama de concentraciones que se encuentran en una población  
45 ejemplar de pacientes.

Sin embargo, puede haber muchos antígenos para los que el intervalo clínico útil pueda ser menor que el anterior. Estos incluyen, por ejemplo, muchas citoquinas, hormonas tales como la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y los marcadores de infarto de miocardio, tales como la troponina I y Pro BNP. En realizaciones de ejemplo, estos pueden estar presentes a concentraciones mucho menores, por ejemplo, intervalos 1-10 pM o sub pM.

En una realización ejemplar, puede ser proporcionado un método que pueda permitir la detección rápida de antígenos en estos niveles más bajos. El método puede utilizar un formato similar al de la solicitud de EE.UU. N° de Serie 11 / 284.097, pero puede combinar esto con las dos propiedades de adición de la enzima GDH bacteriana. En ejemplos de realización, en primer lugar, puede ser un requisito para la actividad para el cofactor PQQ, y en segundo lugar, la apo-enzima inactiva y PQQ pueden recombinarse en condiciones normales de pH para formar la enzima activa estable.

#### Mecanismo

Como se indicó anteriormente, los presentes ejemplos pueden ser aplicables a una tira biomédica desechable o no desechable o dispositivo de detección que puede ser utilizado para informar de la presencia y/o concentración de una amplia variedad de analitos a través de, por ejemplo, reacciones de unión. Como se usa en este documento, una reacción de unión puede referirse a cualquier reacción que implique al menos dos especies de unión juntas. Puede comprender un ensayo de unión competitiva, un ensayo de unión de desplazamiento, un ensayo de doble anticuerpo tipo sándwich, o similares.

El mecanismo de cómo un biosensor tal puede trabajar se describe en términos de un biosensor con dos cámaras, una cámara de reacción y una cámara de detección, que se pueden utilizar para probar la presencia y/o la concentración de un antígeno diana en una muestra de fluido.

La cámara de reacción del biosensor puede comprender anticuerpos para el antígeno diana. Los anticuerpos se pueden inmovilizar dentro de la cámara de reacción. La cámara de reacción puede comprender moléculas de agente de sonda que pueden unirse a los anticuerpos inmovilizados y/o al antígeno diana. Las moléculas del agente de sonda que no están unidas a los anticuerpos inmovilizados debido a la presencia del antígeno diana en la muestra de fluido pueden pasar a la cámara de detección con la muestra de fluido. Cada una de las moléculas del agente de sonda puede comprender una pluralidad de copias de un agente de activación. La cámara de detección puede comprender las moléculas del agente de detección que pueden ser activadas por el agente de activación. El agente de detección activado puede generar una señal que se puede medir en la cámara de detección, y los resultados pueden indicar, cualitativamente y cuantitativamente, la presencia y la concentración del antígeno diana en la muestra de fluido. La cámara de reacción y la cámara de detección pueden estar dispuestas de manera que la muestra de fluido pueda fluir desde la cámara de reacción a dentro de la cámara de detección de manera controlada.

Una muestra de fluido puede entrar en la cámara de reacción, en donde los componentes de la muestra de fluido pueden someterse a una reacción inmunológica. Por ejemplo, un antígeno diana puede unirse a un anticuerpo inmovilizado y/o una molécula de agente de sonda. Después de que la reacción inmunológica haya tenido lugar en la cámara de reacción, al menos algunas de las moléculas del agente de sonda pueden ser transferidas con la muestra de fluido reaccionada a la cámara de detección. El número de las moléculas del agente de sonda que desembocan en la cámara de detección puede ser dependiente de la presencia y concentración del antígeno diana en la muestra de fluido. Una molécula del agente de sonda puede comprender una pluralidad de copias de un agente de activación. Si una de la molécula del agente de activación puede activar una molécula del agente de detección y generar una unidad de señal, entonces una molécula del agente de sonda que fluye en la cámara de detección puede generar múltiples unidades de señal. Esto puede aumentar la sensibilidad y/o la precisión, y/o la velocidad de la prueba. La señal puede ser medida y procesada para generar un resultado que indique la presencia y concentración del antígeno diana.

En una realización ejemplar, la reacción de unión puede ser entre cualquiera de las dos especies que se unan entre sí. El agente de sonda puede ser cualquier agente que pueda conducir a la generación de una señal detectable en la cámara de detección.

Para facilitar la comprensión de ciertos ejemplos de realización, se puede utilizar un ejemplo del agente de unión que comprende un anticuerpo, comprendiendo el analito diana un antígeno que puede unirse al agente de unión, y comprendiendo el agente de sonda un antígeno que puede unirse al agente de unión, pero con una afinidad de unión inferior en comparación con el analito diana. El anticuerpo puede ser inmovilizado por revestimiento sobre una perla magnética que esté confinada en la cámara de reacción por un campo magnético. El agente de sonda puede comprender un cofactor de enzima encapsulado para pirroloquinolina quinona (PQQ) y glucosa deshidrogenasa (GDH). El cofactor se puede combinar con la enzima apo GDH en la cámara de detección, lo que puede conducir a la producción de una señal eléctrica. Si una partícula encapsulada comprende, por ejemplo, 100 o más moléculas de PQQ, cada una de estas se puede unir y activar una molécula de apo-GDH, a continuación, la inhibición de una única unión a las perlas magnéticas de anticuerpo-PQQ-liposoma puede conducir a la activación de 100 o más moléculas de GDH. De esta manera, puede detectarse tan poco antígeno como 5 pM, por ejemplo; si, por ejemplo, cada liposoma contiene 100 PQQ, o 500 fM si cada uno contiene 1000 PQQ.

Como se describe en este documento, (1) el agente de unión, y/o el analito diana, y/o el agente de sonda puede ser, por ejemplo, cualquiera de las especies que se pueden unir entre sí, (2) el agente de sonda puede ser, por ejemplo, cualquier agente que pueda conducir a una señal detectable en la cámara de detección, en donde el agente de sonda puede activar múltiples moléculas del agente de generación de señal en la cámara de detección, y (3) el

método de detección de la señal puede ser cualquier método adecuado, tal como electroquímico y/o absorción óptica y/o fluorescencia.

#### Biosensor

5 El dispositivo descrito en este documento puede comprender una cámara, en donde la reacción y la detección pueden ocurrir en la misma cámara. El dispositivo puede comprender dos cámaras, una cámara de reacción y una cámara de detección. El dispositivo puede comprender más de dos cámaras. Meramente a modo de ejemplo, el dispositivo puede comprender una cámara de llenado, además de la cámara de reacción y la cámara de detección. El dispositivo puede comprender una cámara de reacción y dos cámaras de detección, de modo que más de una señal se puede detectar en base de las mismas o diferentes mecanismos de detección en una sola prueba. Las señales pueden ser procesadas, por ejemplo, promediando, para mejorar la precisión del resultado. Pueden ser detectadas en una prueba las señales que indican diferentes parámetros. Meramente a modo de ejemplo, diferentes citoquinas inflamatorias relacionadas con las enfermedades cardiovasculares se pueden medir al mismo tiempo en una prueba, lo que puede proporcionar la predicción y/o el seguimiento más preciso del estado de la enfermedad. Si el dispositivo tiene dos o más cámaras, cualquier par de estas cámaras puede estar en comunicación directa fluida con la otra. Tal como se usa en este documento, "directo" indica que el par de cámaras puede estar en una conexión en serie y/o pueden intercambiar fluido directamente, no a través de una tercera cámara. Algunas cámaras pueden estar en conexión en paralelo y/o pueden intercambiar fluido a través de una tercera cámara. Puede haber un paso de fluido entre un par de cámaras a través de las cuales la muestra de fluido pueda fluir desde una cámara a la otra. El flujo a través del paso de fluido puede ser controlado por un equilibrio de fuerzas a través de, por ejemplo, una acción capilar, una presión neumática, una fuerza externa, o similares, o cualquier combinación de las mismas.

El biosensor puede tener una forma, tal como, por ejemplo, una forma generalmente en "V", tal como se ilustra en la Figura 1A, una configuración en "árbol" como se ilustra en la Figura 1B, una configuración rectangular ilustrada en las figuras 2-7, o similar. En la Figura 1A y B, la parte 8 puede ser en donde la cámara de reacción y/o la cámara de detección se localizan.

25 La Figura 2 es una ilustración del ejemplo de un biosensor. El sensor 20 puede comprender una cámara de reacción 22, una cámara de detección 28, un paso de muestras 38 entre las cámaras 22 y 28. El orificio de ventilación 30 se puede localizar en el extremo distal de la cámara de detección 28. La cámara de reacción 22 puede comprender una entrada 25 en el extremo proximal 24 de la cámara de reacción 22 en el borde 37 del sensor 20. El área de contacto 66 puede localizarse en un extremo del sensor 20, y se puede conectar eléctricamente el sensor con un medidor (no mostrado). La cámara de reacción 22 puede comprender un orificio de ventilación 26 que puede estar abierto a la atmósfera, permitiendo así que el aire desplazado por una muestra de fluido se escape. La muestra de fluido puede ser encaminada a la cámara de reacción 22 hasta que se llene hasta el orificio de ventilación de la cámara de reacción 26, después de lo cual puede detenerse el llenado. El volumen de la cámara de reacción 22 se elige de manera que sea al menos igual y, preferentemente, mayor que el volumen de la cámara de detección 28.

35 La figura 3 es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 2 a lo largo de la línea 2-2. La lámina intermedia 36 del sensor 20 tiene una abertura que define las paredes laterales de la cámara de reacción 22 y la cámara de detección 28. La hoja central 36 está intercalada entre una o más capas adicionales 32, 34, teniendo las capas adicionales 32 y 34 una abertura que corresponde únicamente a la cámara de reacción 22. Con respecto a la cámara de detección 28, las capas 32 y 34 pueden definir las paredes extremas 60, 62 (es decir, las superficies superior e inferior) de la cámara. Las paredes extremas 60 y 62 de la cámara de detección comprenden los electrodos 54 y 52, que pueden conectarse eléctricamente, a través de medios de conexión, a un circuito de medición. La cámara de reacción 22 puede comprender moléculas del agente de unión inmovilizado 44 en una superficie interna, y las moléculas del agente de sonda 50 sobre una superficie interna opuesta. La cámara de detección 28 puede comprender los electrodos 54 y 52, reactivos revestidos en al menos una superficie interna, tal como, por ejemplo, el sustrato de la enzima 64 y el orificio de ventilación 30 en el extremo distal de la cámara. Las capas externas 42 y 46 se extienden longitudinalmente a través del sensor 20, y no están inicialmente perforadas. Una porción de la capa 46 se puede quitar en 56 para abrir el orificio de ventilación 30. El orificio de ventilación 56 se puede abrir en una variedad de maneras, incluyendo, por ejemplo, por punción de una capa exterior del dispositivo, mediante la eliminación de una porción de la capa exterior del dispositivo, y/o desgarrando una porción del dispositivo.

La Figura 4 es una vista superior de otra realización del biosensor 120. El sensor 120 puede comprender la cámara de llenado 107, la cámara de reacción 122 y la cámara de detección 128. Las tres cámaras están en conexión en serie en términos de comunicación de fluido. La raya 106 se puede localizar cerca del extremo proximal de la cámara de detección 128. El orificio de ventilación 130 se puede localizar en el extremo distal de la cámara de detección 128. Las áreas de contacto eléctrico 101, 102 y 103 pueden conectar eléctricamente el sensor a un medidor.

La Figura 5A es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4A-4A. La cámara de llenado 107 puede estar formada por eliminación de secciones de la capa inferior 134 y la capa de separación 136, pero dejando la capa superior 132 y la capa de sellado 142 intacta. La capa de sellado 142 se puede adherir a

la cara exterior de la capa 134 y puede servir, con los lados de las secciones recortadas en las capas 134 y 136 y la capa 132, para formar un canal capilar que sea capaz de extraer la muestra en ella por acción capilar.

5 La figura 5B es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4B-4B. El orificio de ventilación 130 puede ser incorporado en la cámara de detección 128 mediante la eliminación de secciones o perforando la capa superior 132 (o la capa inferior 134). La capa 146 se puede laminar a la cara superior de la tira para sellar la abertura. Alternativamente, si se elimina una parte de la capa inferior 134, la capa de sellado 142 puede ser perforada/eliminada para abrir el orificio de ventilación 130.

10 La Figura 5C es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4C-4C. Las porciones de la película eléctricamente conductora sobre las capas superior e inferior 132, 134 proporcionan los electrodos 152, 154 para llevar a cabo las reacciones electroquímicas. La capa de sellado 142 se puede adherir a la cara exterior de la capa 134. La porción de la superficie inferior de la capa 134 que no está cubierta por la capa 142 puede proporcionar una zona de contacto eléctrico que puede conectar eléctricamente el sensor a un medidor. La cámara de reacción 122 y la cámara de detección 128 se puede formar mediante la eliminación de una porción de la capa de separación 136, pero dejando la capa superior 132 e inferior 134 intactas.

15 La Figura 5D es una vista en sección transversal del biosensor de la figura 4 a lo largo de la línea 4D-4D. La cámara de llenado 107 puede estar formada por la eliminación de secciones de la capa inferior 134 y la capa de separación 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 exterior de la capa 134. La cámara de reacción 122 se puede definir mediante la eliminación de una sección de la capa de separación 136, pero dejando la capa superior 132 y la capa inferior 134 intactas. El área de contacto  
20 103 se puede formar mediante la eliminación de una sección de la capa inferior 134 y la capa de separación 136 de tal manera que sea expuesta una superficie eléctricamente conductora de la capa superior 132.

La Figura 6 es un ejemplo de realización de un biosensor. El biosensor puede comprender una cámara de llenado (1), una cámara de reacción (2) y una cámara de detección (3). Las tres cámaras están en conexión en serie en términos de comunicación fluida. La raya (4) se puede localizar cerca del extremo proximal de la cámara de  
25 detección (3). El orificio de ventilación (5) se puede localizar en el extremo distal de la cámara de detección (3). El biosensor puede comprender electrodos opuestos (6).

La Figura 7 es una vista en sección transversal del biosensor de la Figura 4 o la Figura 6, que ilustra el emplazamiento de la química. La cámara de reacción puede comprender moléculas del agente de unión inmovilizado en la superficie interna superior y moléculas del agente de sonda en la superficie interna inferior. La  
30 superficie interna superior puede ser un electrodo superior (1) que puede extenderse dentro de la cámara de detección. La superficie interna inferior puede comprender un electrodo inferior (4) que puede extenderse dentro de la cámara de detección. El agente de unión puede comprender un antígeno que puede ser revestido sobre perlas magnéticas (2). Las perlas magnéticas pueden estar contenidas dentro de la cámara de reacción por un imán (3) en la parte inferior del sensor. El agente de sonda puede comprender moléculas PQQ encapsuladas dentro de  
35 liposomas (5) y parejas de unión. La cámara de detección puede comprender apo-GDH (6) en la superficie interna superior, y otros reactivos de la química de detección (7) en la superficie interna inferior.

Una prueba que use el biosensor puede utilizar una muestra de fluido de menos de aproximadamente 100 mililitros, o menos de aproximadamente 50 mililitros, o menos de aproximadamente 20 mililitros, o menos de  
40 aproximadamente 10 mililitros, o menos de aproximadamente 5 mililitros o menos de aproximadamente 3 mililitros, o menos de aproximadamente 2 mililitros, o menos de aproximadamente 1 mililitro, o menos de 500 microlitros, o menos de aproximadamente 200 microlitros, o menos de aproximadamente 100 microlitros, o menos de aproximadamente 50 microlitros, o menos de aproximadamente 10 microlitros, o menos de aproximadamente 1 microlitro, o menos de aproximadamente 0,5 microlitros, o menos de aproximadamente 0,3 microlitros, o menos de aproximadamente 0,1 microlitros.

45 El biosensor puede comprender al menos una cámara de reacción. La cámara de reacción puede tener un extremo proximal y un extremo distal. Una muestra de fluido puede entrar en la cámara de reacción desde el extremo proximal, y puede salir de la cámara de reacción y/o fluir en la cámara de detección a través del paso de fluido desde el extremo distal.

50 La cámara de reacción puede comprender al menos una pared que pueda definir el exterior y/o el interior de la cámara de reacción. Al menos una pared de la cámara de reacción puede comprender un material, tal como, por ejemplo, poliéster, poliestireno, policarbonato, poliolefina, tereftalato de polietileno, o una mezcla de los mismos. Al menos una pared de la cámara de reacción puede comprender un material de carga, tal como, por ejemplo, dióxido de titanio, carbono, sílice, vidrio, y una mezcla de los mismos.

55 La cámara de reacción puede comprender un interior con un volumen, al menos parte del cual puede ser accesible a la muestra de fluido. El volumen puede ser menor que aproximadamente 100 mililitros, o menos de aproximadamente 50 mililitros, o menos de aproximadamente 20 mililitros, o menos de aproximadamente 10 mililitros, o menos de aproximadamente 5 mililitros o menos de aproximadamente 3 mililitros, o menos de aproximadamente 2 mililitros, o menos de aproximadamente 1 mililitro, o menos de 500 microlitros, o menos de

aproximadamente 200 microlitros, o menos de aproximadamente 100 microlitros, o menos de aproximadamente 50 microlitros, o menos de aproximadamente 10 microlitros, o menos de aproximadamente 1 microlitro, o menos de aproximadamente 0,5 microlitros, o menos de aproximadamente 0,3 microlitros, o menos de aproximadamente 0,1 microlitros. El interior de la cámara de reacción puede comprender una forma de sección transversal de forma cuadrada, rectangular, circular, oval, triangular, romboidal, trapezoidal, o similar. Una sección transversal puede ser perpendicular a la dirección del flujo de masa de la muestra de fluido dentro de la cámara de reacción. Las secciones transversales pueden ser uniformes en tamaño y/o forma a lo largo de la dirección del flujo del volumen. Las secciones transversales pueden ser variables a lo largo de la dirección del flujo de masa. Meramente a modo de ejemplo, las secciones transversales pueden estrecharse a lo largo de la dirección del flujo de masa.

La cámara de reacción puede comprender una distancia capilar,  $h_1$ . La distancia capilar puede referirse a la dimensión de la cámara de reacción y/o sus secciones transversales que determinan la magnitud de la fuerza capilar a la muestra de fluido. La distancia capilar puede ser la dimensión más pequeña del interior de la cámara de reacción. La magnitud de la fuerza capilar puede ser inversamente proporcional a la distancia capilar. La distancia capilar puede ser menor que aproximadamente menos de aproximadamente 1 centímetro, o menos de aproximadamente 5 milímetros, o menor que aproximadamente 2 milímetros, o menor que aproximadamente 1 milímetro, o menos de aproximadamente 500 micrómetros, o menos de aproximadamente 200 micrómetros, y menos de aproximadamente 100 micrómetros, o menos de aproximadamente 50 micrómetros. Si el biosensor es utilizado por un usuario y/o con un aparato que pueden generar una fuerza externa para transferir la muestra de fluido entre las diferentes cámaras del dispositivo, el dispositivo y/o sus cámaras pueden comprender una dimensión más grande. Meramente a modo de ejemplo, el biosensor puede comprender una longitud característica de menos de unos 100 centímetros, o menos de aproximadamente 50 centímetros, o menos de aproximadamente 20 centímetros, o menos de aproximadamente 10 centímetros, o menos de aproximadamente 5 centímetros, o menos de aproximadamente 1 centímetro. Como se usa en el presente documento, la longitud característica se refiere al diámetro del círculo más pequeño que encierra una superficie de la sección transversal entera de la cámara de reacción.

El interior de la cámara de reacción comprende superficies internas. Las superficies internas pueden comprender paredes internas que pueden definir la forma y/o el volumen de la sección transversal del interior de la cámara de reacción. Las paredes internas pueden comprender, pero no se limitan a, un material sólido, un material fibroso, un material macroporoso, un material en polvo, o similares, o cualquier combinación de los mismos. Las superficies internas pueden comprender aquellas de al menos un soporte independiente dentro de la cámara de reacción. Un soporte adecuado puede comprender, pero no se limita a, un material sólido, un material de malla, un material fibroso, un material poroso, un material en polvo, o perlas de un material, o una mezcla de los mismos. El material de malla puede comprender, por ejemplo, un polímero tal como poliolefina, poliéster, nylon, celulosa, poliestireno, policarbonato, polisulfona, o una mezcla de los mismos. El material fibroso puede comprender, por ejemplo, un polímero tal como poliolefina, poliéster, nylon, celulosa, poliestireno, policarbonato, polisulfona, o una mezcla de los mismos. El material poroso puede comprender, por ejemplo, un polvo sinterizado o una membrana macroporosa. La membrana macroporosa puede comprender, por ejemplo, un material polimérico tal como polisulfona, difluoruro de polivinilideno, nylon, acetato de celulosa, polimetacrilato, poliacrilato, o una mezcla de los mismos. El material de perla se puede seleccionar de tal manera que se puede proporcionar un soporte adecuado para un reactivo, tal como, por ejemplo, un agente de unión. Las perlas adecuadas pueden comprender las comercializadas como DYNABEADS.RTM. por Dynal Biotech de Oslo, Noruega. Las perlas pueden comprender, por ejemplo, perlas magnéticas. El soporte puede tener al menos uno de las siguientes ventajas. En primer lugar, se puede aumentar el área de superficie en la que los reactivos, tales como, por ejemplo, el agente de unión, el agente de sonda, se puedan unir, y/o cuando la reacción de unión pueda ocurrir dentro de la cámara de reacción. Esto puede disminuir el tiempo de reacción, y/o las posibilidades de un proceso indeseable (por ejemplo, la contaminación, la coagulación, etc.) que se produzca. En segundo lugar, se puede aumentar la fuerza capilar de la muestra de fluido al disminuir la distancia capilar de la cámara de reacción. La cámara de reacción puede comprender un orificio de ventilación que esté abierto a la atmósfera, permitiendo así que el aire desplazado por la muestra se escape. La muestra de líquido se puede encaminar a la cámara de reacción hasta que la cámara de reacción se llene hasta el orificio de ventilación de la cámara de reacción, después de lo cual se puede detener el llenado. El volumen de la cámara de detección puede ser elegido de modo que sea aproximadamente igual y preferiblemente menor que el volumen de la cámara de reacción. El volumen de la cámara de detección puede ser de aproximadamente 100%, o aproximadamente 95%, o aproximadamente 90%, o aproximadamente 85%, o aproximadamente 80%, o aproximadamente 75%, o aproximadamente 70%, o aproximadamente 60%, o menos de aproximadamente el 50% del de la cámara de reacción.

La cámara de reacción puede comprender un agente aglutinante y un agente de sonda. Las cantidades relativas del agente de unión y del agente de sonda pueden ser elegidas de tal manera que haya un ligero exceso del agente de unión respecto al agente de sonda. En este contexto, un ligero exceso se puede definir que es tal que el exceso sea pequeño en comparación con la cantidad de analito diana a ser detectado en la muestra de fluido. Por ejemplo, el exceso puede comprender menos de aproximadamente 40%, o menos de aproximadamente 30%, o menos de aproximadamente 25%, o menos de aproximadamente 20%, o menos de aproximadamente 15%, o menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 3%, o menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% de la cantidad media del analito diana esperada en la

muestra de fluido. La cantidad media de analito diana puede ser estimada, por ejemplo, para una población de interés con y/o sin un estado patológico objetivo.

5 El agente de unión puede inmovilizarse sobre al menos una superficie interna dentro de la cámara de reacción de modo que el agente de unión y las especies unidas a ellas durante la reacción puedan permanecer en la cámara de reacción y durante toda la prueba. El agente de sonda puede estar soportado sobre al menos una superficie interna dentro de la cámara de reacción. Las moléculas del agente de sonda que no están unidas a las moléculas del agente de unión inmovilizado directa o indirectamente pueden pasar a la cámara de detección con la muestra de fluido. Como se usa en este documento, "directamente" significa que una porción de la molécula del agente de sonda se une a una porción de la molécula del agente de unión, por ejemplo, un sitio de unión; mientras que "indirectamente" significa que el agente de sonda se une a otro agente, por ejemplo, el analito diana que se une directa o indirectamente al agente de unión inmovilizado.

10 El agente de unión puede ser adsorbido o inmovilizado de otro modo sobre al menos una superficie interna de la cámara de reacción a través de enlaces químicos. El agente de unión puede ser revestido sobre perlas que pueden ser confinadas en la cámara de reacción a través de una prueba. Meramente a modo de ejemplo, las perlas pueden ser perlas magnéticas, y el biosensor puede comprender un campo magnético para confinar las perlas magnéticas con un revestimiento del agente de unión en la cámara de reacción. Por ejemplo, un imán por debajo de la cámara de reacción puede impedir la transferencia de las perlas magnéticas y cualquier especie que pueda ser unida a las perlas, directa o indirectamente, tal como el agente de unión revestido sobre las perlas y las moléculas del agente de sonda unidas a las moléculas del agente de unión. Como resultado, en una realización ejemplar, las moléculas del agente sonda no unidas a las perlas magnéticas se pueden medir en la cámara de detección. La cantidad y/o concentración de analito diana en la muestra de fluido, por ejemplo, pueden estar relacionadas con la cantidad/concentración del agente de sonda que puede ser liberado en la cámara de detección.

15 El agente de sonda puede comprender una pareja de unión y un vehículo. La pareja de unión puede estar unida a la superficie del vehículo. El vehículo puede comprender una pluralidad de copias de un agente de activación. La pareja de unión puede facilitar una molécula del agente de sonda unida a una molécula del agente de unión inmovilizado, o a un analito diana libre que no esté unido a una molécula del agente de unión inmovilizado, o a un analito diana que se una a una molécula de unión inmovilizada. La pluralidad de copias del agente de activación puede ser revestida sobre la superficie o encapsularse dentro del vehículo.

20 Las moléculas del agente de sonda pueden estar soportadas sobre al menos una superficie interna de la cámara de reacción. La superficie interna de la cámara de reacción y el método para el revestimiento de las moléculas del agente de sonda pueden ser elegidos de tal manera que sólo puedan existir enlaces débiles entre las moléculas del agente sonda y la superficie interna. De esta manera, las moléculas del agente de sonda pueden ser liberadas en la muestra cuando la superficie interna esté mojada por la muestra. La velocidad de disolución de las moléculas del agente de sonda de la superficie interna puede ser elegida de tal manera que se produzca poca disolución durante el tiempo necesario para que la muestra llene la cámara de reacción. De esta manera, las moléculas del agente de sonda pueden ser distribuidas de manera uniforme en toda la zona de la cámara de reacción después del llenado. La superficie o superficies internas en las que se apoyan las moléculas del agente de sonda puede ser las mismas o diferentes de aquellas en las que se inmovilizan las moléculas del agente de unión.

25 En algunas realizaciones, las moléculas del agente de sonda pueden estar separadas y/o no unidas a las moléculas del agente de unión antes de que una muestra de fluido rellene la cámara de reacción y disuelva las moléculas del agente de sonda. En algunas realizaciones, después de que se hayan disuelto por la muestra de fluido en la cámara de reacción, las moléculas del agente de sonda pueden unirse a las moléculas del agente inmovilizado, pero con una afinidad de unión inferior en comparación con el analito diana, para formar un ensayo competitivo. La menor afinidad de unión de una molécula de agente de sonda a través de su pareja de unión a una molécula de agente de unión inmovilizado puede ser debida a al menos una de las siguientes razones. En primer lugar, una molécula de agente de sonda puede comprender un tamaño más grande en comparación con el analito diana, debido al vehículo vinculado a la pareja de unión de la molécula del agente de sonda, y/o al mayor tamaño de la pareja de unión en sí que el analito diana. En segundo lugar, la pareja de unión de una molécula del agente de sonda puede ser una versión modificada químicamente o de otro modo del analito diana de modo que la molécula del agente de sonda se pueda unir a la molécula del agente de unión inmovilizado a través de la pareja de unión, pero con una disminución de la afinidad de unión. La cinética de unión interior de las moléculas del agente de sonda también puede ser el resultado de que puede tomar más tiempo que las moléculas del agente de sonda lleguen a las moléculas del agente de unión inmovilizado que el analito diana en la muestra de fluido, ya que tiene que ser disuelto primero por la muestra de fluido, y/o porque se puede mover más lentamente en la muestra de fluido debido a su tamaño, más grande que el analito diana. De esta manera, la cantidad/concentración del analito diana en la muestra de fluido puede ser positivamente relacionada con la cantidad/concentración del agente de sonda liberado a la cámara de detección, donde el agente de sonda se puede medir cualitativamente y/o cuantitativamente. En otras realizaciones, después de disueltas por la muestra de fluido en la cámara de reacción, las moléculas del agente de sonda pueden unirse al analito diana y formar un ensayo del tipo sándwich o un ensayo de unión competitiva. Un ensayo del tipo sándwich se puede formar cuando una molécula del agente de sonda pueda unirse a un analito diana después de que el analito diana se una a una molécula del agente de unión inmovilizado. De esta manera, la cantidad/concentración del analito diana en la muestra de fluido puede ser inversamente proporcional a la

cantidad/concentración de las moléculas del agente de sonda liberadas a la cámara de detección, donde las moléculas del agente de sonda se pueden medir cualitativamente y/o cuantitativamente. Un ensayo de unión competitivo puede formarse si una molécula del agente de la sonda, cuando está disuelta por la muestra de fluido en la cámara de reacción, puede unirse a un analito diana libre con una afinidad de unión mayor de la que se une a la molécula del agente de unión inmovilizado. Un analito diana libre, como se usa en este documento, se refiere al analito diana que no está unido a una molécula del agente de unión inmovilizado. De esta manera, la cantidad/concentración del agente sonda liberado a la cámara de detección, donde las moléculas del agente de sonda se pueden medir cualitativamente y/o cuantitativamente.

En algunas realizaciones, las moléculas del agente de sonda se pueden unir a las moléculas del agente de unión inmovilizado cuando el biosensor se fabrica y/o antes de una prueba de una muestra de fluido usando tal biosensor. La pareja de unión de dicha molécula del agente de sonda puede comprender un pseudo-analito, un analito modificado, o similar. En la presente memoria, un pseudo-analito puede comprender uno que pueda unirse a la molécula del agente de unión inmovilizado, pero no con tanta fuerza como el analito diana. Meramente a modo de ejemplo, si el analito diana es una proteína humana, entonces un pseudo-analito adecuado puede comprender una versión animal de la misma proteína, tal como una proteína de perro o una proteína de cerdo. Un analito modificado puede comprender uno modificado químicamente o de otra forma de tal manera que la afinidad de unión a la molécula del agente de unión se reduzca. La afinidad de unión de la molécula del agente de sonda respecto a la molécula del agente de unión inmovilizado a través de la pareja de unión puede ser menor que la del analito diana. La menor afinidad de unión de una molécula del agente de sonda a través de su pareja de unión a una molécula del agente de unión inmovilizado puede ser debida a al menos una de las siguientes razones. En primer lugar, un agente de sonda puede comprender un tamaño más grande en comparación con el analito diana, debido a que el vehículo unido a la pareja de unión de la molécula de sonda, y/o al tamaño más grande de la propia pareja de unión. En segundo lugar, la pareja de unión de una molécula del agente de sonda puede ser una versión modificada químicamente o de otro modo o una versión diferente (por ejemplo, una versión animal de un analito humano) del analito diana de modo que las moléculas de sonda puedan unirse a las moléculas del agente de unión inmovilizado a través de la pareja de unión, pero con una disminución de la afinidad de unión. Después de disueltas por la muestra de fluido en la cámara de reacción, las moléculas del agente de sonda pueden ser desplazadas de las moléculas del agente de unión por el analito diana debido a la afinidad de unión inferior. De esta manera, la cantidad/concentración del analito diana en la muestra de fluido puede ser positivamente relacionada con la cantidad/concentración de las moléculas del agente de sonda desplazadas y liberadas a la cámara de detección, donde las moléculas del agente de sonda se pueden medir cualitativamente y cuantitativamente.

Una molécula del agente de la sonda puede comprender un vehículo. Como se describe en este documento, el vehículo puede comprender al menos una molécula de marcaje, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un cromóforo, o un fluoróforo. El vehículo puede comprender al menos aproximadamente 10 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 50 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 100 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 200 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 500 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 1.000 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 5000 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 10.000 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 50.000 moléculas de marcaje, o al menos aproximadamente 100.000 moléculas de marcaje. La molécula o las moléculas de marcaje se pueden revestir en la superficie del vehículo, o ser encapsuladas dentro del vehículo. El vehículo puede comprender una partícula lipídica. La molécula o las moléculas de marcaje pueden ser encapsuladas dentro de la partícula lipídica. La partícula lipídica puede comprender una partícula seleccionada de un liposoma, vesícula, orgánulo celular, y similares. El vehículo puede comprender un polímero. El polímero puede comprender un dendrímero, o similar.

De acuerdo con la invención, el vehículo comprende una pluralidad de copias de un agente de activación. El vehículo puede comprender al menos aproximadamente 5 copias, o al menos aproximadamente 10 copias, o al menos aproximadamente 50 copias, o al menos aproximadamente 100 copias, o al menos aproximadamente 200 copias, o al menos aproximadamente 500 copias, o al menos aproximadamente 1.000 copias, o al menos aproximadamente 5.000 copias, o al menos aproximadamente 10.000 copias, o al menos aproximadamente 50.000 copias, o al menos aproximadamente 100.000 copias de un agente de activación. Las moléculas del agente de activación se pueden aplicar sobre la superficie del vehículo, o ser encapsuladas dentro del vehículo. El vehículo puede comprender una partícula lipídica. Las moléculas del agente de activación se pueden encapsular dentro de la partícula lipídica. La partícula lipídica puede comprender una partícula seleccionada de un liposoma, vesícula, orgánulo celular, y similares. El vehículo puede comprender un polímero. Las moléculas del agente de activación se pueden unir a la superficie del polímero. El polímero puede comprender un dendrímero, o similar.

Una molécula del agente de activación puede activar una molécula del agente de detección en la cámara de detección de tal manera que una señal pueda ser generada y detectada. Meramente a modo de ejemplo, el agente de detección puede comprender una enzima, y el agente de activación puede comprender un cofactor que puede activar la enzima. Como un ejemplo más específico, el agente de detección puede comprender una apo-enzima, y el agente de activación puede comprender el cofactor correspondiente. El par apo-enzima y cofactor puede comprender la apo-glucosa oxidasa y la flavina adenina dinucleótido. El par apo-enzima y cofactor puede comprender la apo-glucosa deshidrogenasa y PQQ.

La cámara de reacción puede comprender otros agentes, además del agente de unión y del agente de sonda, tales como, por ejemplo, un agente de bloqueo, un agente no activado, o cualquier combinación de los mismos.

El agente de bloqueo puede bloquear la unión no específica de un agente sobre el agente de unión inmovilizado, el agente de la sonda, y/o la(s) superficie(s) interna(s) dentro de la cámara de reacción. El agente puede comprender al menos uno de los presentes en la muestra de fluido a ensayar, tal como, por ejemplo, una proteína o una partícula lipídica. La partícula lipídica puede ser al menos una seleccionada de un liposoma, una vesícula, un orgánulo celular, y similares. El agente de bloqueo puede comprender al menos un agente seleccionado de entre una proteína de bloqueo y un tensioactivo. La proteína de bloqueo puede comprender, por ejemplo, la proteína de suero bovino. Un tensioactivo no iónico también puede ser utilizado como un agente tal, por ejemplo, TRITON X100 fabricado por Rohm & Haas de Philadelphia, Pa., o TWEEN, fabricado por ICI Americas de Wilmington, Del. En algunas realizaciones, el tensioactivo no iónico seleccionado no desnaturaliza las proteínas. El agente de bloqueo se puede revestir sobre cualquier superficie(s) interna(s) de la cámara de reacción, que comprende donde se inmovilizan las moléculas del agente de unión, y/o donde se apoyan las moléculas del agente de sonda, y/o cuando ninguna de las moléculas del agente de unión ni las moléculas del agente sonda se revisten. El agente de bloqueo y los agentes unidos a ellos se pueden confinar en la cámara de reacción durante una prueba. Esto se puede lograr por cualquiera de los métodos por los cuales las moléculas del agente de unión pueden inmovilizarse en la cámara de reacción. Meramente a modo de ejemplo, el agente de unión puede ser absorbido en una superficie interna porosa de la cámara de reacción.

El agente no activado se puede unir a un agente activante no unido o no encapsulado. Esto puede evitar que un agente de activación no unido o no encapsulado se mueva a la cámara de detección y active un agente de detección de una manera independiente de la presencia del analito diana en la muestra de fluido, lo que puede perjudicar la exactitud y/o la validez de una prueba. Tal como se usa en este documento, "no unido" o "no encapsulado" significa que no se unan a, se encapsulen dentro, de otro modo integral al vehículo cuando el vehículo (y el agente de sonda) está dentro de la cámara de reacción y/o antes de que el vehículo (y el agente de la sonda) se mueva a la cámara de detección con la muestra de fluido reaccionado. Esto puede resultar de un vehículo del agente de sonda que pueda llegar a ser permeable, o produzca roturas, o desorba las moléculas del agente de activación durante la fabricación, el almacenamiento, o durante una prueba bajo ciertas condiciones, tales como pH, temperatura, etc. El agente no activado puede comprender cualquier agente que pueda unirse al agente de activación no unido o no encapsulado. Por ejemplo, si el agente de activación comprende un cofactor que puede unirse a una apo-enzima, el agente no activado puede comprender la apo-enzima. Las moléculas del agente no activado se pueden inmovilizar en una superficie interna de la cámara de reacción. Por lo tanto, las moléculas del agente de activación unidas a ellas se pueden confinar en la cámara de reacción durante una prueba. Esto puede reducir la cantidad de las moléculas del agente de activación no unidas o no encapsuladas que se pueden mover a la cámara de detección de una manera independiente de las presentes y/o la cantidad de analito diana en una muestra de fluido. Las moléculas del agente no activado se pueden inmovilizar por cualquiera de los métodos por los cuales las moléculas del agente de unión pueden inmovilizarse en la cámara de reacción. Meramente a modo de ejemplo, las moléculas del agente no activado se pueden inmovilizar dentro de la cámara de reacción uniéndolas a las perlas magnéticas, y las perlas magnéticas pueden estar contenidas dentro de la cámara de reacción por un campo magnético.

La cámara de reacción puede comprender un tampón que puede ajustar el pH de la muestra de fluido, por ejemplo, en la cámara de reacción. El tampón puede estabilizar como poco uno de los reactivos en la cámara de reacción durante la fabricación y/o el almacenamiento. El tampón puede comprender una sustancia seleccionada de fosfato, citrato, citraconato, melitato, TRIS, PIPES, MOPS, HEPES, ftalato, imadazol.

La reacción, en la cámara de reacción, puede durar de aproximadamente 0,1 segundos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 25 minutos, o de aproximadamente 20 segundos a aproximadamente 20 minutos, o de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 15 minutos, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, o de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 8 minutos, o de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 5 minutos.

El dispositivo puede comprender al menos una cámara de detección. La cámara de detección puede tener un extremo proximal y un extremo distal. Después de que una muestra de fluido termine la reacción dentro de la cámara de reacción, la muestra de fluido reaccionado que sale de la cámara de reacción desde el extremo distal de la cámara de reacción puede entrar en la cámara de detección desde su extremo proximal a través del paso de la muestra. La cámara de detección puede ser configurada de tal manera que puede detectar una señal generada en la cámara de detección de una manera dependiente de la presencia y/o la cantidad de las moléculas del agente de sonda que se transfieren a la cámara de detección.

La cámara de detección puede comprender al menos una pared que puede definir el exterior y/o el interior de la cámara de detección. Al menos una pared de la cámara de detección puede comprender una carga. El diseño de la al menos una pared y el material de carga de la cámara de detección pueden ser similares a los de la cámara de reacción.

- La cámara de detección puede comprender un interior con un volumen, al menos parte del cual puede ser accesible a la muestra de fluido. El volumen puede ser menor que aproximadamente 100 mililitros, o menos de aproximadamente 50 mililitros, o menos de aproximadamente 20 mililitros, o menos de aproximadamente 10 mililitros, o menos de aproximadamente 5 mililitros o menos de aproximadamente 3 mililitros, o menos de aproximadamente 2 mililitros, o menos de aproximadamente 1 mililitro, o menos de 500 microlitros, o menos de aproximadamente 200 microlitros, o menos de aproximadamente 100 microlitros, o menos de aproximadamente 50 microlitros, o menos de aproximadamente 10 microlitros, o menos de aproximadamente 1 microlitro, o menos de aproximadamente 0,5 microlitros, o menos de aproximadamente 0,3 microlitros, o menos de aproximadamente 0,1 microlitros. El interior de la cámara de detección puede comprender una forma en sección transversal de forma cuadrada, rectangular, circular, oval, triangular, romboidal, trapezoidal, o similar. Una sección transversal puede ser perpendicular a la dirección del flujo de masa de la muestra de fluido dentro de la cámara de detección. Las secciones transversales pueden ser uniformes en tamaño y/o forma a lo largo de la dirección del flujo de masa. Las secciones transversales pueden ser variables a lo largo de la dirección del flujo de masa. Meramente a modo de ejemplo, las secciones transversales pueden estrecharse a lo largo de la dirección del flujo de masa.
- La cámara de detección puede comprender una distancia capilar,  $h_2$ . La magnitud de la fuerza capilar puede ser inversamente proporcional a la distancia capilar. La distancia capilar puede ser menor que aproximadamente menos de aproximadamente 1 centímetro, o menos de aproximadamente 5 milímetros, o menor que aproximadamente 2 milímetros, o menor de aproximadamente 1 milímetro, o menos de aproximadamente 500 micrómetros, o menos de aproximadamente 200 micrómetros, y menos de aproximadamente 100 micrómetros, o menos de aproximadamente 50 micrómetros. La distancia capilar de la cámara de detección  $h_2$  puede ser menor que la de la cámara de reacción,  $h_1$ . Si el biosensor es utilizado por un usuario y/o con un aparato que puede generar una fuerza externa para transferir la muestra de fluido entre las diferentes cámaras del dispositivo, el dispositivo y/o sus cámaras pueden comprender una dimensión más grande. En la presente memoria, la fuerza externa no incluye la fuerza generada por un usuario para abrir el orificio de ventilación en la cámara de detección. Meramente a modo de ejemplo, el dispositivo puede comprender una longitud característica de menos de aproximadamente 100 centímetros, o menos de aproximadamente 50 centímetros, o menos de aproximadamente 20 centímetros, o menos de aproximadamente 10 centímetros, o menos de aproximadamente 5 centímetros, o menos de aproximadamente de 1 centímetro. Como se usa en el presente documento, la longitud característica se refiere al diámetro del círculo más pequeño que encierra una superficie de la sección transversal entera de la cámara de detección.
- El interior de la cámara de detección puede comprender superficies internas. Las superficies internas pueden comprender una pared interna/varias paredes internas que pueden definir la forma y/o el volumen de la sección transversal del interior de la cámara de detección. Las superficies internas pueden comprender aquellas de al menos un soporte independiente dentro de la cámara de detección. Las paredes internas y/o el soporte independiente de la cámara de detección pueden ser similares a aquellas de la cámara de reacción.
- La cámara de detección puede comprender un orificio de ventilación que puede estar abierto a la atmósfera. El orificio de ventilación puede residir en el extremo distal de la cámara de detección. Una configuración ejemplar se muestra como el orificio de ventilación 30 en la Figura 2 y el orificio de ventilación 130 en la Figura 4. El orificio de ventilación puede estar inicialmente cerrado. De esta manera, cuando la cámara de reacción se rellena con una muestra de fluido, el paso de la muestra a la cámara de detección puede ser bloqueado por una presión neumática generada por el aire atrapado dentro de la cámara de detección. Esta presión neumática puede evitar sustancialmente que la muestra de fluido llene la cámara de detección. Una pequeña cantidad de muestra puede entrar en la cámara de detección durante el tiempo transcurrido desde que la primera muestra contacta la muestra de paso a la cámara de detección y cuando la muestra contacta el lado más alejado del paso de la muestra. Cuando la muestra se ha mojado totalmente a través del paso de la muestra a la cámara de detección, el llenado de la cámara de detección puede detenerse. El volumen de la cámara de reacción puede ser elegido de modo que sea al menos igual y, preferentemente, mayor que el volumen de la cámara de detección. Con la apertura del orificio de ventilación en la cámara de detección a la atmósfera, la muestra puede ser transferida para llenar la cámara de detección. El orificio de ventilación puede abrirse tal como, por ejemplo, por la perforación del dispositivo, y/o la eliminación de una capa exterior, y/o el desgarro de una parte del dispositivo (es decir, rasgando a lo largo de una perforación). Meramente a modo de ejemplo, el orificio de ventilación se puede abrir usando una aguja controlada por un usuario o un solenoide en el medidor, que esté conectado al dispositivo. La abertura del orificio de ventilación puede permitir que el aire desplazado por la muestra y atrapado dentro de la cámara de detección se escape, y por lo tanto, pueda reducir la presión neumática lo que puede evitar que la muestra de fluido llene la cámara de detección. El dispositivo se puede configurar de tal manera que la fuerza capilar de la muestra de fluido en la cámara de detección sea mayor que la presente en la cámara de reacción. El aumento de la fuerza capilar puede ser proporcionado mediante el revestimiento adecuado de las superficies internas de la cámara de reacción y de la cámara de detección, y/o, por la elección de la distancia capilar de la cámara de detección  $h_2$  que sea más pequeña que la de la cámara de reacción  $h_1$ . De esta manera, la muestra de fluido se puede encaminar a la cámara de detección simplemente abriendo el orificio de ventilación, sin necesidad de ninguna otra fuerza externa generada por el usuario, o por un dispositivo externo, tal como, por ejemplo, una bomba o una jeringa. En otras realizaciones, el llenado de la cámara de detección por la muestra de fluido (reaccionada) puede ser controlado por una fuerza externa generada por un usuario o un dispositivo externo, tal como, por ejemplo, una bomba, una jeringa, o cualquier combinación de los mismos. También se puede suministrar una fuerza externa como una fuerza adicional para

mover la muestra de fluido desde la cámara de reacción a la cámara de detección además de la fuerza capilar. En la presente memoria, la fuerza externa no incluye la fuerza generada por un usuario para abrir el orificio de ventilación en la cámara de detección, por ejemplo, por la perforación.

5 Las moléculas del agente de sonda se pueden transferir a la cámara de detección con la muestra de fluido reaccionado. Como se describe en este documento, la presencia de las moléculas del agente de sonda en la cámara de detección se puede detectar cualitativamente y cuantitativamente por las señales generadas por las moléculas de marcaje, tales como, por ejemplo, por radioisótopos, cromóforos o fluoróforos. Al menos una pared de la cámara de detección puede ser permeable a las señales generadas por dichas moléculas de marcaje. Meramente a modo de ejemplo, al menos una pared de la cámara de detección puede ser transparente a una radiación emitida o absorbida por radioisótopos, y la radiación puede ser indicativa de una presencia o ausencia de las moléculas del agente de sonda en la cámara de detección.

15 La presencia de las moléculas del agente de sonda en la cámara de detección se puede detectar cualitativamente y cuantitativamente mediante una reacción electroquímica. En tales realizaciones, la cámara de detección puede comprender una celda electroquímica que puede comprender al menos dos electrodos opuestos, al menos un electrodo de detección/de trabajo y al menos un contraelectrodo/electrodo de referencia. La etapa de determinar la presencia de las moléculas del agente de sonda en la muestra de fluido reaccionado puede comprender: aplicar de un potencial entre el electrodo de detección/de trabajo y el contraelectrodo/electrodo de referencia en la celda electroquímica; y medir una corriente, en donde la corriente puede ser una indicación cualitativa y/o cuantitativa del agente de sonda en la muestra de fluido reaccionado en la cámara de detección, que puede ser una indicación cualitativa y/o cuantitativa del analito diana en la muestra de fluido.

20 El electrodo de detección puede ser sensible a la cantidad de agente redox reducido en el caso antioxidante o el agente redox oxidado en el caso oxidante. En el caso de un sensor potenciométrico, en el que el potencial del electrodo de detección es indicativo del nivel de analito presente, al menos otro electrodo puede actuar como electrodo de referencia para proporcionar un potencial de referencia. En el caso de un sensor amperométrico en el que el actual electrodo de detección es indicativo del nivel de analito en la muestra, al menos un otro electrodo puede actuar como contraelectrodo para completar el circuito eléctrico, y/o un electrodo de referencia. Alternativamente, el contraelectrodo y el electrodo de referencia pueden ser dos electrodos separados.

30 Al menos uno de los electrodos puede comprender un material eléctricamente conductor, tal como, por ejemplo, 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 una mezcla de los mismos. El cátodo en la celda electroquímica puede comprender un material eléctricamente conductor, tal como, 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 y estaño mezclados, oro, plata, iridio, un polímero conductor, o similares, o una mezcla de los mismos. El polímero conductor puede comprender, tal como, por ejemplo, polipirrol o poliacetileno, o similares, o una combinación de los mismos. El ánodo en la celda electroquímica y/o el(los) electrodo(s) que puede(n) entrar en contacto con sustancias oxidantes durante la fabricación o almacenamiento del dispositivo, puede comprender al menos un material eléctricamente conductor, tal como, por ejemplo, platino, paladio, carbono, carbono mezclado con un aglutinante, óxido de indio, óxido de estaño, óxidos de indio y estaño mezclados, oro, plata, iridio, un polímero conductor, o similares, o una mezcla de los mismos. El polímero conductor puede comprender, tal como, por ejemplo, polipirrol o poliacetileno, o similares, o una combinación de los mismos. Los materiales adecuados para uso como electrodos pueden ser compatibles con los reactivos presentes en el dispositivo, es decir, no reaccionan químicamente con los reactivos en el potencial de elección, y/o durante la fabricación del sensor, y/o almacenamiento, y/o uso. Los electrodos opuestos pueden comprender el mismo material conductor o materiales diferentes.

45 El electrodo de detección/trabajo y el contraelectrodo/electrodo de referencia pueden residir en al menos una superficie interna de la cámara de detección. Los electrodos opuestos se pueden aislar eléctricamente entre sí antes de que la cámara de detección se rellene con la muestra de fluido. El aislamiento se puede conseguir mediante la separación de los dos electrodos opuestos con un material eléctricamente aislante, o mediante la creación de una rotura en una capa o película conductora de la electricidad. Los electrodos opuestos residen en la misma superficie interna o diferentes superficies internas de la cámara de detección. Los electrodos opuestos pueden estar separados por aproximadamente 5 micrómetros, o aproximadamente de 10 micrómetros, o aproximadamente de 15 micrómetros, o aproximadamente de 20 micrómetros, o aproximadamente de 25 micrómetros, o aproximadamente de 30 micrómetros, o aproximadamente de 35 micrómetros, o aproximadamente de 40 micrómetros, o aproximadamente de 45 micrómetros, o aproximadamente de 50 micrómetros, o aproximadamente de 75 micrómetros, o aproximadamente de 100 micrómetros, o aproximadamente de 125 micrómetros, o aproximadamente de 150 micrómetros, o aproximadamente de 175 micrómetros, o aproximadamente de 200 micrómetros, o aproximadamente de 250 micrómetros, o aproximadamente de 300 micrómetros, o aproximadamente de 350 micrómetros, o aproximadamente de 400 micrómetros, o aproximadamente de 450 micrómetros, o aproximadamente de 500 micrómetros, o aproximadamente de 600 micrómetros, o aproximadamente de 700 micrómetros, o aproximadamente de 800 micrómetros, o aproximadamente de 900 micrómetros, o aproximadamente de 1 milímetro, o mayor que aproximadamente 2 milímetros, o mayor de aproximadamente 3 milímetros, o más de aproximadamente 4 milímetros, o más de aproximadamente 5 milímetros. En términos de la posición relativa, los

electrodos opuestos pueden estar en una relación paralela opuesta, o una relación de lado a lado, o una relación paralela pero desplazada, o una relación coplanar. Los electrodos opuestos pueden ser idénticos o sustancialmente similares en tamaño, o pueden ser de diferentes tamaños y/o formas diferentes.

5 El dispositivo puede comprender más de dos electrodos. Meramente a modo de ejemplo, el dispositivo puede comprender un tercer electrodo que puede ser un contraelectrodo/electrodo de referencia. Los dos  
10 contraelectrodo/electrodo de referencia pueden estar conectados eléctricamente. El tercer electrodo puede formar un circuito con el electrodo de detección/de trabajo que puede detectar el llenado de la cámara de reacción y/o la cámara de detección. Meramente a modo de ejemplo, el llenado de la cámara de reacción detectado de esta manera se puede utilizar como una señal para activar un dispositivo de tiempo de tal manera que el tiempo de reacción  
15 pueda ser controlado y/o una etapa siguiente de una prueba, tal como, por ejemplo, la transferencia de la muestra de fluido reaccionada a la cámara de detección puede ser activada después de una cantidad pre-determinada de tiempo. Como otro ejemplo, si el dispositivo comprende dos cámaras de detección, cada cámara de detección puede comprender un contraelectrodo/electrodo de referencia, y las dos cámaras de detección pueden compartir un electrodo de detección/trabajo que se extiende a las dos cámaras de detección. En tales realizaciones, pueden ser  
obtenidas dos señales eléctricas en una prueba.

Otras variaciones en la configuración de los electrodos, separación y construcción o fabricación estarían dentro del alcance de la descripción.

Al menos una porción de una de la superficie interna de la cámara de detección puede comprender una capa conductora o una película que puede ser conectada eléctricamente a los electrodos, pero extendida más allá de  
20 estos. La capa o película conductora extendida se puede utilizar como un área de contacto en la que el dispositivo está conectado eléctricamente a otro dispositivo, tal como, por ejemplo, un medidor. En ciertas realizaciones, la cámara de detección puede comprender dos superficies internas que comprenden películas conductoras y/o están conectadas eléctricamente a los electrodos opuestos, pero aisladas eléctricamente entre sí. En la presente memoria, "sustancialmente" significa que al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos  
25 aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% de cualquiera de las dos superficies internas están revestidas con material eléctricamente conductor. Cada película conductora de la electricidad puede ser continua o modelada. Por ejemplo, la película conductora modelada puede formar dos electrodos que son conductores entre sí; o un electrodo y un área de contacto, en donde el área de contacto puede  
30 conectar eléctricamente el electrodo a un dispositivo externo, tal como, por ejemplo, un medidor.

Puede haber una raya en al menos una de la superficie interna de la cámara de detección. Una ilustración a modo de ejemplo puede ser la raya 106 en la Figura 4. La raya puede generar una interrupción en la película conductora de la electricidad dentro de la cámara de detección. La ruptura puede ser afectada modelando la película conductora cuando se establece o mediante la creación de la rotura durante la fabricación. La raya 106 puede verse afectada  
35 por el rayado de la película, raspando parte de la película, grabando químicamente la capa conductora o película, por ablación con láser de la capa conductora o la película u otros métodos. La raya 106 en la capa conductora o la película puede servir para, en parte, definir el área del electrodo activo de la cámara de detección mediante el aislamiento eléctrico del conductor revestido en la cámara de detección del de la cámara de reacción. Esto puede ser ventajoso ya que puede evitar cualquier señal eléctrica que de otra manera pueda fluir en las capas conductoras o películas en la cámara de reacción, afectando a los resultados del ensayo. La raya puede ser lo suficientemente amplia como para romper de manera fiable la conducción eléctrica de la capa donde reside la raya, pero no tan  
40 ancha como para evitar que el fluido la atraviese, tal como, por ejemplo, bajo la acción capilar. La raya puede ser de aproximadamente 1 micrómetro a 10 milímetros, preferiblemente de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 1 milímetro, y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente  
45 200 micrómetros. La distancia entre la raya y el extremo proximal de la cámara de detección puede ser de aproximadamente 1%, o aproximadamente 5%, o aproximadamente 10%, o aproximadamente 15%, o aproximadamente 20%, o aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50%, o mayor que 55% de la distancia entre el extremo proximal y el extremo distal de la cámara de detección.

Al menos una superficie interna de la cámara de detección puede ser revestida con el agente de detección. El agente de detección puede ser disuelto y/o ser difusible en la muestra de fluido en la cámara de detección, y se puede revestir sobre cualquier superficie interna de la cámara de detección. En algunas realizaciones, el agente de detección no puede ser disuelto o ser difusible en la muestra de fluido. Tal agente de detección puede ser revestido en la proximidad de donde se puede hacer la detección. Como se usa en este documento, "proximidad" significa  
50 dentro de la distancia a través de la cual el agente de detección o el derivado del mismo pueden ser detectados, como, por ejemplo, por los electrodos. El derivado del agente de detección significa una especie generada y/o activada por la reacción del agente de detección con una especie llevada a la cámara de detección por el agente de sonda, por ejemplo, el agente de activación. El agente de detección puede comprender una enzima, tal como, por ejemplo, una glucosa oxidasa, una glucosa deshidrogenasa. El agente de detección puede comprender una especie que puede ser activada por una superficie del agente de activación unido sobre o encapsulado dentro de una  
55 molécula del agente de sonda llevada a la cámara de detección por la muestra de fluido. El par agente de detección y agente de activación puede comprender una apo-enzima y su cofactor. Meramente a modo de ejemplo, el par  
60

agente de detección y agente de activación puede comprender apo glucosa oxidasa y flavina adenina dinucleótido; el par agente de detección y agente de activación puede comprender apo-glucosa deshidrogenasa y PQQ. Si una copia del analito diana presente en la muestra de fluido corresponde a una molécula del agente de sonda que comprende una pluralidad de copias de un agente activante transferido a la cámara de detección, y una copia del agente de activación puede activar una molécula del agente de detección para generar una unidad de señal, entonces una copia del analito diana puede corresponder a múltiples unidades de señal. Esto puede aumentar la sensibilidad y/o la precisión, y/o la velocidad de la prueba.

La cámara de detección puede comprender un agente de liberación que puede liberar las moléculas del agente de activación del vehículo de una molécula del agente de sonda de tal modo que las moléculas del agente de activación pueden reaccionar con las moléculas del agente de detección y activarlas. El agente de liberación puede comprender al menos uno seleccionado de un detergente suave, un péptido lítico, una enzima, una fuente de calentamiento, enfriamiento, aplicación de ultrasonidos, luz junto con un agente de lisis fotoquímicamente activado, o similares, o cualquier combinación de los mismos. El detergente suave puede comprender al menos uno seleccionado de n-octil-B-D-glucopiranosido, Tween 20, Brij 35 y Triton X-100. El péptido puede comprender al menos uno seleccionado de melitina, y uno de una clase de fosfolipasas, un componente del sistema de complemento. La enzima puede comprender al menos una seleccionada de proteasa y tripsina. El agente de liberación puede comprender medios físicos de liberación de las moléculas del agente de activación del vehículo. Puede comprender medios de calentamiento o enfriamiento, ultrasonidos o una combinación de medios físicos y químicos, tales como, por ejemplo, una reacción fotoquímica iniciada por una fuente de luz dirigida hacia el sensor. El agente de liberación puede disolverse y/o ser difusible en la muestra de fluido en la cámara de detección, y se puede revestir sobre cualquier superficie interna de la cámara de detección.

Si el agente de detección o su derivado es una enzima, la cámara de detección puede comprender un sustrato enzimático que puede reaccionar con el agente de detección o su derivado para producir una señal detectable. Una ilustración ejemplar es el sustrato de la enzima 64 en la Figura 3. El sustrato de la enzima puede comportar una cantidad suficiente de tal manera que la velocidad de reacción del agente de detección o su derivado presente con el sustrato enzimático se determine por la cantidad de agente de detección o su derivado presente en la cámara de detección. El sustrato de la enzima puede comprender un sustrato oxidable. El sustrato oxidable puede comprender un sustrato seleccionado entre galactosa, maltosa, xilosa y ácido acético. Por ejemplo, si el agente de detección o su derivado es la glucosa oxidasa o la glucosa deshidrogenasa, el sustrato de la enzima puede comprender glucosa.

La cámara de detección puede comprender al menos un mediador que puede reaccionar con el agente de detección o su derivado para producir una señal detectable. El mediador puede comportar una cantidad suficiente de tal manera que la velocidad de reacción del agente de detección o su derivado presente con el sustrato enzimático se determine por la cantidad del agente de detección o su derivado presente en la cámara de detección. En una realización en la que se utiliza un sistema de detección electroquímica, el ferricianuro puede ser un mediador adecuado. Otros mediadores adecuados pueden comprender uno seleccionado de diclorofenolindofenol y complejos entre metales de transición y especies heteroatómicas que contienen nitrógeno. La cámara de detección puede comprender dos o más mediadores que pueden aumentar la velocidad de una reacción de detección en ciertas realizaciones.

La cámara de detección puede comprender un tampón que puede ajustar el pH de la muestra de fluido, por ejemplo, en la cámara de detección. El tampón puede estabilizar como poco uno de los reactivos en la cámara de detección durante la fabricación y/o almacenamiento. El tampón puede comprender una sustancia seleccionada de fosfato, citrato, citraconato, melitato, TRIS, PIPES, MOPS, HEPES, ftalato, imadazol.

El sustrato de la enzima, y/o el mediador, y/o los reactivos de tampón pueden estar presentes en suficiente cantidad/cantidades tal que la velocidad de reacción del agente de detección o su derivado con el sustrato de la enzima esté limitada por la cantidad del agente de detección o su derivado presente en la cámara de detección.

Puede haber un paso de muestras entre un par de cámaras a través del cual la muestra de fluido puede fluir desde una cámara a la otra. Por ejemplo, puede haber un paso de muestras 38 entre la cámara de reacción y la cámara de detección, como se ilustra en la Figura 2. El flujo a través del paso de fluido puede ser controlado por un equilibrio de fuerzas a través de, por ejemplo, una acción capilar, una presión neumática, una fuerza externa, o similares, o cualquier combinación de las mismas. El paso de fluido puede comprender un paso abierto. El paso de fluido puede comprender una entidad. La entidad puede ser semipermeable y/o puede permitir el paso de ciertas especies y bloquear otras basado en, por ejemplo, el tamaño, la carga, la osmolaridad, o similares, o cualquier combinación de los mismos. Simplemente a modo de ejemplo, una entidad de este tipo puede proporcionar un mecanismo para ciertas especies confinadas dentro de la cámara de reacción. El paso de muestras puede comprender una forma en sección transversal de forma cuadrada, rectangular, circular, oval, triangular, romboidal, trapezoidal, o similar. Una sección transversal puede ser perpendicular a la dirección del flujo de masa de la muestra de fluido desde la cámara de reacción a la cámara de detección. Las secciones transversales pueden ser uniformes en tamaño y/o forma a lo largo de la dirección del flujo de masa. Las secciones transversales pueden ser variables a lo largo de la dirección del flujo de masa. Meramente a modo de ejemplo, las secciones transversales pueden estrecharse a lo largo de la dirección del flujo de masa. El paso de fluido puede comprender una distancia capilar. La distancia capilar puede ser entre las de las dos cámaras que conecta. Se puede permitir que una muestra de fluido fluya desde una cámara a la

otra a través del paso de fluido por medio de la acción capilar sola, es decir, en ausencia de una fuerza externa. Como se usa en este documento, una fuerza externa no incluye la fuerza generada por un usuario para abrir el orificio de ventilación en la cámara de detección, por ejemplo, mediante la perforación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra de fluido puede transferirse de una cámara a la otra al abrir el orificio de ventilación en el extremo distal de la cámara de detección, por ejemplo, mediante la perforación. La fuerza capilar puede ser manipulada mediante, por ejemplo, el revestimiento sobre al menos una de la superficie interna de la cámara de llenado. Si el biosensor está configurado para utilizar una fuerza externa generada por un usuario o un aparato, tal como, por ejemplo, una bomba, una jeringa, o similares, la distancia capilar del paso de fluido puede ser mayor o menor que cualquiera de las de las cámaras que conecta.

El dispositivo puede comprender una cámara de llenado. Una ilustración ejemplar puede ser la cámara de llenado 107 en la figura 4. La cámara de llenado puede comprender al menos una superficie interna. La cámara de llenado puede comprender al menos una pared que puede definir el exterior y/o el interior de la cámara de reacción. La cámara de llenado puede comprender un interior con un volumen, al menos parte del cual puede ser accesible a la muestra de fluido. El volumen puede ser menor que aproximadamente 100 mililitros, o menos de aproximadamente 50 mililitros, o menos de aproximadamente 20 mililitros, o menos de aproximadamente 10 mililitros, o menos de aproximadamente 5 mililitros o menos de aproximadamente 3 mililitros, o menos de aproximadamente 2 mililitros, o menos de aproximadamente 1 mililitro, o menos de 500 microlitros, o menos de aproximadamente 200 microlitros, o menos de aproximadamente 100 microlitros, o menos de aproximadamente 50 microlitros, o menos de aproximadamente 10 microlitros, o menos de aproximadamente 1 microlitro, o menos de aproximadamente 0,5 microlitros, o menos de aproximadamente 0,3 microlitros, o menos de aproximadamente 0,1 microlitros.

El interior de la cámara de llenado puede comprender una forma en sección transversal de forma cuadrada, rectangular, circular, oval, triangular, romboidal, trapezoidal, o similar. Una sección transversal puede ser perpendicular a la dirección del flujo de masa de la muestra de fluido dentro de la cámara de relleno. Las secciones transversales pueden ser uniformes en tamaño y/o forma a lo largo de la dirección del flujo de masa. Las secciones transversales pueden ser variables a lo largo de la dirección del flujo de masa. Meramente a modo de ejemplo, las secciones transversales pueden estrecharse a lo largo de la dirección del flujo de masa.

La cámara de llenado puede comprender una distancia capilar. Una muestra de fluido puede ser encaminada a la cámara de llenado. La distancia capilar puede ser mayor que la de la cámara de reacción. Se puede permitir que una muestra de fluido fluya desde la cámara de llenado a la cámara de reacción a través de la acción capilar sola, es decir, en ausencia de una fuerza externa. Como se usa en este documento, una fuerza externa no incluye la fuerza generada por un usuario para abrir el orificio de ventilación en la cámara de detección, por ejemplo, mediante la perforación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra de fluido puede transferirse desde una cámara a la otra al abrir el orificio de ventilación en el extremo distal de la cámara de detección, por ejemplo, mediante la perforación. La fuerza capilar puede ser manipulada mediante, por ejemplo, el revestimiento sobre al menos una de la superficie interna de la cámara de llenado. Si el biosensor está configurado para utilizar una fuerza externa generada por un usuario o un aparato, tal como, por ejemplo, una bomba, una jeringa, o similares, la distancia capilar de la cámara de llenado puede ser menor que la de la cámara de reacción.

Al menos una superficie interna de la cámara de llenado puede ser revestida con un agente de bloqueo. El agente de bloqueo en la cámara de llenado puede ser similar al de la cámara de reacción. Al menos una superficie interna de la cámara de llenado se puede revestir con un tampón. El tampón puede ser similar al de la cámara de reacción y/o cámara de detección.

El biosensor puede comprender al menos una capa de sellado que puede evitar la fuga de la señal de fluido y/o eléctrica. Ejemplos de materiales para una capa de sellado pueden comprender, por ejemplo, plásticos (por ejemplo, PET, PETG, poliimida, policarbonato y/o poliestireno), silicio, cerámica, vidrio, y cualquier combinación de los mismos. Una capa de sellado puede comprender, o estar formada de, sustancialmente un adhesivo. Si la cámara de detección comprende una celda electroquímica, una capa de sellado se sitúa adyacente a al menos uno de los electrodos y/o las capas o películas conductoras de la electricidad. Una capa de sellado puede ser posicionada adyacente a al menos una de las primera y segunda capas o películas conductoras de la electricidad. La capa de sellado se puede colocar sobre el orificio de ventilación en el extremo distal de la cámara de detección para proporcionar una cubierta para el orificio de ventilación pre-formado. En algunas realizaciones, una portabilidad de la capa de sellado puede ser eliminando, por ejemplo, mediante perforación, para crear el orificio de ventilación cuando el aire atrapado pueda escapar de una cámara del biosensor. Una capa de sellado se puede configurar de tal manera que una porción de la capa o película conductora pueda ser expuesta para formar un área de contacto en la que el biosensor se puede conectar eléctricamente a un medidor. Dicha configuración puede comprender que la capa de sellado pueda tener un área más pequeña que la de la capa o película conductora, y/o que la capa de sellado se pueda colocar de manera que no cubra toda la capa conductora o película.

#### Método de fabricación

Meramente con el propósito de conveniencia, los métodos de fabricación de un biosensor como se describe en el presente documento se describen en términos de varios ejemplos de realización.

El biosensor 20, ilustrado en las figuras 2 y 3, comprende una cámara de detección 28 que comprende una celda electroquímica y una cámara de reacción 22 que contiene moléculas del agente de unión inmovilizado y moléculas del agente de sonda. La cámara de detección 28 y la cámara de reacción 22 se pueden preparar mediante la formación de una abertura que se extiende a través de una hoja de material separador de resistencia eléctrica 36. La  
5 abertura puede tener una forma tal que defina una pared lateral tanto de la cámara de reacción 22 como de la cámara de detección 28, así como un paso de muestras 38 entre las cámaras 22, 28. Al extender la abertura desde un extremo proximal 24 de la cámara de reacción 22 a través de un borde 37 de sensor 20, puede ser formada una entrada de muestra 25. En una realización, el espesor de la hoja 36 puede definir la altura de la cámara de reacción 22 y la cámara de detección 28, y las cámaras pueden tener una altura igual. De acuerdo con esta realización, la  
10 fuerza capilar en la cámara de detección puede ser mayor que la de la cámara de reacción. Esto puede lograrse mediante la modificación de las superficies de la cámara de reacción y/o la cámara de detección o mediante la adición de materiales de relleno, tales como los descritos en este documento, a la cámara de detección.

En otra realización, la altura de la cámara de reacción 22 puede ser 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, por ejemplo, haciendo  
15 capas de varias láminas interiores 32, 34, 36 y/o láminas de sellado externas 42, 46 juntas. Por ejemplo, en la figura 3 la lámina intermedia 36 del sensor 20 tiene una abertura que define las paredes laterales de la cámara de reacción 22 y la cámara de detección 28 como se describe anteriormente. La lámina intermedia 36 puede entonces ser intercalada entre una o más capas adicionales 32, 34, teniendo las capas adicionales 32 y 34 una abertura que  
20 corresponde únicamente a la cámara de reacción 22. Con respecto a la cámara de detección 28, las capas 32 y 34 definen las paredes extremas 60, 62 (es decir, superficies superior e inferior) de la cámara. En esta realización, las paredes extremas 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 con más detalle a continuación.

En un aspecto, los electrodos 52 y 54 pueden ser colocados en conexión eléctrica con un medidor (no mostrado) a  
25 través del extremo de conexión 66. El extremo de conexión puede permitir que un medidor (no mostrado) se conecte eléctricamente con los electrodos 52 y 54 en la cámara de detección 28 a través de pistas conductoras de la electricidad (no mostradas). El medidor en conexión con la zona 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.

El biosensor 120, ilustrado en las figuras 4, 5 y 7, o el biosensor ilustrado en la figura 6, comprende tres cámaras. El  
30 sensor puede incluir una cámara de llenado 107, además de una cámara de reacción 122 y una cámara de detección 128. El sensor 120 puede formarse a partir de múltiples capas como se describe anteriormente, incluyendo, por ejemplo, una capa de sellado 142, una capa inferior 134, una capa separadora 136, y una capa superior 132. En un aspecto, cada capa puede comprender un material aislante, mientras que las capas superior e inferior 132, 134 incluyen, además, una película eléctricamente conductora como se discute con más detalle a  
35 continuación. Mediante la eliminación de partes de las capas en diferentes puntos en el sensor, se forman una cámara de llenado 107, una cámara de reacción 122, y una cámara de detección 128. Además, la exposición de partes de la película eléctricamente conductora sobre las capas superior e inferior 132, 134 proporciona los electrodos 152, 154 para llevar a cabo las reacciones electroquímicas y proporciona las áreas de contacto eléctrico  
40 101, 102, 103 para conectar eléctricamente el sensor a un medidor.

El área de contacto 101, para poner en contacto eléctricamente una capa inferior 134 que lleva la película conductora inferior, se puede formar mediante la extensión de la capa inferior 134 hacia fuera más allá del final de una capa de separación 136 y la capa superior 132. El área de contacto 102 se puede formar mediante la  
45 eliminación de las secciones de las capas 134 y 136 para exponer una sección de la capa superior 132. El área de contacto 103 se puede formar de manera similar mediante la eliminación de una sección de la capa inferior 134 y la capa de separación 136 como se muestra en la Figura 5D (sección transversal D-D' en la Figura 4).

La cámara de llenado 107 puede estar formada mediante la eliminación de las secciones de la capa inferior 134 y la  
50 capa de separación 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 exterior de la capa 134 y puede servir, con los lados de las secciones recortadas en las capas 134 y 136 y la capa 132, para formar un canal capilar que sea capaz de extraer la muestra en ella por acción capilar. Este canal se ilustra en la Figura 5A (sección transversal A-A' en la figura 4).

La cámara de reacción 122 se puede formar mediante la eliminación de una sección de la capa de separación 136,  
55 pero dejando las capas 134 y 132 intactas. Esto puede formar un espacio capilar donde la altura de la separación capilar es menor que la altura de la cámara de llenado 122. Esto puede permitir extraer líquido de la cámara de llenado 122 en la cámara de reacción 128 por acción capilar. La pequeña altura de la cámara de reacción puede permitir relativamente una rápida mezcla de los componentes en la cámara de reacción. En un aspecto, la cámara de reacción 122 se puede abrir en el borde o bordes laterales de la tira para permitir que el aire se descargue mientras que el líquido llena la cámara de reacción.

La cámara de detección 128 se puede formar de una manera similar a la cámara de reacción 122 mediante la  
60 eliminación de una sección de la capa de separación 136, dejando las capas 134 y 132 intactas. Inicialmente, la

cámara de detección 128 puede abrirse a la cámara de reacción 122 en un extremo pero no tiene ninguna otra abertura.

5 El orificio de ventilación 130 puede estar incorporado dentro la cámara de detección 128 mediante la eliminación de secciones o perforación de la capa superior 132 (o capa inferior 134). Una capa 146, mostrada en la Figura 5B (sección transversal BB' de la Figura 4), puede ser laminada a la cara superior de la tira para sellar la abertura. Alternativamente, si se elimina una parte de la capa inferior 134, la capa de sellado 142 puede ser perforada/eliminada para abrir el orificio de ventilación 130.

10 En un aspecto, la película eléctricamente conductora que define los electrodos 52, 152, 54, 154 se puede adherir a una superficie del inmunosensor por medio de un adhesivo. Los adhesivos adecuados pueden comprender, 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 flujo caliente, y similares. En un aspecto alternativo, la película conductora de la electricidad se puede preparar por revestimiento (por ejemplo, mediante el revestimiento por bombardeo iónico o serigrafía) de una lámina de material eléctricamente resistivo con un material eléctricamente conductor adecuado, por ejemplo, platino, paladio, carbono, óxido de indio; óxido de estaño, óxidos de indio y estaño mezclados, oro, plata, iridio, mezclas de los mismos, y similares. Los materiales adecuados para uso como electrodos pueden ser compatibles con los reactivos presentes en el sensor 20, 120. Los materiales eléctricamente resistivos adecuados incluyen, por ejemplo, poliésteres, poliestirenos, policarbonatos, poliolefinas, mezclas de los mismos, y similares.

20 La raya 106 en la Figura 4 indica una rotura en la película eléctricamente conductora que define el electrodo superior 154 en la capa superior 132. La rotura puede afectarse modelando la película conductora cuando se establece o mediante la creación de la rotura durante la fabricación. La raya 106 puede verse afectada por el rayado de la película, raspando parte de la película, por grabado químico de la película, ablación láser de la película u otros métodos que se conocen comúnmente.

25 Los métodos para preparar numerosos tipos de liposomas con diferentes funcionalidades y pequeñas inclusiones de molécula son bien conocidos en la literatura. Para ejemplo, véase "Liposomes: A Practical Approach" (Segunda edición, Editores: VA Torchilin y V Weißig, Universidad de Oxford, 2003). Se puede añadir de forma indirecta un anticuerpo alternativo. Por ejemplo, un lípido biotinilado, tal como biotina DHPE (N-(biotinoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), se puede incorporar en el liposoma, a continuación, añadirse estreptavidina o avidina y, finalmente, un anticuerpo biotinilado. Además, se conocen métodos para la construcción de polímeros con fijación de molécula pequeña. Por ejemplo, véase "In Vitro Targeting of Synthesized Antibody-Conjugated Dendrimer Nanoparticles" por Thomas et al. (Biomacromolecules, 5 (6): 2269-2274, 8 de noviembre de 2004).

35 Los reactivos para su uso en el biosensor, por ejemplo, anticuerpo/antígeno inmovilizado, antígeno/anticuerpo ligado a la sonda, tampón, mediador, sustrato de la enzima, y similares, pueden ser soportado en las paredes de la cámara de reacción 22, 122 o en un soporte independiente contenido dentro de las cámaras, dentro de una matriz, o pueden ser autoportantes. Si los reactivos han de ser soportados sobre las paredes de la cámara interna o los electrodos, los productos químicos se pueden aplicar mediante el uso de técnicas de impresión, por ejemplo, impresión por chorro de tinta, serigrafía, litografía y similares. En una realización alternativa, se puede aplicar una solución que contiene el reactivo a una superficie interna dentro de una cámara y se deja secar. Un reactivo, tal como, por ejemplo, un agente de unión inmovilizado y/o un agente de sonda se pueden secar en un material de soporte independiente, que a continuación se puede colocar en la cámara de reacción. Alternativamente, ya sea el agente de unión inmovilizado o el agente de sonda, se pueden incorporar en un material de soporte independiente y el otro componente se puede apoyar en una de la pared interna dentro de la cámara de reacción. Las paredes internas de la cámara de reacción pueden ser porosas, con el agente de unión inmovilizado y/o el agente de sonda incorporado en las mismas. Esto se puede lograr mediante, por ejemplo, el uso de una membrana macroporosa para formar la pared o las paredes internas de la cámara de reacción y comprimiendo la membrana alrededor de la cámara de reacción para evitar la fuga de la muestra fuera de la zona deseada. El agente de unión inmovilizado y/o el agente de sonda pueden ser apoyados sobre perlas. Tales perlas pueden comprender un material polimérico, por ejemplo, agarosa, poliestireno, polimetacrilato, polimetacrilato de metilo, opcionalmente encerrando un material magnético (como, por ejemplo, gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). El material de perla se puede seleccionar de tal manera que puede ser proporcionado un soporte adecuado para la especie que se una. Un imán se puede incluir en un biosensor tal para mantener las perlas magnéticas en la cámara de reacción y para que dejen de pasar a la cámara de detección. Por ejemplo, el sitio de unión inmovilizado se puede colocar sobre perlas magnéticas dentro de la cámara de reacción.

#### Método de uso

55 Meramente con el propósito de conveniencia, se describen métodos de uso de un biosensor descrito en este documento en términos de las realizaciones ilustradas en las Figuras 4-7.

En uso, un usuario puede introducir primero una muestra de fluido en la cámara de llenado y/o la cámara de reacción. La muestra puede ser encaminada a la cámara de llenado y/o la cámara de reacción bajo la influencia de la acción capilar o de mecha. La muestra puede ser encaminada a la cámara de llenado y/o la cámara de reacción por una fuerza externa generada por un dispositivo tal como, por ejemplo, una jeringa, y/o una bomba, y/o el usuario.

5 La cámara de reacción puede comprender un orificio de ventilación que está abierto a la atmósfera, permitiendo así que el aire desplazado por la muestra se escape. O el llenado de la cámara de llenado y/o la cámara de reacción por una muestra de fluido puede desplazar el aire a la cámara de detección. El volumen de la cámara de reacción 122 puede ser elegido de modo que sea al menos igual y, preferentemente, mayor que el volumen de la cámara de detección 128.

10 La entrada de una muestra biológica, tal como sangre completa que contiene un analito diana, por ejemplo, un antígeno, en la cámara de reacción, puede dispersar perlas magnéticas de una superficie interna y las moléculas del agente de sonda de la otra superficie interior. Las perlas magnéticas se pueden revestir con las moléculas del agente de unión. El agente de unión puede comprender un antígeno. El agente de sonda puede comprender una pareja de unión y un vehículo. La pareja de unión puede ser un anticuerpo que pueda unirse al antígeno diana en la sangre, y pueda unirse al agente de unión inmovilizado, pero con una afinidad de unión inferior. El vehículo puede comprender, por ejemplo, PQQ encapsulado dentro de un liposoma, o la superficie de PQQ unida a un polímero, tal como un dendrímero. Cada liposoma puede encapsular una pluralidad de copias de PQQ. La presencia del analito 15 diana en la muestra puede interferir en la unión de las moléculas del agente de sonda a las moléculas del agente de unión revestidas sobre una perla magnética de una manera dependiente de la dosis.

20 Después de un tiempo dado, por ejemplo, aproximadamente dos minutos, se puede perforar un orificio de ventilación, que puede permitir la transferencia de la muestra de fluido reaccionado por acción capilar a la cámara de detección. La cámara de detección puede comprender los reactivos para la medición electroquímica de la actividad enzimática. La cámara de detección puede estar suficientemente llena, es decir, que suficiente muestra se transfiera a la cámara de detección de tal manera que la presencia del agente de sonda pueda ser detectada y analizada por el método de detección empleado.

25 Los imanes por debajo de la cámara de reacción pueden impedir la transferencia de perlas magnéticas y las moléculas del agente de sonda unidas a las perlas a través de las moléculas del agente de unión. Como resultado, en esta realización ejemplar, cuanto más analito diana haya en la muestra de fluido, menor será el número de moléculas de agente de sonda que puedan unirse a las moléculas del agente de unión inmovilizado, y mayor serán las moléculas de agente sonda que pueden pasar a la cámara de detección para ser detectadas en la cámara de detección.

30 La cámara de detección puede comprender apo-GDH y un agente de liberación que puede liberar PQQ del vehículo, y permitir la interacción con la apo-GDH. Si un vehículo contiene, por ejemplo, 100 o más moléculas de PQQ, y cada una de estas puede unirse y activar una apo-GDH, entonces, la inhibición de un único agente de sonda de anticuerpo-PQQ-liposoma que se une a las perlas magnéticas puede conducir a la activación de 100 o más moléculas de GDH. De esta manera, puede detectarse tan poco antígeno como 5 pM, por ejemplo, si por ejemplo cada liposoma contiene 100 PQQ, o 500 fM si cada uno contiene 1000 PQQ.

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para la detección de un analito diana en una muestra de fluido, comprendiendo el dispositivo:
- 5 una cámara de reacción, en donde la cámara de reacción comprende superficies internas, un agente de unión inmovilizado y un agente de sonda, comprendiendo el agente de sonda una pareja de unión y un vehículo, en donde la pareja de unión se une al vehículo, en donde el analito diana en la muestra de fluido puede reaccionar con el agente de unión o la pareja de unión; en donde el vehículo comprende una pluralidad de copias de un agente de activación;
- una cámara de detección; en donde la cámara de detección comprende un agente de detección, en donde el agente de activación puede activar el agente de detección; y
- 10 un paso de fluido entre la cámara de reacción y la cámara de detección,
- en donde el dispositivo está adaptado para mover la muestra de fluido reaccionada de la cámara de reacción a la cámara de detección a través del paso de fluido vía la acción capilar, y
- 15 en donde la presencia del analito diana en la muestra de fluido a una concentración resulta en un cambio en la cantidad del agente de sonda, unido al agente de unión inmovilizado y en la cantidad del agente de sonda no unido, que se mueve con la muestra de fluido reaccionado a la cámara de detección, en donde el cambio es detectable en la cámara de detección y dependiente de al menos un umbral de la concentración.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el agente de unión y el agente de sonda se unen a las diferentes superficies internas de la cámara de reacción.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el agente de unión comprende al menos una perla magnética.
- 20 4. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente de activación es encapsulado dentro del vehículo, en donde el vehículo comprende al menos una partícula lipídica.
5. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente de activación se une al vehículo, en donde el vehículo comprende al menos un polímero.
- 25 6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente no activado se inmoviliza en la cámara de reacción, en donde el agente no activado puede unirse a un agente de activación no unido o no encapsulado, y en donde la cámara de detección comprende un agente de liberación, en donde el agente de liberación puede liberar el agente de activación del vehículo.
7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cámara de detección comprende un agente de liberación, en donde el agente de liberación puede liberar el agente de activación del vehículo.
- 30 8. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde el agente de liberación comprende al menos un agente seleccionado de un detergente suave, un péptido lítico, una enzima, una fuente de calentamiento, enfriamiento, aplicación de ultrasonidos y luz junto con un agente de lisis fotoquímicamente activado que se incorpora en el vehículo.
- 35 9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el agente de activación comprende un cofactor para una apoenzima, en donde el agente de detección comprende la apoenzima que puede ser activada por el cofactor.
10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde hay un orificio de ventilación que se puede abrir en el extremo distal de la cámara de detección.
- 40 11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cámara de detección comprende al menos dos electrodos para la detección de una reacción electroquímica en la cámara de detección.
12. El dispositivo de la reivindicación 11, en donde al menos uno de los electrodos está formado por una capa eléctricamente conductora, y además en donde hay una rotura en la capa eléctricamente conductora que sirve para definir al menos un borde del electrodo en la cámara de detección.
13. Un método de detección de un analito diana en una muestra de fluido, que comprende:
- 45 suministrar la muestra de fluido al dispositivo de la reivindicación 1;
- permitir que una reacción proceda en la cámara de reacción entre el agente de unión y el agente de sonda, en donde la presencia del analito diana en la muestra de fluido a una concentración resulta en cambios en la cantidad del agente de sonda unido al agente de unión inmovilizado en la cámara de reacción y en la cantidad del agente de sonda no unido, en donde los cambios son dependientes de la concentración del analito diana;
- 50

mover el fluido de muestra reaccionado de la cámara de reacción a dentro de la cámara de detección por acción capilar de manera tal que el agente de sonda no unido se mueva a la cámara de detección; y

5 detectar la presencia del agente de sonda en la cámara de detección a través de un agente de detección, en donde una copia del agente de activación puede activar al menos una copia del agente de detección, en donde la presencia del agente de sonda en la cámara de detección es una medida de la concentración del analito diana unido al agente de unión inmovilizado en la muestra del fluido.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el movimiento de la muestra desde la cámara de reacción a la cámara de detección comprende la apertura de un orificio de ventilación.

10 15. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende además la cuantificación de las señales eléctricas recibidas de la cámara de detección, en donde la magnitud de las señales eléctricas depende de la concentración del analito diana en el fluido de muestra.

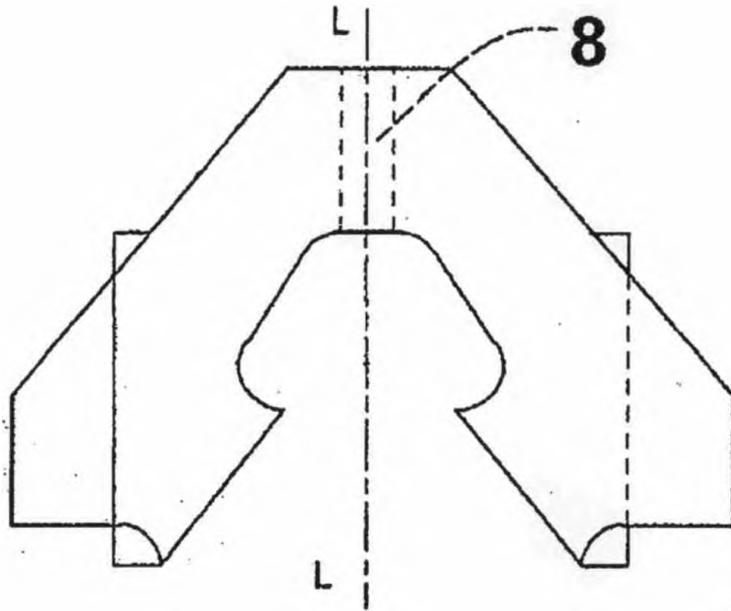


Figura 1A

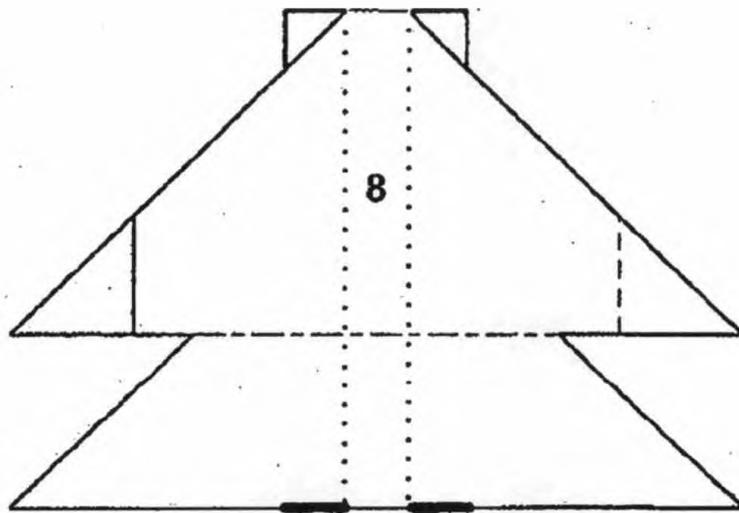


Figura 1B

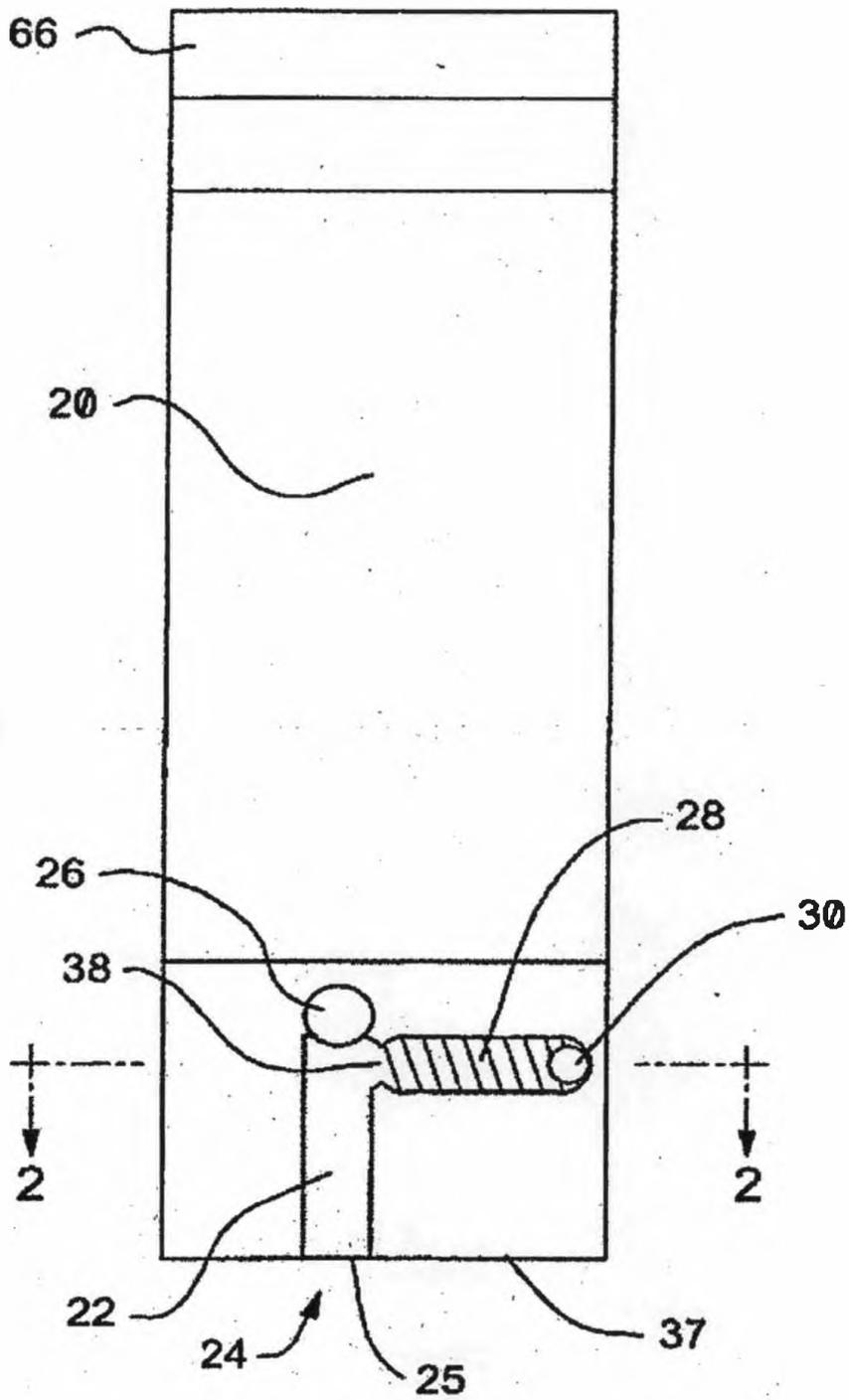


Figura 2

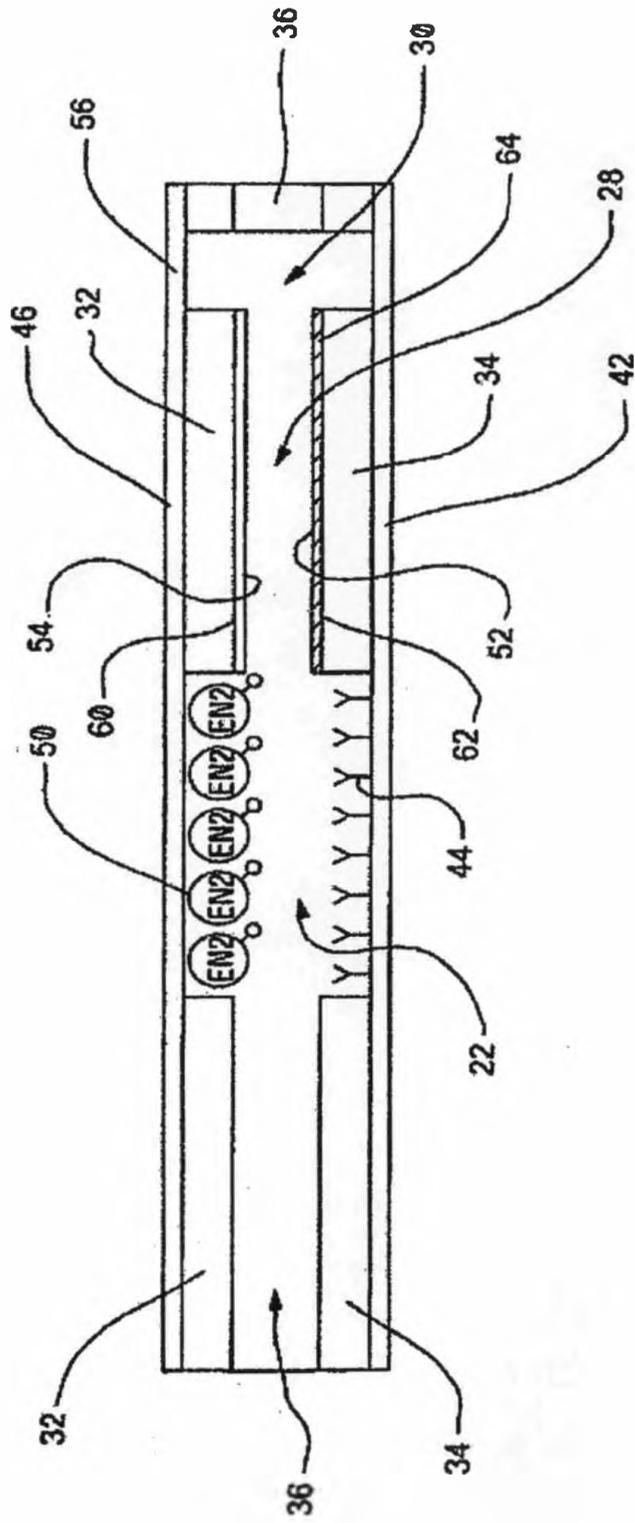


Figura 3

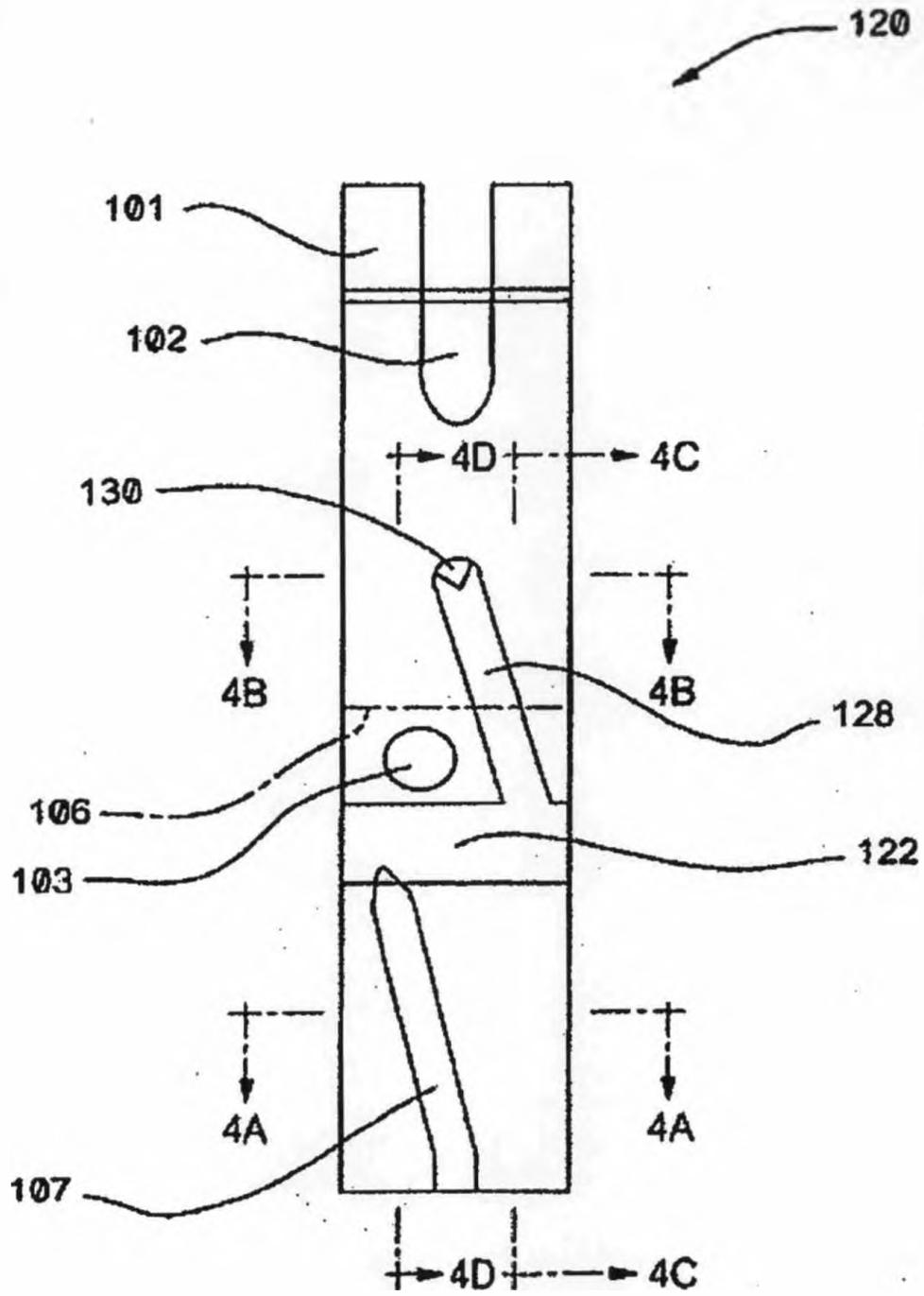


Figura 4

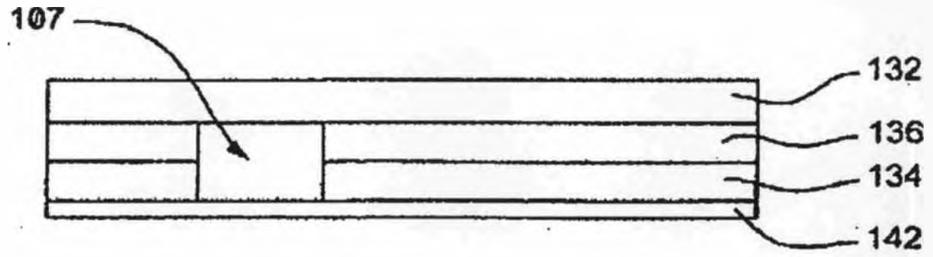


Figura 5A

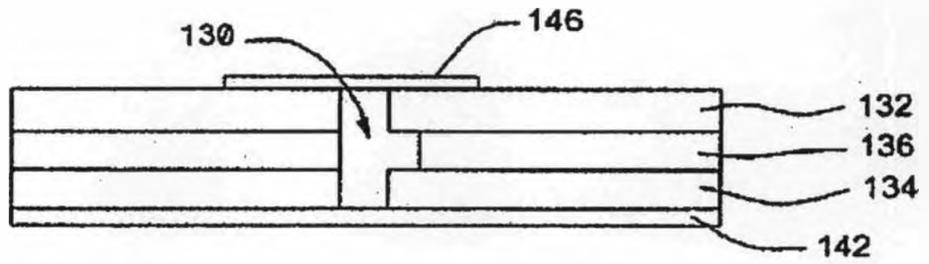


Figura 5B

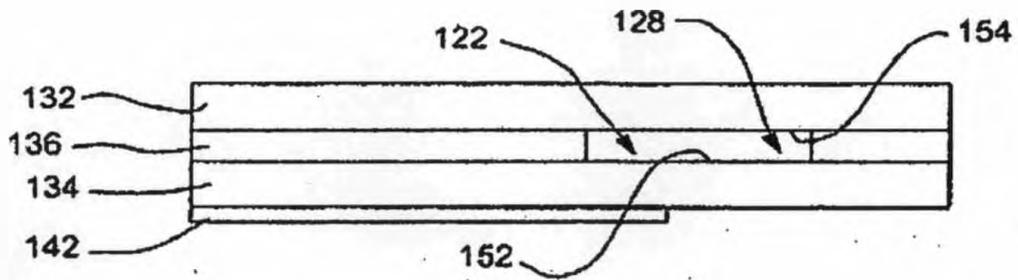


Figura 5C

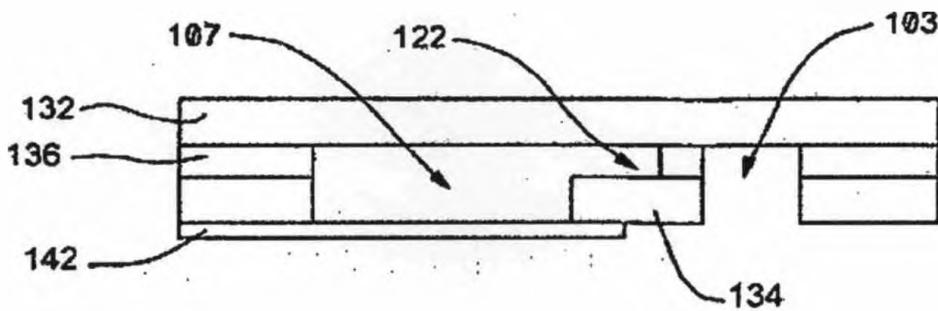


Figura 5D

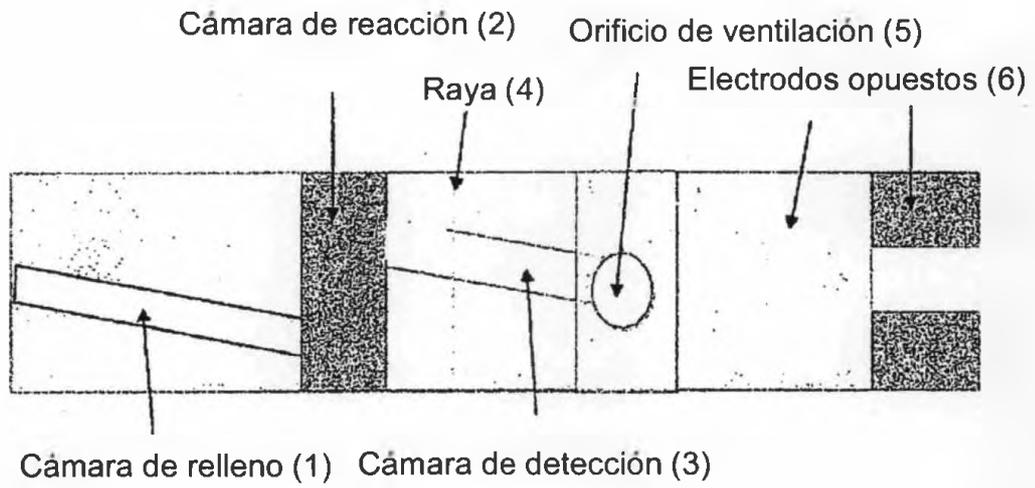


Figura 6

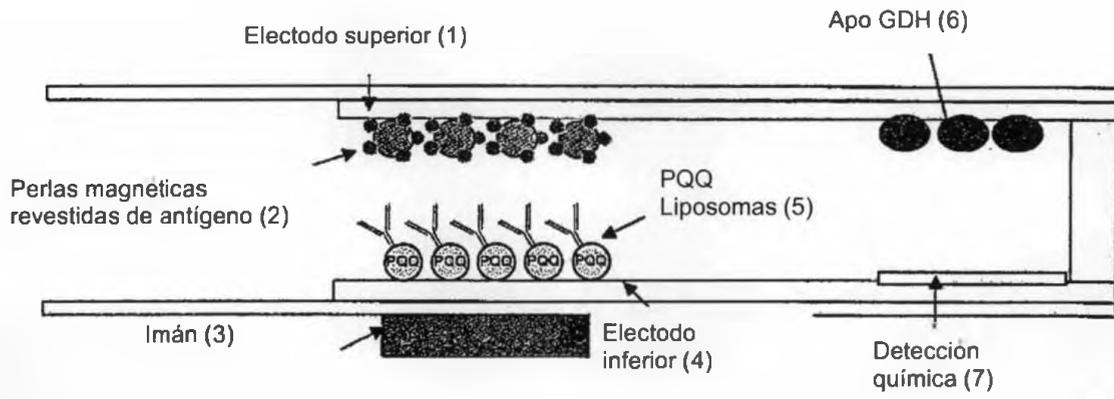


Figura 7