

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 412**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2004 PCT/AU2004/000048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2004 WO04065951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2004 E 04702612 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 1585982**

54 Título: **Procedimiento de detección electroquímica**

30 Prioridad:

20.01.2003 AU 2003900285

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSAL BIOSENSORS PTY LIMITED (100.0%)
103 RICKETTS ROAD
MOUNT WAVERLEY, VIC 3149, AU**

72 Inventor/es:

**HODGES, ALASTAIR, MCINDOE;
CHATELIER, RONALD, CHRISTOPHER y
CHAMBERS, GARRY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 639 412 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

Procedimiento de detección electroquímica

Sector técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento electroquímico para medir la formación de una barrera para limitar o reducir el movimiento de una especie electroactiva que tiene una aplicación particular para la detección de aglutinación. Una aplicación a modo de ejemplo de la invención está en las técnicas de detección de antígenos, por ejemplo, el análisis del tipo de sangre para sangre total.

Antecedentes de la Invención

10 En la técnica anterior, un modo habitual de evaluar la presencia de un antígeno en una muestra líquida es poner la muestra en contacto con anticuerpos del antígeno, de tal modo que cuando los anticuerpos se unen al antígeno se produce una aglutinación de especies en la muestra. A continuación, la aglutinación se evalúa mediante procedimientos ópticos, por ejemplo examinando la densidad óptica, la turbidez o la dispersión de luz de la muestra.

15 Por ejemplo, el documento US 6.330.058 da a conocer un procedimiento en el que se utiliza el espectro de densidad óptica sobre un intervalo predeterminado de longitudes de onda para obtener un índice de aglutinación para la muestra. El documento US 5.256.376 da a conocer asimismo una técnica fotométrica para medir la aglutinación midiendo perfiles de densidad óptica, junto con un aparato para su utilización con una centrifugadora para llevar a cabo el procedimiento. El documento US 6.046.051 da a conocer un dispositivo electrónico de un solo uso y una tarjeta de prueba para su utilización en el mismo, que lleva a cabo un ensayo de coagulación o lisis de una muestra de sangre, el documento WO 00/52456 da a conocer un procedimiento y un dispositivo de diagnóstico para su
20 utilización en la detección o cuantificación de un analito presente en una muestra líquida y el documento WO 02/48707 da a conocer procedimientos y dispositivos para detectar de manera electroquímica un cambio en la viscosidad de un fluido.

25 Las pruebas de aglutinación pueden ser cualitativas, en las que se detecta solamente la presencia o ausencia del analito, o bien cuantitativas, en las que el grado de aglutinación que se ha producido corresponde a un nivel particular del analito. En la técnica anterior, la evaluación de la aparición de aglutinación se ha llevado a cabo visualmente, utilizando luz dispersada para medir la turbidez de la solución o midiendo la densidad óptica, o similares. Estas técnicas visuales, aunque simples, son semicuantitativas en el mejor de los casos y están expuestas a errores de usuario, mientras que las técnicas de densidad óptica o de difusión, aunque son más cuantitativas y menos propensas a error, requieren la ejecución de un equipo relativamente costoso y complejo.

30 La presente invención pretende dar a conocer una alternativa a estas técnicas anteriores.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento de medición de la formación de una barrera para limitar o reducir el movimiento de una especie electroactiva, tal como se define en la reivindicación 1.

35 En algunas realizaciones, el procedimiento involucra la aplicación de un potencial suficiente para mantener la concentración de la especie electroactiva en el electrodo de trabajo.

En una realización preferida, la invención implica medir la corriente en un primer tiempo antes de que se prevea la aparición de una formación de barrera significativa en la celda, y medir de nuevo la corriente en un segundo tiempo en que se prevé la aparición de una formación de barrera significativa, y utilizar la diferencia en la corriente medida para obtener una medición de la formación de barrera.

40 En una realización preferida, el primer tiempo es el tiempo en que el cambio en un parámetro de medición de la formación de barrera es menor de aproximadamente el 20 % del cambio total en dicho parámetro cuando la barrera está totalmente formada en la muestra, y más preferentemente menor de aproximadamente el 10 % del cambio total en dicho parámetro.

45 En una realización preferida, el segundo tiempo es un tiempo en que el cambio en el parámetro de medición de aglutinación es mayor de aproximadamente el 50 % del cambio total en dicho parámetro cuando la barrera está totalmente formada en la muestra, y más preferentemente mayor de aproximadamente el 70 % del cambio total.

50 En la práctica, estos tiempos se pueden determinar considerando el intervalo posible de la cinética de formación de barrera sobre el intervalo de muestras y las condiciones de prueba a las que se va a aplicar el dispositivo, y seleccionando tiempos adecuados para todo el intervalo. Alternativamente, evaluando la velocidad de cambio del parámetro de medición de la formación de barrera con el tiempo, se pueden obtener tiempos adecuados para cada prueba individual.

Tal como resultará evidente para un experto en la materia, la propia velocidad de cambio del parámetro de medición de la formación de barrera podría ser utilizada asimismo como una medida de la presencia o ausencia, o de la concentración, de la especie de prueba de interés.

5 La diferencia en la corriente medida puede ser utilizada para obtener una medida del coeficiente de difusión de la especie electroactiva, para obtener de ese modo una medida de la formación de barrera. La diferencia en la corriente medida puede ser utilizada asimismo para obtener una medida del cambio en el coeficiente de difusión con el fin de obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.

El componente de prueba, el componente objeto y la especie electroactiva se pueden disponer en el interior de la celda de varias maneras diferentes.

10 Habitualmente, el procedimiento implicará disponer el componente objeto situando en la celda una muestra líquida que contiene el componente objeto.

La especie electroactiva se puede proporcionar mediante la reacción de formación de barrera u otra reacción entre el componente de prueba y el componente objeto.

15 Alternativamente, la especie electroactiva se puede proporcionar mediante el componente de prueba. En otra alternativa, la especie electroactiva se puede proporcionar independientemente de los componentes de prueba y objeto.

20 En una realización preferida, cuando la especie electroactiva se proporciona mediante la reacción de formación de barrera, el procedimiento implica proporcionar dos electrodos que pueden actuar como electrodo de trabajo y el componente de prueba está dispuesto en uno de los dos electrodos, implicando además el procedimiento variar las conexiones del circuito de medición del potencial o de la corriente aplicados para conmutar entre dichos electrodos de trabajo, y medir la corriente en ambos electrodos de trabajo para obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.

En algunas realizaciones, la corriente medida se puede utilizar para obtener una medida de la carga, que se utiliza para obtener la medida de la formación de barrera.

25 La invención se extiende asimismo a un aparato para medir la formación de una barrera para limitar o reducir el movimiento de una especie electroactiva, según se define en la reivindicación 20.

La celda electroquímica del aparato puede incluir un electrodo de referencia independiente. Alternativamente, el contraelectrodo puede ser un contraelectrodo/electrodo de referencia.

30 Otros detalles de construcción del aparato, así como características adicionales del procedimiento de la presente invención, resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1a y 1b muestran un aparato multicelda de una realización preferida;

la figura 2 es un gráfico de corriente para las diferentes soluciones de calcio del ejemplo 2; y

la figura 3 muestra el inmunosensor del ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención.

35 Las realizaciones de la invención se basan en el hecho de que las mediciones electroquímicas, y en particular las mediciones cronoamperométricas, pueden proporcionar información sobre la concentración y/o el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en solución. Esto se consigue aplicando un potencial entre un electrodo de trabajo y un contraelectrodo (o contraelectrodo/electrodo de referencia) suficiente para producir una corriente proporcional a la concentración de la forma reducida u oxidada de una especie electroactiva que se mide en la superficie del electrodo de trabajo por medio de la oxidación o reducción de la especie en el electrodo.

40 En muchas realizaciones, esto implica aplicar un potencial suficiente para mantener a cero la concentración de la especie electroactiva en la superficie del electrodo de trabajo.

45 La corriente que fluye como resultado de la reducción u oxidación que se produce en el electrodo de trabajo está relacionada con la velocidad de transporte de masa, que en este caso es el producto del gradiente de concentración por el coeficiente de difusión. La corriente puede ser analizada para proporcionar una medida de la concentración de la especie electroactiva, del coeficiente de difusión de la especie electroactiva en la solución, o de ambas. Por ejemplo, si se conoce la concentración de la especie electroactiva, entonces para un electrodo de trabajo aislado la corriente puede ser analizada mediante la ecuación de Cottrell, o similar, para proporcionar una medida del coeficiente de difusión. La conocida ecuación de Cottrell define una relación entre la densidad de corriente limitada por difusión y el tiempo. La densidad de la corriente de difusión es inversamente proporcional al cuadrado del

tiempo, o dicho de otro modo: el producto de $i(t) \times t^{0.5}$ es una constante. Esta constante es proporcional a la concentración del reactivo y a la raíz cuadrada del coeficiente de difusión del reactivo. Por otra parte, si el coeficiente de difusión de la especie en la muestra líquida es conocido, entonces se puede deducir la concentración.

5 En otro tipo de celda amperométrica, una celda de capa delgada, dada a conocer en la patente US 6.284.125, el electrodo de trabajo y el contraelectrodo están situados en relativa proximidad entre sí. En este caso, tanto el coeficiente de difusión de la especie electroactiva como su concentración se pueden medir sin conocer previamente ambos parámetros.

10 No se requiere en todas las realizaciones que el potencial del electrodo de trabajo se ajuste de tal modo que la concentración de la especie electroactiva en el electrodo de trabajo se mantenga a cero (es decir, el régimen normal limitado por difusión). Solamente es necesario que la corriente que fluye esté determinada, por lo menos en parte, por el transporte de masa de la especie al electrodo. Por ejemplo, el potencial del electrodo de trabajo se podría ajustar de tal modo que para una velocidad particular de transporte de masa de la especie electroactiva al electrodo, el equilibrio entre la cantidad de especie electroactiva que reacciona en el electrodo y la cantidad que llega al electrodo mediante transporte de masa tenga como resultado que la concentración de la especie electroactiva en el electrodo se mantenga, digamos, al 50 % de la concentración volumétrica de la especie electroactiva. A continuación, si el transporte de masa de la especie electroactiva al electrodo disminuye debido a la formación de barrera dentro de la muestra, el equilibrio se desplazaría al punto en el que la concentración de la especie electroactiva en el electrodo sea, digamos, del 20 % de la concentración volumétrica. Entonces, la corriente que fluye al electrodo cambiaría, tal como se indica por la ecuación de Butler-Volmer, y por lo tanto señalaría el cambio en la formación de barrera de la muestra.

20 No es necesario utilizar tensiones que produzcan una corriente continua para llevar a cabo las mediciones, pudiendo utilizarse asimismo tensiones que produzcan una corriente alterna. Por ejemplo, se puede aplicar una tensión de onda cuadrada o de onda sinusoidal. Una amplitud y una frecuencia habituales para la onda de tensión son 30 mV a una frecuencia de 5 Hz. Esto es particularmente ventajoso si uno de los electrodos entre los que se aplica la tensión está recubierto con reactivos que pueden experimentar formación de barrera y el segundo electrodo no tiene dichos reactivos presentes. En este caso, la asimetría en la señal de corriente se puede utilizar como una medida robusta de cualquier aparición de formación de barrera.

25 En las realizaciones de la presente invención, una medida de una barrera para limitar o reducir el movimiento de la especie electroactiva se obtiene entonces a partir de por lo menos una de la corriente medida, la medida de la concentración o el coeficiente de difusión, tal como se explica en mayor detalle a continuación. El procedimiento se utiliza para medir una barrera formada mediante una reacción de aglutinación.

30 Los expertos en la materia apreciarán que aunque las realizaciones de la presente invención utilizan técnicas amperométricas, se pueden utilizar asimismo técnicas coulométricas para obtener una medida de la formación de barrera -es decir, se puede medir la carga que pasa a través del electrodo de trabajo en lugar de la corriente (habitualmente, midiendo la corriente con el tiempo e integrándola para obtener la carga).

35 Las celdas amperométricas de las realizaciones de la presente invención requieren por lo menos dos electrodos, un electrodo de trabajo un contraelectrodo, que están en contacto con la muestra líquida cuando la celda está llena. Opcionalmente, puede existir asimismo un tercer electrodo, el electrodo de referencia, cuyo propósito es proporcionar un potencial de referencia con el que se puede comparar el potencial del electrodo de trabajo. En la práctica, a menudo no es necesaria en absoluto una referencia, o el contraelectrodo puede ser tal que funcione como electrodo de referencia así como contraelectrodo. En la presente memoria, excepto cuando el contexto implique lo contrario, el término "contraelectrodo" abarca tanto contraelectrodos independientes como contraelectrodos/electrodos de referencia.

40 Es necesario que por lo menos el electrodo de trabajo esté fabricado de materiales que sean inertes a la oxidación o reducción química o electroquímica bajo las condiciones de utilización. Por ejemplo, si un electrodo de trabajo se va a utilizar como ánodo, debe ser inerte a la oxidación, ya sea química o electroquímica, al potencial y en el entorno químico en el que se utilice. Si un electrodo de trabajo se va a utilizar como cátodo, debe ser entonces inerte a la reducción, ya sea química o electroquímica, al potencial y en el entorno químico en el que se vaya a utilizar. Ejemplos de materiales adecuados para utilizar en un ánodo son oro, platino, paladio, iridio, carbono grafitico, óxidos de indio, óxidos de estaño, óxidos de indio/estaño mezclados, acero inoxidable, mercurio. Son adecuadas asimismo las mezclas o aleaciones de estos materiales. Ejemplos de materiales que son adecuados para utilizar en un cátodo son todos los enumerados anteriormente como adecuados para un ánodo más, por ejemplo, cobre, acero, níquel, aluminio, cromo y plata.

45 En todas las realizaciones de la invención, un componente objeto, un componente de prueba y por lo menos una especie electroactiva están dispuestos en el interior de la celda para obtener una medida de la formación de barrera.

50 En la presente memoria, el término "componente objeto" se utiliza para referirse al objeto de la prueba de formación de barrera -es decir, el componente con propiedades desconocidas. Habitualmente, el componente objeto se proporcionará a la celda como parte de una muestra líquida en la que se va a probar la formación de barrera. La

muestra puede estar asimismo contenida dentro de un gel poroso o de una membrana microporosa. Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán que la situación se puede invertir -es decir, que el "componente objeto" puede ser sometido a prueba para determinar su capacidad para provocar la formación de barrera.

5 Análogamente, el término "componente de prueba" se utiliza para referirse al componente que tiene propiedades conocidas y se utiliza para someter a prueba el componente objeto. El componente de prueba estará presente normalmente en la celda antes de que se introduzca la muestra líquida que contiene el componente objeto. Sin embargo, éste puede asimismo añadirse a la muestra líquida antes o después de que se proporcione la muestra líquida a la celda.

10 La "especie electroactiva" es la especie que intercambia electrones en el electrodo de trabajo para provocar que fluya una corriente eléctrica en la celda.

La especie electroactiva se puede proporcionar como un producto de la reacción de formación de barrera entre los componentes de prueba y objeto. Alternativamente, se puede introducir independientemente a la muestra líquida (o, por supuesto, a la propia celda).

15 El término "componente diana" se utiliza para referirse al componente que reaccionará con el componente de prueba y que puede o no estar presente en el componente objeto.

20 El término "aglutinación" se utiliza en la presente memoria en su sentido más amplio, y se refiere a un proceso de aglomeración de especies aglutinables que comprenden sitios de unión después de su exposición a una aglutinina. Una aglutinina es una sustancia que puede interactuar específicamente con los sitios de unión en más de una especie aglutinable y reticular de ese modo la especie aglutinable, habitualmente en una configuración de tipo retícula. Seleccionando aglutininas con especificidad de unión para un analito deseado particular, es posible detectar la presencia del analito deseado dentro de una mezcla de compuestos.

25 Las reacciones de aglutinación requieren habitualmente la adaptación de las concentraciones de especie aglutinable y aglutinina. Un exceso de aglutinina saturará los sitios de unión en la especie aglutinable sin permitir la formación de reticulaciones entre la especie aglutinable. Un exceso de especie aglutinable se unirá rápidamente a toda la aglutinina y reducirá la probabilidad de reticulación entre la especie aglutinable. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente las condiciones óptimas para una reacción de aglutinación específica.

30 La reacción de aglutinación puede ser utilizada para detectar la presencia de sitios de unión de la especie aglutinable, por ejemplo un antígeno de grupo sanguíneo en la superficie de un glóbulo rojo, proporcionando una aglutinina al antígeno deseado, o para detectar la presencia de una aglutinina, por ejemplo haciendo circular anticuerpos a un marcador de la superficie celular, proporcionando la especie aglutinable apropiada. Por consiguiente, dependiendo de la aplicación, el "componente objeto" puede ser una aglutinina y el correspondiente "componente de prueba" puede ser una especie aglutinable, o alternativamente el "componente objeto" puede ser una especie aglutinable y el correspondiente "componente de prueba" una aglutinina.

35 Especies adecuadas para reacciones de aglutinación pueden incluir portadores de partículas que están recubiertos por una especie con sitios de unión específicos, tales como microesferas de látex, partículas de oro coloidal, partículas de carbón vegetal o glóbulos rojos sobre cuya superficie ha sido absorbido un antígeno. Otros portadores adecuados para las especies con sitios de unión específicos son polímeros que se pueden reticular o aglutinar para formar una barrera de difusión en la celda electroquímica. Estos polímeros pueden ser solubles o insolubles en la matriz de la muestra. Por ejemplo para muestras acuosas, ejemplos de polímeros insolubles adecuados son poliestireno, policarbonato, polisulfona. Preferentemente, estos polímeros estarían en forma de microfilamentos. Los polímeros solubles adecuados para muestras acuosas incluyen ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, sulfato de polivinilo, sulfonato de poliéster, sulfonato de poliestireno y poliestireno que contiene grupos de amonio cuaternario. Idealmente, dichas partículas o polímeros se suspenden fácilmente en solución. Otra clase de portador adecuado para el sitio de unión específico son las moléculas pequeñas en las que la presencia de la especie diana reticula las moléculas pequeñas para formar una especie mayor que puede retardar el movimiento de la especie electroactiva. Un ejemplo de dicho sistema es cuando el deoxicolato de sodio es la especie de molécula pequeña, los sitios de unión específicos son los grupos de ácido carboxílico que forman parte del deoxicolato y la especie diana es el calcio que sirve para reticular el deoxicolato. Alternativamente, la especie de aglutinación puede expresar inherentemente el antígeno en su superficie, por ejemplo antígenos de grupo sanguíneo expresados en la superficie de glóbulos rojos o antígenos de superficie expresados en microorganismos tales como bacterias u hongos, o partículas de virus.

55 Una aglutinina es una molécula que puede unir dos o más especies de aglutinación, preferentemente en partículas diferentes para permitir la reticulación entre partículas y la subsiguiente formación de retículas. Las aglutininas incluyen habitualmente inmunoglobulinas, particularmente inmunoglobulinas IgM y IgG. Dichas inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos policlonales de sueros o anticuerpos monoclonales producidos en cultivo de tejido, líquido ascítico o mediante técnicas recombinantes. Se pueden utilizar anticuerpos policlonales o una mezcla de diferentes anticuerpos monoclonales para unir diferentes epítomos antigénicos en la misma partícula. Se contemplan asimismo moléculas sintéticas que contienen secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina, tales como las moléculas que

poseen la especificidad de unión a antígeno deseada. El destinatario cualificado reconocerá que las variantes de anticuerpos artificiales que tienen la especificidad de unión de antígeno de un anticuerpo podrían asimismo participar como una aglutinina en reacciones de aglutinación. Dichas variantes incluyen moléculas quiméricas que tienen dos o más secuencias de unión de antígeno. Los sitios de unión de antígeno de dichas moléculas quiméricas pueden tener la misma especificidad de unión de antígeno, o pueden tener una especificidad de antígeno diferente. El destinatario cualificado reconocerá que una molécula quimérica podría contener sitios de unión desde anticuerpos u otras moléculas tales como lectinas, o ambos. Se pueden utilizar asimismo como aglutininas otras moléculas con especificidad de unión de antígeno. Las lectinas, por ejemplo, presentan especificidad en la unión a residuos de carbohidratos terminales, y pueden ser utilizadas como aglutininas ya sea en su forma no modificada o cuando son modificadas, por ejemplo creando dímeros u otros oligómeros o polipéptidos quiméricos que tienen múltiples sitios de unión, de tal modo que pueden interactuar con la superficie de más de una partícula antigénica en cualquier momento.

Según una realización de la presente invención, la corriente que fluye en la celda amperométrica se utiliza para obtener una medida de la formación de barrera que se ha producido en la muestra líquida. La magnitud de la corriente que fluye se puede utilizar para evaluar la presencia del grado de la formación de barrera. Por ejemplo, para volúmenes particulares de componentes objeto y de prueba, la corriente que fluye en la celda se puede calibrar para valores de formación de barrera utilizando datos experimentales. El cambio en la magnitud de la corriente con el tiempo se puede utilizar asimismo para obtener una medida del coeficiente de difusión de una especie electroactiva en la muestra o el cambio en el coeficiente de difusión de la especie electroactiva con el tiempo, para obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.

El cambio en la magnitud o la relación de magnitudes pueden ser utilizados para determinar si ha tenido lugar la formación de barrera y/o para obtener una medida de la cantidad de formación de barrera. De nuevo, estas mediciones se pueden calibrar para componentes particulares objeto y de prueba. Se puede obtener asimismo la diferencia en la formación de barrera espacialmente en la celda electroquímica. Por ejemplo, recubriendo un componente de prueba en forma de reactivos a la formación de barrera sobre o cerca de un electrodo en la celda, pero no sobre un segundo electrodo en la celda, se podría evaluar la corriente que pasa con y sin formación de barrera. En una realización de este aspecto de la invención, el potencial de un electrodo se podría ajustar de tal modo que éste sea el electrodo de trabajo en la celda, y medir la corriente que fluye. A continuación, se podrían ajustar los potenciales entre los electrodos de tal modo que un segundo electrodo pase a ser el electrodo de trabajo, y medir de nuevo la corriente. Si la muestra sobre uno de los electrodos de trabajo contiene reactivos a la formación de barrera pero no la muestra sobre el otro electrodo de trabajo, se podrían entonces comparar las dos corrientes para evaluar la formación de barrera. Esta realización tiene la ventaja de permitir variaciones en la matriz de muestra y en las condiciones ambientales de la prueba, que de lo contrario podrían afectar a la evaluación de la formación de barrera. Esta realización se puede utilizar asimismo para detectar la presencia de formación de barrera, en particular de aglutinación, de diferentes especies dentro de una única celda amperométrica. Dicha aplicación podría incluir, por ejemplo, la determinación de antígenos A, B y Rh en una única muestra de glóbulos rojos humanos utilizando tres electrodos de trabajo recubiertos con anticuerpos anti-A, anti-B o Rh.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, se utiliza una configuración de electrodos en la que dos electrodos están situados uno frente a otro. Según esta realización, un componente de prueba que contiene reactivos a la formación de barrera se recubre sobre uno de los electrodos enfrentados y un componente de prueba que no contiene reactivos a la formación de barrera se recubre sobre el otro electrodo enfrentado. El electrodos sin reactivo a la formación de barrera sería primero el electrodo de trabajo y se mediría la corriente que fluye mientras el otro electrodo actúa como contraelectrodo. A continuación se invertiría la polaridad del potencial, de tal modo que el otro electrodo enfrentado pasa a ser el electrodo de trabajo, y se mide su corriente en presencia de reactivos a la formación de barrera. Una ventaja de esta realización es que las capas de electrodo se pueden recubrir independientemente con componentes de prueba, permitiendo una fabricación sencilla y una baja probabilidad de contaminación cruzada de los componentes de prueba. Para que esta realización funcione, la especie electroactiva se tiene que unir al reactivo a la formación de barrera. Los expertos en la materia apreciarán que la reacción de unión será exclusivamente de inmovilización y no de aglutinación. En esta realización, el componente de prueba y la especie electroactiva son el mismo y el componente objeto hace que la especie electroactiva quede inmovilizada. Habitualmente, una realización de este tipo requerirá una molécula de analito por cada molécula electroactiva inmovilizada, por lo que sería solamente aplicable a analitos en mayores concentraciones.

En otra realización particularmente preferida de este aspecto de la presente invención, los dos electrodos enfrentados a los que se ha hecho mención anteriormente se sitúan de tal modo que los productos del contraelectrodo llegan al electrodo de trabajo durante la prueba, tal como en una celda de capa delgada del tipo dado a conocer en la patente US 6.284.125. En celdas tales como las dadas a conocer en la patente US 6.284.125, el coeficiente de difusión se puede medir de manera sustancialmente independiente del área de electrodo de trabajo utilizada o de la concentración de especie electroactiva presente. Utilizando alternativamente cada electrodo enfrentado como el electrodo de trabajo, uno sin reactivo a la formación de barrera recubierto sobre el mismo y uno con reactivo a la formación de barrera recubierto sobre el mismo, y analizando la corriente que fluye en cada caso para producir un coeficiente de difusión, se puede obtener una medida directa de la formación de barrera que se

produce, que es menos dependiente de errores de fabricación, en los que un electrodo puede no tener el área prevista, o de errores de usuario, tales como que el usuario llene sólo parcialmente la celda con muestra.

5 En otra realización de este aspecto de la presente invención podría utilizarse solamente un electrodo como electrodo de trabajo durante la prueba. Según esta realización, la corriente que fluye en el electrodo de trabajo se mediría un tiempo adecuadamente corto después de que la muestra haya sido introducida en la celda del sensor, y se compararía con la corriente que fluye por lo menos un tiempo mayor después de que la muestra se haya introducido en la celda del sensor. Un tiempo adecuadamente corto es un tiempo antes de que se prevea la producción de una cantidad significativa de formación de barrera en la celda en presencia del componente diana. Un tiempo
10 adecuadamente largo es uno en que se prevé que se haya producido una cantidad significativa de reacción de formación de barrera en la celda en presencia del componente diana.

Un tiempo antes de que se prevea la producción de una formación de barrera significativa es un tiempo en el que el cambio en el parámetro de medición de la formación de barrera es menor de aproximadamente el 20 %, o más preferentemente menor de aproximadamente el 10 % del cambio total en dicho parámetro cuando la barrera está totalmente formada en la muestra.

15 Un tiempo en que se prevé se produzca una formación de barrera significativa es un tiempo en el que el cambio en el parámetro de medición de la formación de barrera es mayor de aproximadamente el 50 %, o más preferentemente de aproximadamente 70 % del cambio total en dicho parámetro cuando la barrera está totalmente formada en la muestra.

20 En la práctica, estos tiempos se pueden determinar considerando el intervalo posible de la cinética de formación de barrera sobre el intervalo de muestras y las condiciones de prueba a las que se va a aplicar el dispositivo, y seleccionando tiempos adecuados para todo el intervalo. Alternativamente, evaluando la velocidad de cambio del parámetro de medición de la formación de barrera con el tiempo, se pueden obtener tiempos adecuados para cada prueba individual.

25 Tal como resultará evidente para un experto en la materia, la propia velocidad de cambio del parámetro de medición de la formación de barrera se podría utilizar asimismo como una medida de la presencia o ausencia, o de la concentración, de la especie de prueba de interés.

Comparando las corrientes medidas en los diferentes tiempos, se puede obtener una medida de la formación de barrera que se ha producido, que es menos dependiente de la matriz de muestra o de la temperatura a la que se realiza la prueba.

30 Según esta realización, en el caso en que el electrodo de trabajo está lo suficientemente alejado del contraelectrodo en la celda como para que los productos de reacción procedentes del contraelectrodo no lleguen al electrodo de trabajo durante el tiempo de la prueba, opcionalmente se podría aplicar la diferencia de potencial entre los electrodos durante un corto periodo para medir la corriente en un tiempo corto. A continuación, éste se desconectaría para permitir que se restablezcan los gradientes de concentración en la especie electroactiva. A
35 continuación, la diferencia de potencial entre los electrodos se aplicaría de nuevo durante un tiempo más largo adecuado para medir la corriente en el tiempo largo. En algunos casos, esto conduciría a una medida más precisa de la formación de barrera que se ha producido.

40 Hacer funcionar la invención según esta realización requiere que la cinética de reacción de la formación de barrera sea tal que sea lo suficientemente lenta como para permitir el tiempo suficiente para medir una señal de corriente indicativa de la muestra líquida sin una formación de barrera significativa, pero lo suficientemente rápida como para que la reacción de formación de barrera en presencia del analito se complete en un tiempo deseablemente corto.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, la formación de barrera, más específicamente la aglutinación, que se puede producir en la celda es resultado de las reacciones entre uno o varios antígenos y uno o varios anticuerpos. El componente de prueba podría ser un antígeno o bien un anticuerpo, o el antígeno o anticuerpo podría comprender parte del componente de prueba, siendo el componente diana el otro del antígeno o el anticuerpo.

50 En una realización preferida de este aspecto de la presente invención, el componente de prueba es de un tamaño adecuado y funcionalmente tal que se puede suspender en la muestra líquida sin una agitación indebida, pero lo suficientemente grande como para que pueda provocar una difusión de barrera significativa. Ejemplos de componentes de prueba adecuados son antígenos o anticuerpos unidos a un polímero que es soluble en el líquido de la muestra, o unidos a pequeñas esferas o fibras insolubles. Ejemplos de polímeros solubles adecuados son poli(ácido acrílico), poli(vinil sulfato), poli(estireno sulfonato) y alcohol polivinílico. Ejemplos de materiales adecuados para su utilización para las esferas o fibras insolubles son poliestireno, látex o poli(acrilamida). Alternativamente, el antígeno o anticuerpo puede estar sobre la superficie de celdas, tal como glóbulos rojos o células bacterianas en
55 suspensión.

No siempre es necesario que el componente de prueba sea lo suficientemente grande como para provocar por sí mismo una difusión de barrera significativa. Por ejemplo, si el componente diana fuera de un tamaño suficiente para

provocar una difusión de barrera significativa, el componente de prueba podría ser muy pequeño. Un ejemplo de dicho componente diana son antígenos sobre la superficie de células, donde el componente de prueba es un anticuerpo a los antígenos de la superficie celular y hace que las células se aglutinen. En el caso de que las partículas aglutinantes sean células u otras partículas suspendidas en la muestra antes de su introducción en la celda, sólo se requiere que las partículas sean de un tamaño y/o una densidad adecuados para que no se asienten sustancialmente en la celda durante la prueba, por lo menos en la forma no aglutinada.

En otra realización de este aspecto de la presente invención, el componente de prueba puede ser una especie que se pueda unir a una partícula relativamente grande, tal como una célula, así como al componente diana. Además, según esta realización, el componente diana se podría unir a más de un componente de prueba de tal modo que, uniéndose por lo menos a dos componentes de prueba, y donde cada componente de prueba se une asimismo a una partícula independiente, las partículas formarían una barrera.

En algunas realizaciones, un componente de prueba para procesar la muestra líquida es deshidratado en la celda electroquímica. El componente de prueba se podría deshidratar en contacto, por lo menos, con un electrodo de la celda. El componente de prueba podría comprender una especie electroactiva o especies que formen una especie electroactiva cuando entran en contacto con la muestra líquida. Alternativamente, la especie electroactiva podría estar ya presente en la muestra a someter a prueba. La especie electroactiva podría tener una concentración conocida, aunque esto no se requiere necesariamente para que algunas realizaciones de la presente invención funcionen en algunas realizaciones. Por ejemplo, si el coeficiente de difusión de la especie electroactiva se ha medido utilizando la celda de capa delgada que se ha descrito anteriormente, la medición es sustancialmente independiente de la concentración de la especie electroactiva presente. Análogamente, si se va a realizar una comparación de señales de corriente, entonces a menudo la comparación será independiente de la concentración de la especie electroactiva presente. La especie electroactiva debe ser soluble y móvil en la muestra. Ejemplos de especies electroactivas adecuados son $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, Cr^{3+} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, Cu^{2+} , $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+}$, Sn^{4+} , I^- , Br^- .

Igual que esta especie electroactiva, el componente de prueba puede contener asimismo el conjugado redox soluble oxidante o reductor para la especie electroactiva o una segunda especie electroactiva soluble, donde esta especie es necesaria para completar el circuito electroquímico al reaccionar en el contraelectrodo. Preferentemente, esta segunda especie electroactiva se presentaría en exceso con respecto a la primera especie electroactiva, de tal modo que no limitara la corriente que fluye en la celda electroquímica. En otras configuraciones, el contraelectrodo puede completar el circuito oxidando o reduciendo una especie insoluble, tal como es conocido en la técnica anterior. Ejemplos de materiales adecuados para dichos contraelectrodos son plata/cloruro de plata, plata/bromuro de plata, mercurio/cloruro de mercurio, mercurio/sulfato de mercurio.

Opcionalmente, los componentes de prueba pueden contener asimismo un tampón para controlar el PH y estabilizar los reactivos y otros aditivos diseñados para contribuir a aspectos de fabricación y usabilidad del sensor. Por ejemplo, se pueden añadir surfactantes y polímeros para mejorar el modo en que se forman reactivos deshidratados durante la fabricación y/o para mejorar el modo de llenado de la celda con la muestra, por ejemplo modificando el carácter hidrófilo de las superficies de la celda. Ejemplos de tampones adecuados son fosfatos, carbonatos, boratos, citraconato, citrato y ácido melítico. Ejemplos de surfactantes adecuados son Triton X-100, tween, Brij 35, Brij 20 plurónicos. Se debe observar que cuando la muestra líquida o los componentes de prueba de la celda a utilizar contienen proteínas, el surfactante debería ser tal que no desnaturalice las proteínas de una manera que pueda interferir con la prueba. Asimismo, en situaciones en las que hay un oxidante en los componentes de prueba que puede oxidar la hemoglobina, el surfactante no debería producir la lisis de los glóbulos rojos dado que la hemoglobina liberada se puede oxidar e interferir con la señal de corriente del sensor. No obstante, este criterio es menos importante en realizaciones en las que la medida de la aglutinación es sustancialmente independiente de la concentración de la especie electroactiva presente.

En una realización preferida para utilizar la presente invención, una muestra de líquido a someter a prueba para el componente diana se introduce en una celda que contiene por lo menos dos electrodos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo o contraelectrodo/electrodo de referencia, y componentes de prueba deshidratados. Tras llenar la celda, la muestra líquida disuelve por lo menos parcialmente los reactivos deshidratados, y si el componente diana está presente, el componente de prueba y el componente diana interactúan para formar una barrera de especie en el líquido. La producción de la formación de barrera se monitoriza midiendo características de la corriente que fluye entre los electrodos de la celda. Para que fluya corriente entre los electrodos se aplica una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y los contraelectrodos, donde la diferencia de potencial es lo suficientemente grande como para provocar la producción de una reacción de oxidación o reducción electroquímica en la interfaz electrodo de trabajo/solución y la aparición de una correspondiente reducción de la reacción de oxidación en la interfaz contraelectrodo/solución. Además, la diferencia de potencial entre los electrodos debería ser lo suficientemente alta como para mantener prácticamente a cero la concentración de la especie que se está oxidando o reduciendo en la interfaz electrodo de trabajo/solución. Un medio de medición de la formación de barrera completa habitualmente el aparato para determinar una medida de la formación de barrera a partir de la corriente.

En otras realizaciones, la muestra líquida es un gel poroso, tal como un gel de agarosa en el que tiene lugar la reacción de formación de barrera. Otra posibilidad es que la reacción de formación de barrera se produzca dentro de

una membrana microporosa sobre la que está recubierto un electrodo. Estas configuraciones pueden hacer más fácil la utilización de esferas recubiertas en el agente de formación de la barrera, dado que las esferas se podrían suspender en los poros y bloquearlos si se forma la barrera, eliminando de este modo la necesidad de que las esferas tengan que poder ser suspendidas fácilmente en la muestra.

- 5 En algunas realizaciones se incorpora más de una celda electroquímica en un único dispositivo, para permitir la medición de múltiples reacciones de formación de barrera con un dispositivo.

10 En una realización de este aspecto de la invención, las celdas electroquímicas independientes se podrían fabricar de tal modo que por lo menos alguno de los electrodos de trabajo en las celdas independientes se pueda conectar por separado a un circuito eléctrico externo. De este modo, se podría monitorizar por separado la corriente que fluye en los electrodos de trabajo conectados independientemente. Alternativamente, las celdas electroquímicas se pueden proporcionar como una micromatriz u otra estructura conocida, para proporcionar una serie de componentes de prueba.

15 En una realización preferida de este aspecto de la presente invención, los electrodos de trabajo en las celdas electroquímicas independientes están dispuestos de tal modo que todos se conectan con un circuito de medición de la corriente por medio de las mismas conexiones. Esto es particularmente preferido cuando las celdas están diseñadas para un solo uso y desecharse a continuación. Por ejemplo, el dispositivo podría ser una tira que contiene las múltiples celdas, que se introduce en un medidor, se utiliza para realizar una muestra y a continuación la tira se desecha. En dichos dispositivos de un solo uso es deseable mantener bajo el coste de suministrar la tira al usuario y la complejidad del medidor. Por lo tanto, es preferible una tira con menos conexiones al medidor.

20 Un ejemplo del procedimiento de utilización de esta realización de este aspecto de la presente invención es que la muestra se podía introducir en una primera celda y obtenerse mediciones de corriente indicativas de la producción de aglutinación, de tal modo que al término de esta parte de la prueba la corriente en la primera celda es conocida y se puede predecir en tiempos más largos.

25 A continuación, se podría llenar una segunda celda con la muestra y realizarse segundas mediciones de corriente que fueran indicativas de la producción de formación de barrera en la segunda celda. Para medir con precisión la corriente en la segunda celda, la corriente que se sabe fluye a la primera celda se restaría de la corriente total que fluye. Después de que se haya completado la medición de la producción de formación de barrera en la segunda celda, si hubiera que utilizar más celdas en el mismo dispositivo, la corriente que fluye a la primera y la segunda celdas tiene que estar en un estado conocido, de tal modo que se pueda restar de la corriente que fluye cuando se llena la tercera celda, y así sucesivamente.

30 En una realización preferida del dispositivo multicelda, la celda podría ser una celda electroquímica de capa delgada, de tal modo que después de un tiempo adecuado, la corriente que fluye a cualquiera de las celdas que anteriormente se han llenado y han formado barrera es sustancialmente constante, permitiendo una resta más precisa de las corrientes que fluyen a las celdas llenadas anteriormente respecto de la que fluye a la última celda llenada.

35 Para mostrar aspectos de la presente invención, se proporciona un ejemplo de una aplicación para determinar el tipo sanguíneo. En esta aplicación, es habitual obtener la presencia o ausencia de tres antígenos sobre la superficie de glóbulos rojos para determinar el tipo sanguíneo. Los antígenos son antígeno-A, antígeno-B y antígeno-Rh.

40 Según las realizaciones de la invención, las mediciones necesarias se podrían realizar con tres dispositivos independientes, o más preferentemente mediante un único dispositivo con tres celdas en el mismo dispositivo, denominado en este caso una tira. En el caso de celdas en tiras independientes, o en la misma tira, una celda podría contener un primer componente de prueba en forma de un anticuerpo al antígeno-A, una segunda celda podría contener un anticuerpo al antígeno-B (un segundo componente de prueba) y la tercera celda un anticuerpo al antígeno-Rh (un tercer componente de prueba). En uso, la tira se podría introducir en un medidor que tenga un dispositivo de conexión que conecta los electrodos de la tira a un circuito eléctrico. El circuito eléctrico se podría completar mediante una fuente de alimentación eléctrica que pueda por lo menos aplicar el potencial deseado entre los electrodos y medir la corriente resultante. En una realización preferida, el medidor incluye asimismo un medio de medición de la aglutinación que tiene la capacidad de analizar las señales de corriente medidas, presentar un resultado, almacenar los resultados e interactuar con otro equipamiento. El medio de medición de la aglutinación puede ser un amperímetro modificado. El medidor puede incluir un medio de muestreo para extraer mediciones de corriente en tiempos deseados.

45 En este ejemplo, los electrodos de las celdas podrían estar situados en enfrentamiento mutuo y a una separación de aproximadamente 100 micras. Un reactivo que comprende 10 mM de ferrocianuro de potasio se recubriría sobre el electrodo superior en la totalidad de las tres celdas y unos reactivos que comprenden 100 mM de ferricianuro de potasio y anticuerpo se recubrirían sobre el electrodo inferior. El anticuerpo es para el antígeno-A en la primera celda, el antígeno-B en la segunda celda y el antígeno-Rh en la tercera celda.

55 En uso, el usuario llena la primera celda con una muestra de sangre total (el componente objeto) y se aplica un potencial de 300 mV entre los electrodos, de tal modo que el electrodo superior es el ánodo y por lo tanto el

electrodo de trabajo, y el electrodo inferior es el cátodo y por lo tanto el contraelectrodo. Se registra la corriente, y después de unos pocos segundos la corriente se compara con la corriente registrada en un tiempo suficientemente largo como para que haya tenido lugar cualquier reacción de aglutinación. Al no haber reactivo de aglutinación en el electrodo de trabajo se retarda la aparición de la reacción de aglutinación cerca del electrodo de trabajo, permitiendo el tiempo suficiente para registrar una corriente indicativa de la muestra no aglutinada. Si la relación entre la corriente medida en tiempos largos y la medida en un tiempo corto es menor que un valor umbral predeterminado, se detecta entonces la presencia del antígeno-A (el componente diana).

Una vez ha transcurrido un tiempo adecuado para la detección del antígeno-A en la muestra en la primera celda si está presente, el medidor indicaría al usuario llenar la segunda celda con otra muestra de la misma sangre. Se debe observar que en este momento la corriente en la primera celda es un valor estacionario o bien cambia con el tiempo de manera predecible. Una vez que el usuario llena la segunda cavidad con la muestra, se registra una segunda traza de corriente que corresponde a la corriente total que fluye a la primera y la segunda celdas. El medidor resta a continuación la corriente conocida de la primera celda para obtener una corriente para la segunda celda. Igual que antes, esta corriente se examina en tiempos cortos y en tiempos largos para detectar si se está produciendo aglutinación.

Después de un tiempo apropiado para la detección del antígeno-B en la segunda celda, el medidor indica al usuario que llene la tercera cavidad con otra muestra de la misma sangre, y las corrientes conocidas en la primera y la segunda celdas se restan de la corriente total para proporcionar la corriente en la tercera celda. La corriente se examina igual que antes para detectar si se está produciendo aglutinación.

A partir de los tres resultados, se pueden determinar los tipos de sangre A, B, AB y O así como si la sangre que se está analizando es Rh positiva o negativa.

Se debe observar que la muestra de sangre podría ser capilar, venosa o arterial.

Realización preferida de la invención

Se muestra una tira multicelda adecuada en las figuras 1a y 1b. La figura 1a muestra una vista superior del dispositivo, la figura 1b muestra una vista en sección transversal (no a escala) del dispositivo.

La tira 10 tiene celdas 1, 2 y 3 formadas en la misma mediante recortes en una capa separadora aislante 20 interpuesta entre las capas superior e inferior 21 y 22 que tienen capas de electrodo 23 y 24 recubierta sobre sus superficies interiores. Están dispuestos puntos de conexión 4 para conectar las capas de electrodo a un circuito eléctrico externo en un medidor (no mostrado). Un experto en la materia puede conseguir fácilmente un circuito apropiado para llevar a cabo las mediciones necesarias. Unos componentes de prueba (no mostrados) son deshidratados sobre la superficie interior de las capas 23 y 24 en alineación con las cavidades 1, 2 y 3.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Un sensor de aglutinación para calcio

Se desarrolló un sensor de aglutinación para calcio como un modelo para determinar la eficiencia de la presente invención.

Se prepararon electrodos de oro pulverizando un recubrimiento de oro de 30 nm de grosor sobre Melinex 453® de 0,007" de grosor.

Se preparó una solución consistente en 44 mg/mL de deoxicolato de sodio, 214 mM de ferricianuro de potasio y PE6200 plurónico al 0,11%, en 27% de etanol/1,5% de alcohol isopropílico/71,5% de agua. Esta solución se recubrió sobre el electrodo de oro y se deshidrató.

Se recortó un orificio rectangular de una cinta adhesiva de doble cara de 107 μm de grosor. La cinta se laminó en el electrodo de oro, de tal modo que el orificio se superpuso sobre la sustancia química deshidratada. Un segundo electrodo de oro recubierto con los reactivos anteriores se laminó en el otro lado de la cinta, formando de ese modo una celda electroquímica con electrodos enfrentados. El laminado se cortó de tal modo que el área del electrodo quedó bien definida (0,0985 cm²), y existían aberturas en los extremos del orificio rectangular que servían como orificio de entrada de muestra y de salida de aire para el llenado del sensor.

Los dos electrodos se acoplaron a un potencióstato y se cargó en la celda electroquímica una solución de 9 mM de ferrocianuro de potasio que contenía 0-30 mM de CaCl₂. Se aplicó un potencial de -0,3 V durante 25 segundos y a continuación de +0,3 V durante 10 segundos. La corriente se midió 0,1 segundos después de aplicar +0,3V. En la figura 2 se muestra la corriente para las diversas soluciones con contenido de calcio.

Ejemplo 2 - Sensor para la actividad proteolítica de la renina

Se proporcionó un tipo independiente de reacción de aglutinación mediante la acción de la enzima renina en la leche. La renina se adhiere a un péptido fosforilado hidrófilo de la caseína en la leche para generar una proteína insoluble. Esta proteína se aglutina a continuación y puede formar yogur o queso después de un proceso adicional.

- 5 Un sensor para renina se proporcionaría deshidratando leche o caseína mezclada con una especie electroactiva en una celda electroquímica. Si un líquido introducido en la celda contiene renina activa, la aglutinación resultante se puede medir entonces aplicando una tensión entre los electrodos y analizando las corrientes transitorias.

Ejemplo 3

El ensayo de enzimas descrito en el ejemplo 2 se puede utilizar en un inmunoensayo que se lleva a cabo en una única cámara, no involucra etapas de lavado y no tiene una etapa de temporización fija.

- 10 Las características de este inmunoensayo se muestran en la figura 3. El sensor consiste en una única cámara con una superficie superior 30, que puede ser un electrodo o un polímero plano u otra superficie, y un electrodo inferior 31. El electrodo inferior 31 tiene un recubrimiento de caseína (proteína de la leche). La superficie superior 30 tiene un recubrimiento de anticuerpos inmovilizados 33 (mostrado como la estructura en forma de Y), con conjugados antígeno-renina 34 unidos de manera no covalente a los sitios de unión de antígeno en el anticuerpo, para formar
15 una capa de anticuerpo-antígeno-renina. Una mezcla de una forma oxidada y reducida de un par redox, por ejemplo una mezcla de ferricianuro y ferrocianuro, se recubre sobre el electrodo inferior y/o superior/la superficie.

- 20 Cuando se introduce en la cámara un fluido con una concentración desconocida del antígeno, el antígeno libre puede "competir" con los conjugados de unión antígeno-renina. A continuación, el conjugado se difunde a la capa de caseína e inicia la coagulación de la caseína formando una capa de barrera junto al electrodo inferior 31. El proceso de aglutinación se puede seguir continuamente aplicando una tensión fija y monitorizando la corriente, o el coeficiente de difusión de la especie redox reducida o oxidada se puede monitorizar en diversos tiempos aplicando una secuencia de pulsos de tensión, tal como se describe en otro lugar en esta solicitud, o la polaridad de la tensión se puede invertir rápidamente y monitorizar los picos de corriente con el tiempo. La magnitud y, opcionalmente, la
25 velocidad de cambio de la corriente que fluye en el electrodo inferior corresponderá a la extensión de la aglutinación que avanza con el tiempo, que a su vez será proporcional a la cantidad de conjugados antígeno-renina que llegan a la capa de caseína. A su vez, ésta será proporcional a la concentración de antígeno que había en la solución de muestra.

- 30 Resultará evidente para un experto en la materia que se pueden realizar diversas modificaciones a la presente invención, y se debería considerar que estas quedan dentro del alcance de la invención descrita en la presente memoria.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de medición de la formación de una barrera para limitar o reducir el movimiento de una especie electroactiva, comprendiendo el procedimiento:
- 5 proporcionar una celda electroquímica (1, 2, 3) que tiene un electrodo de trabajo (23) y un contraelectrodo (24) separado del electrodo de trabajo (23);
- proporcionar un componente objeto, un componente de prueba y por lo menos una especie electroactiva en el interior de la celda,
- caracterizado por que** los componentes objeto y de prueba están destinados a provocar la formación de una barrera mediante una reacción de aglutinación para limitar o reducir el movimiento de la especie electroactiva y el componente de prueba está dispuesto en el electrodo de trabajo;
- 10 y el procedimiento comprende aplicar un potencial entre el electrodo de trabajo (23) y el contraelectrodo (24), suficiente para producir una corriente relacionada con la velocidad de transporte de masa de la especie electroactiva que se está midiendo al electrodo de trabajo (23); y
- medir la corriente en el electrodo de trabajo para obtener una medida de la formación de la barrera para limitar o reducir el movimiento de la especie electroactiva desde el componente objeto y el componente de prueba en el electrodo de trabajo.
- 15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el potencial aplicado es suficiente para mantener la concentración de la especie electroactiva en el electrodo de trabajo (23).
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de medir la corriente comprende medir la corriente en un primer tiempo antes de que se prevea la producción de una formación de barrera significativa en la celda (1, 2, 3) y medir de nuevo la corriente en un segundo tiempo en el que se prevé la producción de una formación de barrera significativa, y obtener dicha medida de la formación de barrera a partir de la diferencia en la corriente medida.
- 20 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, que comprende seleccionar el primer tiempo para que sea un tiempo en que el cambio en el parámetro de medición de la formación de barrera es, o se prevé que sea menor de aproximadamente el 20 % del cambio total en dicho parámetro cuando la barrera se ha formado completamente.
- 25 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que el cambio en el parámetro de medición de la formación de barrera es menor de aproximadamente el 10 % del cambio total.
6. Un procedimiento según la reivindicación 3, que comprende seleccionar el segundo tiempo para que sea un tiempo en que el cambio en el parámetro de medición de la formación de barrera es, o se prevé que sea mayor de aproximadamente el 50 % del cambio total en dicho parámetro cuando la barrera se ha formado completamente.
- 30 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que el cambio en el parámetro de medición de la formación de barrera es mayor de aproximadamente el 70 % del cambio total.
8. Un procedimiento según la reivindicación 3, que comprende seleccionar dichos primer y segundo tiempos evaluando la velocidad de cambio del parámetro de medición de la formación de barrera con el tiempo.
- 35 9. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la diferencia en la corriente medida se utiliza para obtener una medida del coeficiente de difusión de la especie electroactiva, con el fin de obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.
10. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la diferencia en la corriente medida se utiliza para obtener una medida del cambio en el coeficiente de difusión, con el fin de obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.
- 40 11. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de proporcionar el componente objeto se lleva a cabo introduciendo en la celda (1, 2, 3) una muestra líquida que contiene el componente objeto.
12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que la etapa de proporcionar el componente de prueba se lleva a cabo introduciendo el componente de prueba en la muestra líquida antes de que se introduzca la muestra líquida en la celda (1, 2, 3).
- 45 13. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que las etapas de proporcionar el componente de prueba se lleva a cabo introduciendo el componente de prueba en la celda (1, 2, 3) antes de que se introduzca la muestra líquida.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, en el que el componente de prueba se introduce en la celda deshidratando el componente de prueba en la celda (1, 2, 3).
- 50

15. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende proporcionar dicha especie electroactiva por medio de una reacción entre el componente de prueba y el componente objeto.
16. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende proporcionar dicha especie electroactiva por medio del componente de prueba.
- 5 17. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la especie electroactiva se proporciona mediante la reacción de formación de barrera, comprendiendo además el procedimiento proporcionar dos electrodos que pueden actuar como electrodo de trabajo (23), y en el que el componente de prueba está dispuesto en uno de los dos electrodos, comprendiendo además el procedimiento variar las conexiones del circuito de medición del potencial o de la corriente aplicados con el fin de conmutar entre dichos electrodos de trabajo (23), y medir la corriente en 10 ambos electrodos de trabajo para obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.
18. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la corriente se mide para obtener una medida de la carga con el fin de obtener la medida de la formación de barrera.
19. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que los componentes objeto y de prueba están destinados a 15 provocar la formación de una barrera cuando dicho componente objeto comprende un componente diana, y en el que el procedimiento comprende además determinar si dicho componente diana está presente a partir de la medida de la formación de la barrera.
20. Aparato para medir la formación de una barrera para limitar o reducir el movimiento de una especie electroactiva, que tiene:
- 20 una celda electroquímica (1, 2, 3) que tiene un electrodo de trabajo (23) y un contraelectrodo (24) separado del electrodo de trabajo (23), estando adaptada la celda electroquímica (1, 2, 3) para recibir un componente objeto, un componente de prueba y por lo menos una especie electroactiva dentro de la celda;
- una fuente de alimentación eléctrica para aplicar un potencial; y
- una amperímetro para medir la corriente en el electrodo de trabajo,
- 25 **caracterizado por que** los componentes objeto y de prueba están destinados a provocar la formación de una barrera mediante una reacción de aglutinación para limitar o reducir el movimiento de dicha por lo menos una especie electroactiva y el componente de prueba está dispuesto en el electrodo de trabajo;
- aplicando la fuente de alimentación eléctrica el suficiente potencial entre el electrodo de trabajo (23) y el contraelectrodo (24) para producir una corriente relacionada con la velocidad de transporte de masa de la especie electroactiva que se está midiendo al electrodo de trabajo (23);
- 30 y
- comprendiendo el aparato un medio de medición de la formación de barrera configurado para determinar una medida de la formación de una barrera al movimiento de dicha por lo menos una especie electroactiva a partir de la corriente medida desde el componente objeto y el componente de prueba dispuesto en el electrodo de trabajo.
- 35 21. Aparato según la reivindicación 20, en el que el medio de medición de la formación de barrera es un medio de medición de la aglutinación para determinar una medida de la aglutinación, formando dicha aglutinación dicha barrera.
22. Aparato según la reivindicación 20, en el que la celda electroquímica (1, 2, 3) comprende además un electrodo de referencia independiente.
- 40 23. Aparato según la reivindicación 20, en el que el contraelectrodo (24) puede ser un contraelectrodo/electrodo de referencia.
24. Aparato según la reivindicación 20, que comprende además medios de detección para determinar la presencia de un componente de prueba en base a la medida de la formación de barrera cuando dicho aparato se utiliza para detectar la presencia de un componente diana en el componente objeto.
- 45 25. Aparato según la reivindicación 20, en el que dicho amperímetro está configurado para medir la corriente en un primer tiempo antes de que se prevea la producción de una formación de barrera significativa en la celda (1, 2, 3) y en un segundo tiempo en el que se prevé la producción de una formación de barrera significativa, y para obtener dicha medida de la formación de barrera a partir de la diferencia en la corriente medida.
- 50 26. Aparato según la reivindicación 20, que comprende además medios de muestreo para muestrear la corriente procedente del amperímetro en un primer tiempo y un segundo tiempo, siendo el primer tiempo antes de que se prevea la producción de una formación de barrera significativa en la celda (1, 2, 3) y siendo el segundo tiempo un tiempo en el que se prevé la producción de una formación de barrera significativa, y en el que el medio de medición

de la formación de barrera determina una medida de la formación de una barrera a partir de la diferencia en la corriente.

5 27. Aparato según la reivindicación 20, en el que dicho medio de medición de la formación de barrera determina una medida del coeficiente de difusión de la especie electroactiva a partir de la medida de la corriente, con el fin de obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.

28. Aparato según la reivindicación 20, en el que el medio de medición de la formación de barrera utiliza la diferencia en la corriente medida para obtener una medida del cambio del coeficiente de difusión con el fin de obtener de ese modo una medida de la formación de barrera.

10 29. Aparato según la reivindicación 20, en el que el aparato comprende dos electrodos que pueden actuar como electrodo de trabajo (23), medios para variar las conexiones del circuito de medición del potencial o de la corriente aplicados con el fin de conmutar entre los electrodos de trabajo (23) para obtener una medida de la corriente en ambos electrodos de trabajo (23) y el componente de prueba está dispuesto en uno de los dos electrodos.

Figura 1A

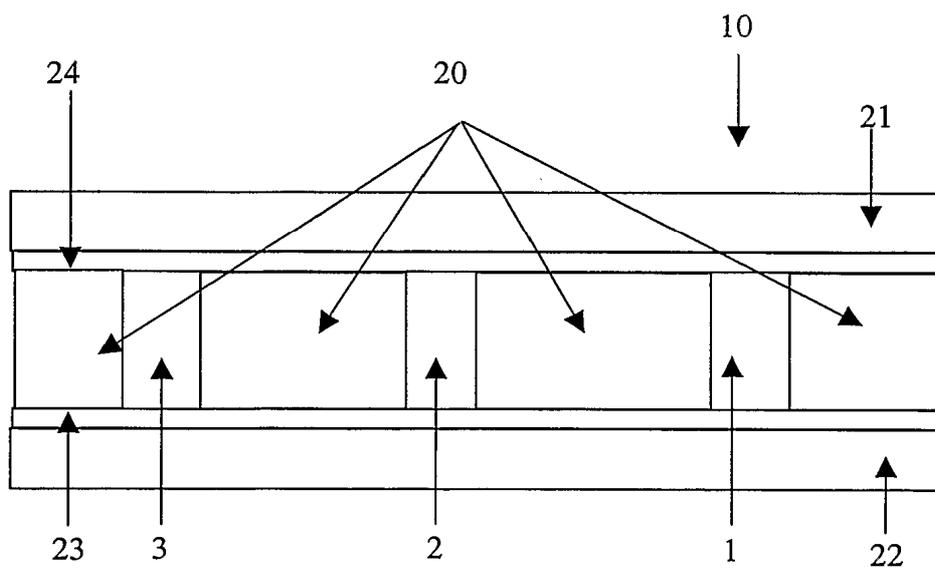
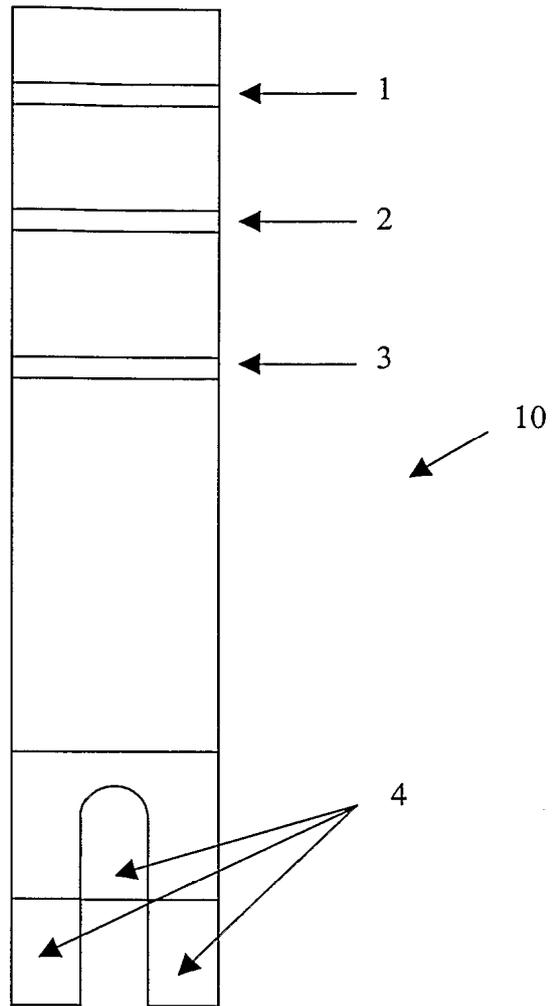


Figura 1B

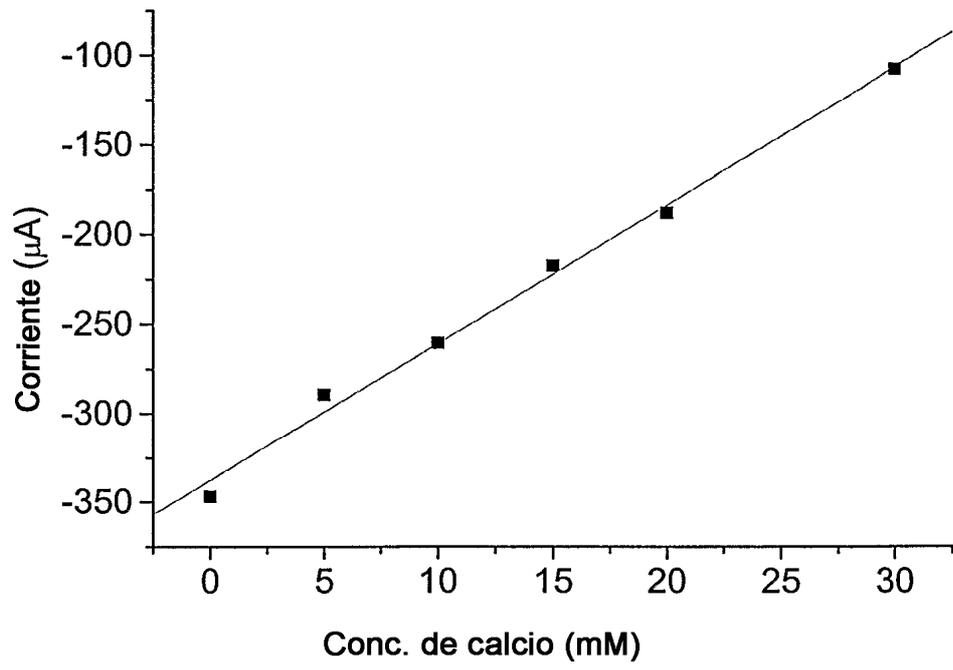


Figura 2

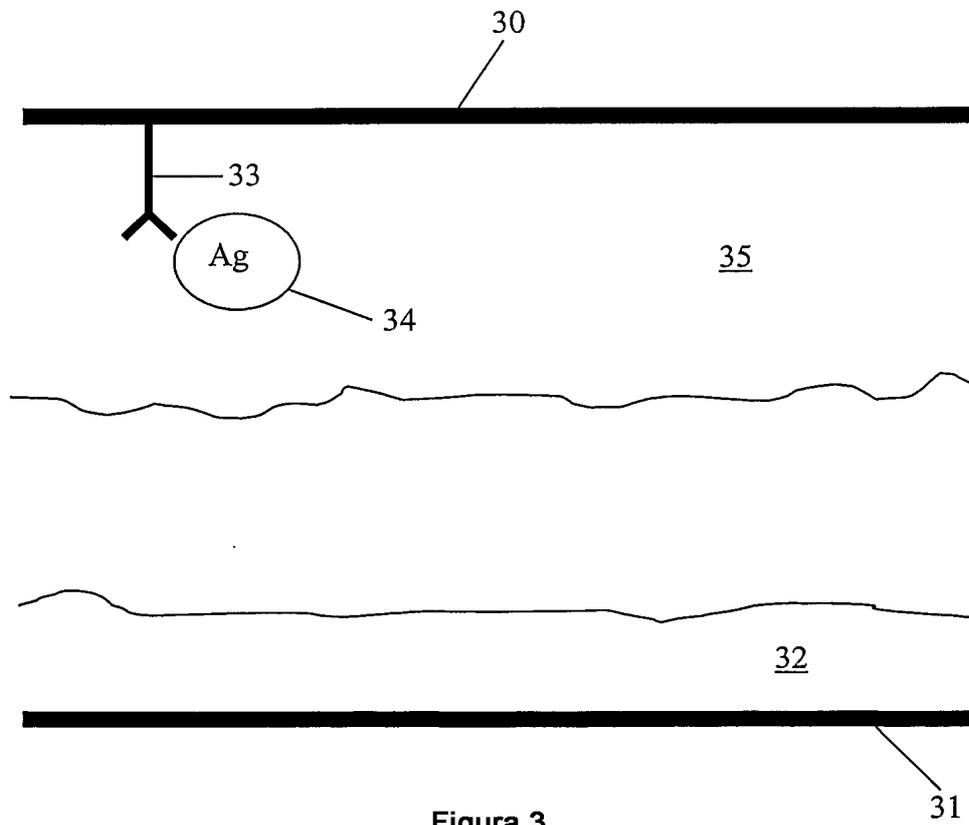


Figura 3