

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2006.11.21</b>	(73) Titular(es): <b>UNIVERSAL BIOSENSORS PTY LTD.</b> <b>1 CORPORATE AVENUE ROWVILLE, VIC 3178</b> <b>AU</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.11.21 US 284097</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.05.23</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.05.11</b> <b>134/2011</b>	(72) Inventor(es): <b>ALASTAIR HODGES</b> AU <b>DENNIS RYLATT</b> AU <b>RONALD CHATELIER</b> AU
	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, N.º. 69 1250-148 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO BIOSENSOR E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

SÃO, AQUI, APRESENTADOS MÉTODOS E DISPOSITIVOS PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM ANALITO DE INTERESSE. UM DISPOSITIVO BIOSENSOR PODE INCLUIR UMA CÂMARA DE REACÇÃO E UMA CÂMARA DE DETECÇÃO ELECTROQUÍMICA. A CÂMARA DE REACÇÃO PODE INCLUIR, PELO MENOS, UM SÍTIO DE LIGAÇÃO IMOBILIZADO E UM CONJUGADO DE Sonda ADAPTADO PARA LIGAR-SE A, PELO MENOS, UM DOS ANALITOS ALVO E AO SÍTIO DE LIGAÇÃO IMOBILIZADO, ENQUANTO A CÂMARA DE DETECÇÃO PODE INCLUIR ELÉCTRODOS PARA DETECÇÃO DE UMA REACÇÃO ELECTROQUÍMICA. SE PRESENTE, O ANALITO ALVO NA AMOSTRA LÍQUIDA RESULTA NUMA ALTERAÇÃO NA QUANTIDADE DE CONJUGADO DE Sonda LIGADO NA CÂMARA DE REACÇÃO, O QUAL PODE SER DETECTADO ELECTROQUIMICAMENTE NA CÂMARA DE DETECÇÃO.

**RESUMO****"DISPOSITIVO BIOSENSOR E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO"**

São, aqui, apresentados métodos e dispositivos para detectar a presença de um analito de interesse. Um dispositivo biossensor pode incluir uma câmara de reacção e uma câmara de detecção electroquímica. A câmara de reacção pode incluir, pelo menos, um sítio de ligação imobilizado e um conjugado de sonda adaptado para ligar-se a, pelo menos, um dos analitos alvo e ao sítio de ligação imobilizado, enquanto a câmara de detecção pode incluir eléctrodos para detecção de uma reacção electroquímica. Se presente, o analito alvo na amostra líquida resulta numa alteração na quantidade de conjugado de sonda ligado na câmara de reacção, o qual pode ser detectado electroquimicamente na câmara de detecção.

## DESCRIÇÃO

### "DISPOSITIVO BIOSSENSOR E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO"

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os sensores biomédicos convencionais, incluindo os sistemas baseados em imunoensaios, têm sido utilizados para reportar a presença e/ou concentração de uma vasta variedade de analitos. Os imunoensaios são, geralmente, classificados em duas categorias: ensaios competitivos e ensaios sanduíche. Num ensaio competitivo, o antigénio na amostra de ensaio é misturado com um complexo de sonda de antigénio (comumente denominado complexo repórter) competindo a mistura, então, pela ligação ao anticorpo. A amostra pode ser um radioisótopo, um fluoróforo ou um cromóforo. Num imunoensaio tipo sanduíche, o antigénio na amostra de ensaio liga-se ao anticorpo e, em seguida, um segundo complexo de sonda contendo o antigénio liga-se ao anticorpo. Nestes métodos de ensaio da técnica anterior tornam-se necessárias, geralmente, uma ou mais etapas de lavagem. As etapas de lavagem tornam o procedimento de ensaio mais complexo e podem gerar resíduos líquidos biologicamente perigosos.

Regra geral, os imunoensaios fornecem a um utilizador um resultado qualitativo (por exemplo, uma "resposta de sim/não") que é obtido, frequentemente, por uma detecção visual simples (por exemplo, uma alteração de cor) ou um

resultado quantitativo que poderá ser uma concentração de um antigénio. A maior parte dos métodos quantitativos envolve peças de equipamento dispendiosas, tais como contadores de cintilação (para monitorizar a radioactividade), espectrofotómetros, espectrofluorímetros, (consultar, por exemplo, a U.S. Pat. No. 5.156.972), instrumentos de ressonância de plasma de superfície (consultar, por exemplo, a U.S. Pat. No. 5.965.456) e outros semelhantes. Seria, por conseguinte, vantajoso desenvolver um imunoensaio que seja tanto económico como de utilização suficientemente simples, que o torne apto para utilização tanto em casa como em campo. Um biossensor deste tipo não iria requerer, preferencialmente, qualquer centrifugação, diluição, pipetagem, lavagem ou etapas de temporização, e iria gerar apenas um mínimo de resíduos.

Tanto a WO-A-02/08763, como a EP-A-1347302, descrevem dispositivos sensores que empregam reacções antigénio-anticorpo e englobam uma câmara de reacção e uma câmara de detecção.

### **RESUMO DA INVENÇÃO**

São, aqui, apresentados dispositivos biossensores e métodos para detecção e/ou quantificação de analitos de interesse. A presente invenção faculta um biossensor para utilização na detecção de um analito alvo numa amostra de líquida, tal como o definido na reivindicação 1. Quando é

introduzida uma amostra na câmara de reacção, ocorre uma reacção de ligação entre o alvo de ligação imobilizado, o conjugado de sonda e/ou o analito alvo (se presente). Numa realização exemplar, se o analito alvo estiver presente, ele provocará uma alteração na quantidade de conjugado de sonda que está ligado ao sítio de ligação imobilizado. Esta alteração poderá ser detectada na câmara de detecção.

Um outro aspecto da presente invenção a ser mencionado é o facto de esta proporcionar um método de fabrico de um biossensor, de acordo com a reivindicação 1, para utilização na detecção de um analito alvo numa amostra líquida, englobando o método as etapas de:

proporcionar uma primeira camada (136);

remover uma secção da primeira camada (136) para formar uma parte da câmara de enchimento (107), uma parte da câmara de reacção (122) e uma parte da câmara de detecção (128);

proporcionar uma segunda camada (134);

montar um primeiro lado da segunda camada (134) num primeiro lado da primeira camada (136);

remover uma secção da segunda camada (136), que se estende por cima da parte da câmara de enchimento (107), correspondendo, essencialmente, a essa mesma parte da câmara de enchimento (107), estendendo-se a segunda camada (134) ainda sobre a parte da câmara de

reação (122) e sobre a parte da câmara de detecção (128), em que a parte da câmara de reação (122) e a parte da câmara de detecção (128) estão em comunicação líquida com a parte da câmara de enchimento (107);

proporcionar uma terceira camada (132);

montar um primeiro lado da terceira camada (132) num segundo lado da primeira camada (136), estendendo-se a terceira camada (132) sobre a parte da câmara de enchimento (107), sobre a parte da câmara de reação (122) e sobre a parte da câmara de detecção (128);

montar um primeiro lado de uma camada de vedação (142) num segundo lado da segunda camada (134), em que as camadas formam uma faixa com uma pluralidade de superfícies exteriores;

formar uma passagem que se estende através de uma superfície exterior da faixa para o interior da câmara de detecção, para que forme uma saída de ventilação (130) da câmara de detecção; e colocar um sítio de ligação imobilizado (44) e conjugado de sonda (50) no interior da câmara de reação (122).

Outro aspecto da presente invenção a ser mencionado é o facto de esta proporcionar um método de fabrico de um biossensor, de acordo com a reivindicação 1, para ser utilizado na detecção de um analito alvo numa amostra líquida, englobando o método as etapas de:

proporcionar uma primeira camada (36);

remover uma secção da primeira camada (36) para formar uma parte da câmara de enchimento (107), uma parte da câmara de reacção (22) e uma parte da câmara de detecção (28);

proporcionar uma segunda camada (34);

montar um primeiro lado da segunda camada (34) num primeiro lado da primeira camada (36), estendendo-se a segunda camada (34) sobre a parte da câmara de enchimento (107), sobre a parte da câmara de reacção (22), e sobre a parte da câmara de detecção (22);

proporcionar uma terceira camada (32);

montar um primeiro lado da terceira camada (32) num segundo lado da primeira camada (36), estendendo-se a terceira camada (32) sobre a parte da câmara de enchimento (107),

sobre a parte da câmara de reacção (22) e

sobre a parte da câmara de detecção (28);

montar um primeiro lado de uma primeira camada de vedação (42) num segundo lado da segunda camada (34);

montar um primeiro lado de uma segunda camada de vedação (46) num segundo lado da terceira camada (32), em que as camadas formam uma faixa com uma pluralidade de superfícies exteriores;

formar uma passagem que se estende através de uma superfície exterior da faixa para o interior da câmara de detecção, para que se forme uma saída de ventilação (30) da câmara de detecção; e colocar um sítio de

ligação immobilizado (44) e conjugado de sonda (50) no interior da câmara de reacção,

em que a altura da câmara de reacção (22) é superior à altura da câmara de detecção (28), ou em que a altura da câmara de reacção (22) e a da câmara de detecção (28) são iguais, e as superfícies da câmara de reacção (22) e/ou da câmara de detecção (28) são modificadas ou são adicionados materiais de enchimento à câmara de detecção (28).

Numa realização, o sítio de ligação immobilizado inclui um anticorpo adaptado para ligação a um antigénio alvo e o conjugado de sonda inclui um anticorpo adaptado para ligação a um antigénio alvo ligado. Se um antigénio alvo estiver presente numa amostra líquida, o sítio de ligação immobilizado pode ligar-se a um sítio no antigénio alvo, e o conjugado de sonda pode ligar-se a outro sítio no antigénio alvo. A presença de um antigénio alvo na amostra líquida resulta, assim, num aumento da quantidade de sonda ligada na câmara de reacção e a uma redução na quantidade de conjugado de sonda na câmara de detecção.

O alvo de ligação immobilizado, o conjugado de sonda e o analito alvo podem incluir a variedade de ligandos conhecidos. Por exemplo, um perito da técnica irá valorizar o facto de o alvo de ligação immobilizado, o conjugado de sonda e o analito alvo possam incluir um antigénio ou anticorpo, uma hormona ou neurotransmissor e um receptor, um substrato ou um efector alostérico e uma enzima,

lectinas e açúcares, estruturas de ADN ou ARN, tais como aptâmeros e respectivas espécies de ligação (incluindo outras espécies de ADN ou ARN ou proteína de ligação), proteínas, sistemas biotina e avidina ou estreptavidina, enzimas e respectivos substratos e inibidores, sistemas de ligação de lípidos, e combinações dos mesmos. Para facilitar a compreensão dos dispositivos e métodos aqui descritos, os ligandos imunológicos serão descritos a partir deste ponto, e o dispositivo será mencionado como um imunossensor ou um biossensor.

Um dos aspectos a mencionar, é o facto de a câmara de detecção acima mencionada incluir reagentes electroquímicos. Neste intuito, é utilizada uma reacção electroquímica na câmara de detecção para determinar se a quantidade de conjugado de sonda ligado na câmara de reacção foi aumentado ou diminuído pela presença do antigénio alvo. A reacção electroquímica pode também ser utilizada para determinar a concentração de analito (por exemplo, antigénio alvo) com base na concentração de conjugado de sonda na câmara de detecção.

Em outra realização, o sítio de ligação imobilizado inclui um antigénio alvo e o conjugado de sonda inclui um anticorpo adaptado para ligação ao antigénio alvo. Quando se introduz uma amostra na câmara de reacção, um antigénio alvo, se presente, irá ligar-se ao conjugado de sonda. Em resultado disto, a presença de um antigénio alvo na amostra líquida resulta numa redução da quantidade de conjugado de

sonda ligado ao sítio de ligação imobilizado na câmara de reacção e num aumento da quantidade de conjugado de sonda não ligado que pode deslocar-se até uma câmara de detecção. A redução no conjugado de sonda ligado pode ser detectada e/ou quantificada por uma reacção electroquímica na câmara de detecção. De modo oposto, o sítio de ligação imobilizado pode incluir um anticorpo e o conjugado de sonda pode incluir o antigénio alvo. A presença de um antigénio alvo na amostra líquida irá, de forma semelhante, causar uma redução na quantidade de conjugado de sonda ligado na câmara de reacção.

Os sítios de ligação imobilizados e o conjugado de sonda são posicionados separadamente na câmara de reacção e o sítio de ligação imobilizado fica posicionado em, pelo menos, uma pérola magnética. Por exemplo, os sítios de ligação imobilizados podem estar localizados sobre pérolas magnéticas que são secas sobre uma superfície da câmara de reacção. Quando uma amostra líquida é introduzida na câmara de reacção, poderá utilizar-se um campo magnético para impedir que as pérolas magnéticas e os sítios de ligação imobilizados se desloquem para o interior da câmara de detecção.

Numa outra realização aqui proporcionada, é facultado um método para detectar um antigénio alvo numa amostra líquida, tal como o definido na reivindicação 15. O método inclui a etapa de introdução de uma amostra num dispositivo biossensor como o descrito aqui. A amostra pode reagir com

sítios de ligação imobilizados e com um conjugado de sonda posicionados dentro da câmara de reacção. A amostra é, então, movida para uma câmara de detecção, sendo que o método engloba ainda a etapa de detectar electroquimicamente o conjugado de sonda na câmara de detecção. A etapa de detecção permite a um utilizador determinar se o antigénio alvo está presente na amostra, com base no nível de conjugado de sonda detectado na câmara de detecção. O método pode ainda incluir a etapa de quantificar a quantidade de antigénios alvo na amostra, com base em sinais eléctricos recebidos a partir da câmara de detecção.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

Para uma melhor compreensão da invenção, segue-se uma descrição detalhada que inclui alusões aos desenhos, nos quais:

Fig. 1 é uma vista de cima de uma realização de um biossensor aqui apresentado;

Fig. 2 é uma vista em corte de um biossensor da Fig. 1, ao longo da linha 2-2;

Fig. 3 é uma vista de cima de outra realização de um biossensor aqui apresentado;

Fig. 4A é uma vista em corte do biossensor da Fig. 3, ao longo da linha 4A-4A;

Fig. 4B é uma vista em corte do biossensor da Fig. 3, ao longo da linha 4B-4B;

Fig. 4C é uma vista em corte do biossensor da Fig. 3, ao longo da linha 4C-4C; e

Fig. 4D é uma vista em corte do biossensor da Fig. 3, ao longo da linha 4D-4D.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

São, aqui, descritos dispositivos biossensores e métodos de utilização. Numa realização, o sensor inclui uma câmara de reacção e uma câmara de detecção. Posicionados no interior da câmara de reacção encontram-se sítios de ligação imobilizados que se ligam ao analito de interesse ou a espécies relacionadas com o analito de interesse. Também nesta câmara se encontra uma espécie de sonda que pode ser detectada na câmara de detecção e que pode ser conjugada com uma espécie que possa ligar-se ao sítio de ligação imobilizado, ou que pode ligar-se a uma espécie que se ligue ao sítio de ligação imobilizado. Daqui em diante, esta será referida como conjugado de sonda. A natureza do conjugado de sonda e a do sítio de ligação imobilizado leva a que a presença do analito de interesse na amostra modifique a interacção do conjugado de sonda e o sítio de ligação imobilizado. Por exemplo, quando presente, o analito pode impedir que o conjugado de sonda se ligue ao sítio de ligação imobilizado. Em alternativa, o analito pode fornecer um sítio ao qual o conjugado de sonda possa

ligar-se, aumentando, assim, a quantidade de conjugado de sonda ligado. Em qualquer uma das realizações, a presença de analitos modifica a quantidade do conjugado de sonda ligado na câmara de reacção.

A câmara de reacção pode ser preparada de forma que, depois de ocorridas as reacções de ligação do conjugado de sonda como eram pretendidas, o líquido da câmara de reacção seja transferido para a câmara de detecção, transferindo, com ele, o conjugado de sonda livre e deixando para trás o conjugado de sonda ligado. Na câmara de detecção poderá detectar-se a quantidade de conjugado de sonda livre. Por exemplo, os eléctrodos na câmara de detecção podem ser utilizados para detectar, electroquimicamente, o nível de conjugado de sonda na câmara de detecção. A reacção electroquímica pode determinar se o analito alvo está presente/ausente e/ou determinar a concentração de analito alvo, com base na quantidade de conjugado de sonda existente na câmara de detecção.

Um exemplo de um biossensor 20, ilustrado nas figuras 1 e 2, inclui uma câmara de detecção 28 que engloba uma célula electroquímica e uma câmara de reacção 22, contendo sítios de ligação imobilizados e um conjugado de sonda. A câmara de detecção 28 e a câmara de reacção 22 podem ser preparadas formando uma abertura que se estende através de uma folha de material de espaçamento 36, electricamente resistente. A abertura pode ter um formato que defina uma parede lateral tanto da câmara de reacção 22, como da

câmara de detecção 28, bem como um corredor de passagem 38 da amostra entre as câmaras 22, 28. Ao alargar a abertura desde um extremo proximal 24 da câmara de reacção 22, até uma extremidade 37 do sensor 20, forma-se também uma entrada de amostra 25. Numa realização, a espessura da folha 36 define a altura da câmara de reacção 22 e da câmara de detecção 28, sendo que as câmaras podem ter uma altura igual. De acordo com esta realização, a força capilar na câmara de detecção tem de ser superior à da câmara de reacção. Isto pode obter-se modificando as superfícies da câmara de reacção e/ou da câmara de detecção ou adicionado materiais de enchimento, tais como os que foram aqui mencionados, à câmara de detecção.

Em outro exemplo, a altura da câmara de reacção 22 é superior à da câmara de detecção 28. Uma câmara de reacção 22 com uma altura superior à da câmara de detecção 28 pode ser preparada, por exemplo, ao colocar, em camadas, várias folhas internas 32, 34, 36 e/ou folhas de selagem exteriores 42, 46 em conjunto. Por exemplo, na figura 2, a folha do meio 36 do sensor 20 tem uma abertura que define as paredes laterais da câmara de reacção 22 e da câmara de detecção 28, tal como o descrito acima. A folha do meio 36 fica, então, comprimida entre uma ou mais camadas adicionais 32, 34, tendo as camadas adicionais 32 e 34 uma abertura que corresponde apenas à câmara de reacção 22. No que diz respeito à câmara de detecção 28, as camadas 32 e 34 definem as paredes terminais 60, 62 (isto é, as superfícies superior e inferior) da câmara. Nesta realização, as paredes terminais 60 e 62 da câmara de

detecção englobam eléctrodos 54 e 52, que podem ser ligados electricamente, por meios de ligação, a um circuito de medição. Os eléctrodos são descritos com maior detalhe mais abaixo.

Um dos aspectos a mencionar, é o facto de os eléctrodos 52 e 54 poderem ser colocados em ligação eléctrica com um medidor (não mostrado) através do terminal de ligação 66. O terminal de ligação permite que um medidor (não mostrado) comunique electricamente com os eléctrodos 52 e 54 na câmara de detecção 28, por meio de pistas de condução eléctrica (não mostradas). O medidor, em ligação com a área de ligação 66, tem capacidade para aplicar um potencial entre os eléctrodos 52 e 54 na câmara de detecção 28 e para detectar os sinais eléctricos gerados durante uma reacção electroquímica.

Quando em utilização, um utilizador introduz primeiro a amostra na primeira câmara, a câmara de reacção 22, do sensor, através da entrada de amostra 25. A amostra pode ser puxada para dentro da câmara de reacção sob a influência da acção capilar ou de mecha. A câmara de reacção pode incluir uma saída de ventilação 26 que está aberta para a atmosfera, e que permite, deste modo, que o ar deslocado pela amostra se evada. A amostra será puxada para o interior da primeira câmara, enchendo esta mesma câmara até à saída de ventilação 26 da câmara de reacção, altura em que o enchimento terminará. O volume da câmara de reacção 22 é seleccionado de modo a que seja, pelo menos,

igual e, preferencialmente, maior que o volume da câmara de detecção 28.

O círculo 30, na figura 1, indica uma abertura que perfura as camadas 32, 34 e/ou 36, mas não as camadas 42 e 46. Dado que as camadas 42 e 46 não são perfuradas inicialmente, a única abertura para a atmosfera, da câmara de detecção 28, é através da passagem 38 da amostra, que se abre a partir da câmara de reacção 22. Desta forma, quando a câmara de reacção 22 está a ser enchida com a amostra, o ar fica preso dentro da câmara de detecção 28, o que impede, substancialmente, que ela se encha com amostra. Uma pequena quantidade de amostra pode entrar na câmara de detecção 28 durante o espaço de tempo que decorre entre o momento em que a amostra entra em contacto, pela primeira vez, com a abertura 38 para a câmara de detecção 28, e o momento em que ela entra em contacto com a face não visível da abertura 38. Contudo, e depois de a amostra ter ficado totalmente molhada ao longo da abertura 38 para a câmara de detecção 28, a câmara de detecção 28 já não continuará a ser enchida.

A abertura de uma saída de ventilação 56 para a atmosfera permite que o ar preso dentro da câmara de detecção 28 se evada, permitindo, assim, que a câmara de detecção 28 se encha com a amostra reagida proveniente da câmara de reacção 22. A saída de ventilação 56 pode ser aberta de várias formas, por exemplo, perfurando uma camada exterior do dispositivo, removendo uma porção da camada

exterior do dispositivo e/ou rasgando uma porção do dispositivo.

Quando a saída de ventilação for aberta, a amostra reagida será puxada para dentro da câmara de detecção 28 devido à força capilar aumentada na câmara de detecção 28, quando comparada com a presente na câmara de reacção 22. Numa realização, a força capilar aumentada é propiciada revestindo adequadamente as superfícies da câmara de detecção 28 ou, mais preferencialmente, optando para que a distância capilar da câmara de detecção 28 seja inferior à da câmara de reacção 22. Nesta realização, a distância capilar é definida para que seja a menor dimensão da câmara. Um perito da técnica irá aperceber-se do facto de as forças capilares nas câmaras de reacção e/ou de detecção poderem ser criadas variando uma série de factores. As forças capilares em câmaras estreitas são discutidas, por exemplo, na U.S. Patent No.: 6.823.750, intitulada "Method of Preventing of Preventing Short Sampling of a Capillary or Wicking Fill Device", que será aqui incorporada a título de referência, na sua totalidade.

Um exemplo de realização de um biossensor 120, incluindo três câmaras, está ilustrado nas figuras de 3 a 4D. O imunossensor inclui uma câmara de enchimento 107 em adição a uma câmara de reacção 122 e a uma câmara de detecção 128. O sensor 120 pode ser formado a partir de múltiplas camadas, como o descrito acima, incluindo, por exemplo, uma camada de vedação 142, uma camada inferior

134, uma camada de espaçamento 136 e uma camada superior 132. Um dos aspectos a mencionar, é o facto de cada camada englobar um material isolador, enquanto as camadas superior e inferior 132, 134 incluem, adicionalmente, uma película condutora de electricidade, como será discutido em seguida com maior detalhe. Ao remover partes das camadas em diferentes pontos do sensor, são formadas uma câmara de enchimento 107, uma câmara de reacção 122 e uma câmara de detecção 128. Além disso, a exposição de partes da película condutora de electricidade nas camadas superior e inferior 132, 134 proporciona eléctrodos 152, 154 para a execução de reacções electroquímicas, e proporciona áreas de contacto eléctrico 101, 102, 103 para ligar electricamente o sensor a um medidor.

A câmara de enchimento 107 recebe a amostra do paciente ou utilizador e fornece um reservatório de amostra para encher as outras duas câmaras. A câmara de reacção 122 e a câmara de detecção encontram-se em comunicação líquida com a câmara de enchimento 107. Para auxiliar com o fluido em movimento entre câmaras, a câmara de detecção 128 pode incluir uma saída de ventilação 130 que está inicialmente fechada. Depois de a amostra reagir na câmara de reacção, a saída de ventilação 130 é aberta para que o ar existente na câmara de detecção 128 possa sair através da saída de ventilação, permitindo que o líquido da câmara de reacção 122 entre na câmara de detecção. Tal como o mencionado acima no que diz respeito à saída de ventilação 56, a saída de ventilação 130 pode ser aberta de várias formas, por exemplo, perfurando uma camada exterior do

dispositivo, removendo uma porção da camada exterior do dispositivo e/ou rasgando uma porção do dispositivo (isto é, rasgando ao longo da perfuração).

O sensor pode incluir um ponto de ligação eléctrica 101 que permite que seja efectuada uma ligação eléctrica a um eléctrodo inferior 152, e pontos de ligação eléctrica 102, 103 que permitem uma ligação eléctrica a um eléctrodo superior 154. A linha tracejada 106 indica uma falha na película condutora de electricidade definindo o eléctrodo superior 154 na camada superior 132. A falha pode ser afectada ao modelar a película condutora quando esta é colocada ou ao criar a falha durante o fabrico. A falha pode ser afectada caso se raspe a película, se arranque parte da película, se ataque quimicamente a película, se remova a película a laser ou se utilizarem outros métodos como é do conhecimento geral. A falha 106 na película condutora tem a função de, em parte, definir a área de eléctrodos activa da faixa, ao isolar electricamente o revestimento condutor da câmara de detecção daquele que existe na câmara de reacção. Isto revela ser vantajoso, pois pode impedir que qualquer sinal eléctrico que poderia, caso contrário, fluir para as películas condutoras da câmara de reacção, afecte os resultados do teste.

O sensor 120 pode também incluir o ponto de contacto 103 que permite a um utilizador efectuar uma ligação eléctrica à parte da película condutora que está em contacto com a câmara de reacção 122. À medida que a câmara

de reacção 122 é enchida com amostra, a monitorização do ponto de contacto 103 permite que um sinal seja detectado, o qual indicará ao medidor que a faixa foi enchida com sucesso, podendo dar-se início a uma sequência de teste. De forma a conseguir-se isto com a realização da invenção mostrada nas figuras de 3 a 4D, poderá efectuar-se uma ligação eléctrica até à película condutora inferior no ponto de contacto 101 e até à película condutora superior, na câmara de reacção, no ponto de contacto 103. Seria, então, aplicado um potencial entre os dois pontos de ligação (101, 103) e a corrente, voltagem e/ou resistência eléctrica monitorizada para certificar o momento em que a amostra entrou na câmara de reacção. Este potencial poderá ser um potencial DC ou poderá ser um potencial que varia com o tempo como, por exemplo, um potencial AC ou uma série de impulsos de potencial de onda quadrada com polaridade alterna. Ao monitorizar a corrente que flui como resultado da aplicação de potencial ou a voltagem necessária para passar uma corrente predeterminada, é possível obter-se uma indicação de quando as películas condutoras na câmara de reacção começam a ficar molhadas.

A área de ligação 101, para entrar em contacto eléctrico com uma camada inferior 134 que carrega a película condutora inferior, pode ser formada ao prolongar a camada inferior 134 para além da extremidade de uma camada de espaçamento 136 e da camada superior 132. A área de contacto 102 é formada removendo secções das camadas 134 e 136 para expor uma secção da camada superior 132. A área de contacto 103 é formada de forma semelhante, removendo

uma secção da camada inferior 136, tal como é mostrado na figura 4D (secção transversal 4D-4D na figura 3).

A câmara de enchimento 107 pode ser formada removendo secções da camada inferior 134 e da camada de espaçamento 136, mas deixando a camada superior 132 e a camada de vedação 142 intactas. A camada de vedação 142 pode ser colada à face exterior da camada 134 e pode servir, com os lados das secções recortadas das camadas 134 e 136 e da camada 132, para formar um canal capilar com capacidade de puxar a amostra para o seu interior por meio de acção capilar. Este canal está ilustrado na figura 4A (secção transversal 4A-4A na figura 3).

A câmara de reacção 122 é formada removendo uma secção da camada de espaçamento 136, mas mantendo as camadas 134 e 132 intactas. Assim forma-se um espaço capilar onde a altura do separador capilar é inferior à altura da câmara de enchimento 122. Isto permite que forças capilares puxem líquido da câmara de enchimento 122 para a câmara de reacção 128 pela acção capilar. A baixa altura da câmara de reacção pode também permitir uma mistura relativamente rápida dos componentes na câmara de reacção. Um dos aspectos a mencionar, é o facto de a câmara de reacção 122 se abrir pela(s) margem(ns) lateral(is) da faixa para permitir que o ar seja expelido enquanto o líquido enche a câmara de reacção.

A câmara de detecção 128 é formada de uma forma semelhante à da câmara de reacção 122, removendo uma secção da camada de espaçamento 136, e deixando as camadas 134 e 132 intactas. Inicialmente, a câmara de detecção 128 abre-se para a câmara de reacção 122 numa das extremidades, mas não tem qualquer outra abertura.

Um orifício de ventilação 130 é incorporado na câmara de detecção 128 mediante a remoção de secções ou perfurando a camada superior 132 (ou a camada inferior 134). Uma camada 146, mostrada na figura 4B (secção transversal 4B-4B na figura 3), pode ser laminada na face superior da faixa para selar a abertura. Em alternativa, se uma porção da camada inferior 134 for removida, a camada de vedação 142 pode ser perfurada/removida para abrir o orifício de ventilação 130.

Quando a amostra líquida enche a câmara de reacção 122 ela irá, como parte do processo de enchimento, atingir a abertura da câmara de detecção 128. Assim, quando o líquido enche a câmara de reacção 122 de forma tal que atravessa a abertura da câmara de detecção 128, o ar fica preso na câmara de detecção 128, impedindo que entre mais líquido. Isto permite que o líquido seja mantido na câmara de reacção 122 enquanto as reacções de ligação estão a prosseguir. Depois de um tempo predeterminado, quando qualquer uma das reacções de ligação que possam estar a ocorrer na câmara de reacção 122 prosseguiram até ao ponto pretendido, as camadas 142 ou 146 são perfuradas por meios

de perfuração (ou são removidas/rasgadas) para permitir que o ar saia da câmara de detecção 128, de forma que o líquido seja transferido da câmara de reacção 122 para a câmara de detecção 128. A dimensão em corte da câmara de detecção 128 permite que a acção capilar encha a câmara de detecção.

Um perito na técnica irá aperceber-se do facto de o imunossensor aqui descrito poder ter uma variedade de configurações alternativas como, por exemplo, o formato do sensor, o número de câmaras, a configuração dos eléctrodos e/ou a colocação de pontos de contacto eléctrico. Por exemplo, outros dispositivos sensores, que são ilustrativos de uma variedade de realizações de sensores alternativas, são apresentados num requerimento de patente dos E.U.A. intitulado "Method and Apparatus for Electrochemical Analysis" apresentado em simultâneo com este requerimento. Além disso, um perito na arte irá aperceber-se do facto de, embora os sensores ilustrados utilizem saídas de ventilação para controlar o fluxo de fluido entre as câmaras, são também contempladas outras realizações de encaminhamento de fluidos. Por exemplo, uma barreira física entre a câmara de reacção e a câmara de detecção poderá ser removida ou aberta para permitir o fluxo de fluido entre câmaras. Os sensores aqui descritos podem incluir elementos de bombagem para mover os fluidos através do dispositivo.

O imunossensor da presente invenção inclui os eléctrodos 52, 152 e 54, 154, como o descrito acima. Em determinadas realizações poderá ser utilizada uma

configuração de eléctrodos que não seja aquela em que estes ficam opostos, tal com o ilustrado nas figuras, Poderá ser utilizada, por exemplo, uma disposição lado a lado ou uma disposição desalinhada. Os eléctrodos podem ser iguais ou substancialmente idênticos em termos de dimensão ou poderão ser de diferentes tamanhos e/ou de diferentes formatos. Os eléctrodos podem englobar o mesmo material condutor ou diferentes materiais. Outras variações na configuração, no espaçamento e na construção ou fabrico serão evidentes para os peritos na técnica.

Numa realização, os eléctrodos encontram-se numa disposição em que ficam opostos e em paralelo, a uma distância inferior ou igual a 500, 450, 400, 350, 300, 250 ou 200 micrones e, mais preferencialmente, de cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 a cerca de 75, 100, 125, 150 ou 175 micrones. Em determinadas realizações, contudo, poderá ser preferencial que o espaçamento dos eléctrodos seja superior a 500 micrones, por exemplo, 600, 700, 800, 900 ou 1000 micrones ou, ainda, superior a 1, 2, 3, 4 ou 5 milímetros.

Pelo menos um dos eléctrodos poderá ser um eléctrodo sensor, isto é, um eléctrodo sensível à quantidade de agente redox reduzido no caso do antioxidante ou de agente redox oxidado no caso do oxidante. No caso de um sensor potenciométrico, em que o potencial do eléctrodo sensor é indicativo do nível de analito presente, está presente um segundo eléctrodo, funcionando como eléctrodo de

referência, o qual actua para fornecer um potencial de referência. No caso de um sensor amperométrico, em que a corrente de eléctrodo sensor é indicativa do nível de analito na amostra, estará presente pelo menos um outro eléctrodo com funções de um eléctrodo contador para completar o circuito eléctrico. Este segundo eléctrodo pode também funcionar como um eléctrodo de referência. Em alternativa, um eléctrodo adicional (não mostrado) pode executar a função de um eléctrodo de referência.

Um dos aspectos a ser mencionado, é o facto de a película condutora de electricidade que define os eléctrodos 52, 152, 54, 154 poder ser colada a uma superfície do imunossensor através de um adesivo. Entre os adesivos adequados estão incluídos, por exemplo, adesivos activados por calor, adesivos sensíveis à pressão, adesivos curados no calor, adesivos curados quimicamente, adesivos derretidos a quente, adesivos de colagem térmica, e outros semelhantes. Um aspecto alternativo a ser mencionado, é o facto de a película condutora de electricidade ser preparada ao revestir (por exemplo, através de revestimento por pulverização ou serigrafia) uma folha de material resistente à electricidade com um material condutor de electricidade adequado como, por exemplo, platina, paládio, carbono, óxido de índio, óxido de estanho, mistura de óxidos de índio e de estanho, ouro, prata, irídio, misturas destes, e semelhantes. Os materiais adequados a serem utilizados como eléctrodos deverão ser compatíveis com os reagentes presentes no sensor 20, 120. Os materiais resistentes à electricidade adequados incluem, por exemplo,

poliésteres, poliestirenos, policarbonatos, poliolefinas, misturas destes, e semelhantes.

Os reagentes para utilização no imunossensor, por exemplo, anticorpo/antigénio immobilizado, antigénio/anticorpo ligado à sonda, solução tampão, mediador, enzima-substrato, e semelhantes, poderão ser apoiados nas paredes da câmara de reacção 22, 122 ou num suporte independente contido dentro de câmaras, dentro de uma matriz, ou poderão ser auto-sustentáveis. Se os reagentes tiverem de estar sustentados nas paredes das câmaras ou nos eléctrodos, os químicos poderão ser aplicados utilizando técnicas de impressão bem conhecidas na técnica, por exemplo, impressão por jacto de tinta, serigrafia, litografia, e semelhantes. Numa realização alternativa, uma solução contendo o reagente é aplicada numa superfície dentro de uma câmara e é deixada secar.

Noutra realização do imunossensor aqui descrito, as espécies imunológicas e/ou os reagentes electroquímicos podem estar sustentados em e/ou contidos dentro de um ou mais suportes independentes que estão colocados dentro do sensor. Os suportes independentes adequados incluem, mas não estão limitados a, materiais de malha, materiais de folha de não-tecido, materiais de enchimento fibroso, membranas macroporosas, pós sinterizados e/ou pérolas. O sítio de ligação immobilizado está posicionado em, pelo menos, uma pérola magnética. As vantagens dos suportes independentes incluem uma área de superfície aumentada que

permite, dessa forma, que sejam incluídos mais sítios de ligação immobilizados e conjugado de sonda na câmara de reacção 22, 122. Numa realização, um anticorpo immobilizado e/ou conjugado de sonda são secos sobre materiais de suporte que são, então, colocados na câmara de reacção. Em alternativa, tanto o sítio de ligação immobilizado como o conjugado de prova são incorporados por cima de um material de suporte, e o outro componente é suportado na parede da câmara de reacção. Ainda em outra realização, as paredes da câmara de reacção são porosas, com o sítio de ligação immobilizado e/ou o conjugado de sonda nelas incorporado. Isto pode ser realizado utilizando uma membrana macroporosa para formar a parede da câmara de reacção e comprimir a membrana à volta da câmara de reacção para impedir que ocorra qualquer fuga da amostra para fora da área desejada.

Os suportes independentes adequados incluem materiais, tais como, materiais de malha, materiais de folha de não-tecido, e os materiais de enchimento fibroso incluem poliolefinas, poliésteres, nylons, celulose, poliestirenos, policarbonatos, polissulfonas, misturas destes, e semelhantes. As membranas macroporosas adequadas podem ser preparadas a partir de materiais poliméricos que incluem polissulfonas, difluoretos de polivinilideno, nylons, acetatos de celulose, polimetacrilatos, poliacrilatos, misturas destes, e semelhantes.

Numa realização, o conjugado de sonda é igualmente sustentado por pérolas. Essas pérolas podem abranger um

material polímero, por exemplo, agarose, poliestireno, polimetacrilato, polimetilmetacrilato, englobando, opcionalmente, um material magnético (como, por exemplo, gama  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). O material da pérola é seleccionado de forma que seja fornecido um suporte adequado para o anticorpo. As pérolas adequadas podem incluir as que são comercializadas como DYNABEADS® pela Dynal Biotech de Oslo, Noruega. Opcionalmente, pode ser incluído um íman para manter as pérolas magnéticas na câmara de reacção e para impedir que elas se movam para a câmara de detecção. Por exemplo, o sítio de ligação imobilizado pode estar posicionado sobre pérolas magnéticas dentro da câmara de reacção.

#### **UTILIZAÇÃO DO SENSOR PARA DETERMINAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UM ANTIGÉNIO**

Tal como o exposto acima, o sensor 20, 120 pode incluir um sítio de ligação imobilizado e um conjugado de sonda. Embora a descrição que se segue diga respeito ao sensor 20 da figura 2, será óbvio que a mesma se aplica também ao sensor 120.

Numa realização, um sítio de ligação imobilizado 44 é um anticorpo para o antigénio a ser detectado, e o conjugado de sonda 50 é uma enzima ligada ao antigénio a ser detectado ou a um pseudo-antigénio do antigénio a ser detectado.

Os anticorpos 44 podem ser adsorvidos ou imobilizados de forma que não saiam da câmara de reacção durante um teste. Opcionalmente, depois da aplicação dos anticorpos 44 na superfície interna da câmara de reacção, poderá ser aplicado um agente que se destina a prevenir a ligação não específica de proteínas a esta superfície (não mostrado). Um exemplo deste tipo de agente bem conhecido na técnica é a albumina de soro bovino (BSA). Um tensioactivo não iónico pode também ser utilizado como agente acima mencionado, por exemplo, o TRITON X100 fabricado pela Rohm & Haas of Philadelphia, Pa., ou o TWEEN fabricado pela ICI Americas of Wilmington, Del. Preferencialmente, o tensioactivo não iónico seleccionado não desnatura proteínas.

Separado dos anticorpos encontra-se o conjugado de sonda 50 (antigénio ligado à enzima). Exemplos de enzimas adequadas para utilização com o conjugado de sonda 50 incluem, mas não estão limitados a, glucose oxidase e glucose desidrogenase. O antigénio 50 ligado à enzima pode ser depositado dentro da câmara de reacção de modo a que possa ser liberado para a amostra quando for molhado pela mesma. Por exemplo, o antigénio 50 ligado à enzima pode ser seco em cima de uma superfície dentro da câmara de reacção, de modo a que apenas exista uma ligação ténue entre o antigénio 50 ligado à enzima e a câmara de reacção. Um dos aspectos a mencionar, é o facto de a taxa de dissolução do antigénio 50 ligado ao enzima ser seleccionada de forma que o conjugado de sonda se dissolva numa amostra durante o tempo que é o necessário para que a amostra encha a câmara

de reacção. Deste modo, o antigénio 50 ligado à enzima pode ser uniformemente distribuído por toda a área da câmara de reacção depois de cheia.

Um aspecto a ser mencionado, é o facto de as quantidades relativas de antigénio 50 ligado à enzima e de anticorpo 44 poderem ser seleccionadas de forma que exista um excesso de anticorpo 44 relativamente ao antigénio 50 ligado à enzima. Um outro aspecto a ser mencionado, é o facto de um excesso ser definido de forma que este mesmo excesso seja pequeno quando comparado com o número de moléculas de antigénio a serem detectadas na amostra.

Desta forma, quando a amostra enche a câmara de reacção, o antigénio 50 ligado à enzima mistura-se com a amostra. É, então, permitido o tempo suficiente para que o antigénio 50 ligado à enzima entre em contacto com os anticorpos 44. Dado que existe um excesso de anticorpos 44, se nenhum antigénio estiver presente na amostra, então praticamente todos, ou uma grande parte dos antigénios 50 ligados à enzima, irão ligar-se aos anticorpos 44 ficando, assim, efectivamente immobilizados. Se estiver presente antigénio alvo na amostra, o antigénio alvo irá contactar e ligar-se aos anticorpos 44, impedindo que os, pelo menos alguns, antigénios 50 ligados à enzima se liguem aos anticorpos 44. Assim, quando o antigénio alvo está presente na amostra, no final da etapa de reacção o antigénio 50 ligado à enzima (ou pelo menos uma parte mensurável do mesmo) permanecerá móvel na amostra, podendo mover-se para

a câmara de detecção. Inversamente, se nenhum antigénio alvo estiver presente na amostra, os antigénios 50 ligados à enzima ficarão imobilizados na câmara de reacção 48 (ou pelo menos uma redução mensurável na quantidade que permanece móvel na amostra). Um perito na técnica irá aperceber-se do facto de um excesso de anticorpos 44 não se tornar necessário e que, em alternativa, as quantidades relativas de antigénios 50 ligados à enzima e de anticorpos 44 poderão ser iguais, ou também que poderá estar presente um excesso de antigénios 50 ligados à enzima.

Numa segunda realização, o sítio de ligação imobilizado 44 é um anticorpo que pode ligar-se a um sítio no antigénio alvo e o conjugado de sonda 50 inclui uma enzima acoplada a um anticorpo que pode ligar-se ao antigénio alvo ligado.

A distância a que os alvos de ligação têm de espalhar-se poderá ser menor, o que reduz potencialmente o tempo requerido para executar o ensaio.

Quando a amostra entra na câmara de reacção, o sítio de ligação imobilizado na câmara de reacção pode ligar-se a um sítio no analito de interesse. O conjugado de sonda pode incluir um segundo anticorpo que pode ligar-se a um segundo sítio no antigénio alvo anexado ao sítio de ligação imobilizado. Quando uma amostra que contém o analito de interesse enche a câmara de reacção, o conjugado de sonda e

o sítio de ligação imobilizado misturam-se com a amostra, e o analito de interesse liga-se num sítio ao conjugado de sonda e num segundo sítio ao sítio de ligação imobilizado. O analito forma, então, uma ligação que imobiliza uma fracção do conjugado de sonda, onde a fracção imobilizada pode ser utilizada para detectar a presença e/ou quantificar a concentração do analito na amostra. Por exemplo, a quantidade de conjugado de sonda imobilizado pode ser quantificada ao observar a quebra na quantidade de conjugado de sonda livre que é transferido para a câmara de detecção.

Em ainda outra realização, o sítio de ligação imobilizado 44 pode ser o antigénio alvo, e o conjugado de sonda 50 pode englobar uma enzima acoplada a um anticorpo que seja capaz de ligar-se ao analito de interesse. O sítio de ligação imobilizado e o conjugado de sonda são posicionados separadamente na câmara de reacção para evitar ou reduzir qualquer reacção antes da introdução da amostra.

Quando uma amostra que contém o antigénio alvo enche a câmara de reacção, o antigénio alvo na amostra pode ligar-se ao conjugado de sonda (anticorpo), reduzindo a quantidade de conjugado de sonda que se liga ao sítio de ligação imobilizado (antigénio). A presença ou ausência do antigénio alvo altera, por conseguinte, a quantidade de conjugado de sonda ligado na câmara de reacção. A fracção imobilizada pode ser utilizada para detectar a presença e/ou quantificar a concentração do analito na amostra. Por

exemplo, a quantidade de conjugado de sonda imobilizado pode ser quantificada observando a quebra na quantidade de conjugado de sonda livre que é transferido para a câmara de detecção.

Um dos aspectos a mencionar, é o facto de os sítios de ligação imobilizados e/ou o conjugado de sonda se encontrarem ligados a pérolas. Por exemplo, os sítios de ligação imobilizados (antigénio) estão posicionados em pérolas magnéticas que são secas sobre uma superfície da câmara de reacção e o conjugado de sonda (anticorpo) pode ser seco em outra superfície da câmara de reacção. As pérolas sobre as quais o antigénio é imobilizado podem também ser pérolas magnéticas que estão impedidas de sair da câmara de reacção por meio de um campo magnético. Quando a amostra enche a câmara de reacção, o antigénio na amostra liga-se ao anticorpo do conjugado de sonda e impede que o sítio de ligação imobilizado (antigénio) se ligue ao conjugado de sonda, deixando, dessa forma, o conjugado de sonda livre para ser transferido para a câmara de detecção.

Tal como foi mencionado acima, as pérolas podem ter características que as levem a permanecer na câmara de reacção quando a amostra é transferida para a câmara de detecção. Por exemplo, as pérolas paramagnéticas podem ser alinhadas com linhas de campo de um campo magnético aplicado, de forma que sejam mantidas pelo campo, e evitando, dessa forma, que sejam transferidas com a amostra para a câmara de detecção. O campo magnético pode ser

aplicado por qualquer dispositivo adequado como, por exemplo, um electroímã ou, numa realização alternativa, quando se pretende minimizar o consumo de energia, o campo magnético pode ser aplicado por um ímã permanente. Numa realização, o ímã ou ímãs podem ser colocados de forma que fiquem mais próximos da localização, na câmara de reacção, do conjugado de sonda, e afastados da localização, na câmara de reacção, das pérolas paramagnéticas. Com esta disposição, as pérolas terão tendência para se moverem em direcção ao conjugado de sonda, misturando-se com ele, sob a influência do campo magnético. Depois de as pérolas se terem movido e misturado com o conjugado de sonda, o campo magnético aplicado tenderá a impedir que as pérolas se movam para localizações com uma concentração de linhas de campo magnético mais baixa, ficando, dessa forma, imobilizadas na câmara de reacção pelo campo magnético.

Independentemente da configuração do sítio de ligação imobilizado e do conjugado de sonda, depois das reacções da amostra dentro da câmara de reacção, a amostra reagida é movida para a câmara de reacção. Por exemplo, o tempo predeterminado pode ser definido de forma que exista tempo suficiente para que praticamente todo o conjugado de sonda se ligue. Um dos aspectos a mencionar, é o facto de o tempo de permanência da amostra na câmara de reacção poder ser calculado manualmente por um utilizador. Em alternativa, o tempo de permanência pode ser calculado electronicamente por um medidor em contacto eléctrico com o sensor.

Numa realização, o tempo de permanência da amostra na câmara de reacção é monitorizado por meio de eléctrodos. Por exemplo, no sensor das figuras 1 e 2, quando a amostra enche a câmara de reacção 22, uma pequena porção da câmara de detecção 28, na respectiva abertura 38 para o interior da câmara de reacção 22, será molhada pela amostra. Os eléctrodos 52 e 54 podem ser colocados na câmara de detecção 28, levando a que pelo menos uma porção de cada eléctrodo 52 e 54 entre em contacto com a amostra durante o enchimento da câmara de reacção 22, de forma que a presença da amostra chegue aos eléctrodos 52 e 54 e crie um sinal eléctrico que será utilizado para accionar o dispositivo temporizador. Numa outra realização, e ilustrado no sensor das figuras 3 e 4, um contacto eléctrico separado (contacto 103), utilizado em conjugação com o eléctrodo inferior e a área de contacto 101, poderá detectar a presença da amostra na câmara de reacção.

Após um período de tempo predeterminado, depois de a amostra ter entrado na câmara de reacção, considera-se que a fase de reacção imunológica do teste está concluída. As saídas de ventilação 30, 130 podem, então, ser abertas para a atmosfera. Por exemplo, uma agulha activada por solenóide que se encontra no medidor pode ser utilizada para perfurar a camada da saída de ventilação. A perfuração pode ser executada automaticamente pelo medidor ou manualmente pelo utilizador, por exemplo, o utilizador insere uma agulha através da(s) camada(s) que cobre(m) a saída de ventilação.

Opcionalmente são colocados, na câmara de detecção 28, 128, reagentes secos 64 que englobam um substrato de enzima

e um mediador, os quais têm capacidade para reagirem com a parte enzimática do conjugado de sonda, para produção de um sinal detectável. O substrato de enzima e o mediador, se presentes, podem ter a quantidade suficiente para que a taxa da reacção de qualquer enzima presente com o substrato de enzima seja determinada pela quantidade de enzima presente. Por exemplo, se as enzimas fossem glucose oxidase ou glucose desidrogenase, um mediador enzimático adequado e um substrato de enzima, como é o caso da glucose (se ainda não estiver presente na amostra) será colocada dentro da câmara de detecção 28, 128. Numa realização alternativa, seria colocada glucose suficiente na câmara de detecção 28, 128, de forma que quaisquer variações no nível de glucose na amostra entrada não alterariam significativamente a taxa de reacção enzimática. O tampão também pode ser incluído para ajudar a ajustar o pH da amostra na câmara de detecção 28, 128. Numa realização, o ferricianeto é um mediador adequado. Outros mediadores adequados incluem diclorofenolindofenol e complexos entre metais de transição e espécies heteroatómicas contendo nitrogénio. Adicionalmente, poderá ser adicionado um segundo mediador como, por exemplo, fenazina etosulfato e/ou 2,3 dimetoxi-5-metil-p-benzoquinona, o qual promove uma transferência mais eficaz de electrões a partir da enzima para o ferricianeto. O substrato de enzima, o mediador, o segundo mediador e os reagentes tampão 64 poderão estar presentes em quantidades suficientes para que a taxa de reacção da enzima com o substrato de enzima fique limitada pela concentração da enzima presente.

Quando a câmara de detecção 28, 128 fica cheia, os reagentes 64 dissolvem-se na amostra. O componente enzimático do conjugado de sonda reage com o substrato enzimático e o mediador para produzir um mediador reduzido. Este mediador reduzido é oxidado electroquimicamente num eléctrodo que actua como um ânodo na câmara de detecção 28, 128 para produzir uma corrente eléctrica. Numa realização, a taxa de alteração desta corrente é utilizada, com o tempo, como um indicador da presença e quantidade de enzima presente na amostra reagida. Se a taxa de alteração da corrente for inferior (ou superior) a um valor limiar predeterminado, isso indica, então, que não está presente qualquer quantidade significativa (ou está presente uma quantidade significativa) do conjugado de sonda 50 na amostra reagida, indicando a presença (ou ausência) de antigénio presente na amostra original. De forma inversa, a taxa de alteração de uma corrente superior (ou inferior) a um valor limiar predeterminado, pode ser usada para indicar a ausência (ou presença) de um antigénio na amostra. Numa realização, a taxa de alteração da corrente é utilizada para dar uma medida da quantidade relativa de antigénio inicialmente presente na amostra. Por exemplo, a taxa de alteração da corrente pode ser utilizada para determinar a concentração de conjugado de sonda, a qual pode estar correlacionada com a concentração do antigénio na amostra.

Utilização de melitina como sonda.

Numa realização, um antigénio ligado a sonda englobando um complexo antigénio-melitina pode ser seco numa parede da câmara de reacção, tal como o descrito

acima. A câmara de detecção pode conter um mediador que englobe ferrocianeto em lipossomas ou vesículas lipídicas. Se o complexo antigénio-melitina chega aos lipossomas, eles irão rebentar e libertar o ferrocianeto. Isto leva a uma rápida ampliação do sinal, isto é, uma pequena quantidade de antigénios livres compete com o complexo antigénio-melitina pelos sítios de ligação nos anticorpos e resulta numa grande concentração de ferrocianeto.

Utilização de peroxidase de rábano-silvestre e fosfatase alcalina em ensaios electroquímicos.

Os ELISAs convencionais utilizam peroxidase de rábano-silvestre (HRP) e fosfatase alcalina (AP) como enzimas num ensaio calorimétrico. Contudo, foram desenvolvidos substratos que permitem que ambas estas enzimas sejam utilizadas num ensaio electroquímico. Nesta realização, a AP pode ser utilizada com p-aminofenil fosfato e HRP e pode ser utilizado com tetratiafulvaleno.

O exemplo não limitativo que se segue ilustra os princípios e a prática desta invenção.

#### **EXEMPLO**

Um ensaio imunossensor exemplar para a proteína C reactiva humana foi realizado em sangue completo,

utilizando pérolas magnéticas revestidas de proteína C reactiva humana.

A proteína C reactiva (PCR) foi, de forma covalente, anexada a 1,5 micrones de pérolas magnéticas BioMag carboxiladas (Cat no BM570; Bangs Laboratories, Indianapolis In, USA). 21,9 mg de pérolas (1 ml) foram lavados 4 vezes com 50mM de substância tampão MES (ácido morfolinoetanosulfônico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA) substância tampão pH 5,2, sendo as pérolas incubadas com esta substância tampão, e utilizando um íman para as concentrar no lado do tubo, e, decorridos 2 minutos, removendo a solução tampão com uma pipeta de transferência. Depois da quarta lavagem, as pérolas foram suspensas num volume final de 0,34 ml de 50mM MES. 40 ul de 100 mg/ml de EDAC (Sigma, St Louis, MO USA) foram adicionados e, decorridos 5 minutos, foram adicionados 450 ug de PCR em salina tamponada em fosfato (Hyttest, Turku Finland). Foi permitido que as pérolas continuassem a incubar por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A PCR não ligada foi removida utilizando um íman para concentrar as pérolas, tal como já foi descrito mais acima. As pérolas foram, então bloqueadas mediante incubação durante 30 minutos numa substância tampão contendo 20mM de Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), 0,15 M de cloreto de sódio pH 7,4 (TBS) e 1mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) e, em seguida, foram lavadas quatro vezes no mesmo tampão utilizando concentração magnética. As pérolas foram armazenadas em

TBS/BSA contendo 0,05% de azida de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA).

Conjugado de glucose desidrogenase/anticorpo.

A conjugação de glucose desidrogenase (Enzima Recombinante *E.coli* "Recombinant *E.coli* enzyme"; Kiikoman Corporation, Chiba, Japan) GDH (glutamato desidrogenase) e anticorpo monoclonal 4C28 clone C2 (Hytest, Turku Finland) foi realizada utilizando os reagentes MBS (estér de M-maleimido de benzoílo-N-hidroxisuccinimida) com base no método descrito por O Sullivan et. al (Anal. Biochem. 100 100-108 1979).

Neste exemplo, o MBS reagiu com grupos amino e o intermediário MBS-GDH foi purificado. Em seguida, grupos maleimida no complexo SMCC-GDH reagiram com grupos sulfidril livres na zona da charneira do anticorpo introduzido por reacção com o reagente redutor HCl cisteamina.

#### 1. Redução de dissulfetos na zona charneira IgG.

Foram incubados seis mg de HCl cisteamina (Sigma-Adrich, St Louis, MO USA) durante 90 minutos a 37°C com 1 ml de uma solução contendo 2 mg/ml de anticorpo monoclonal (mAb) C2 num tampão contendo 0,1 M de fosfato de sódio pH 7,4; 0,15 M de cloreto de sódio (NaCl) e 2,5 mM de EDTA

(tampão de reacção). A reacção foi terminada aplicando a mistura numa coluna de dessalinização (PD-10; Amersham) equilibrada em tampão de reacção, e a eluição continuou no mesmo tampão. Foram recolhidas fracções de meio milímetro, e três fracções contendo a maior quantidade de proteína foram agrupadas. Este material foi levado a reagir com a enzima activada por maleimida imediatamente após ter sido agrupado. A concentração proteica foi determinada ao assumir uma absorvância de 280 nm de 1,35 para uma solução de 1mg/ml de anticorpo C2.

#### Activação da enzima por maleimida.

Ao mesmo tempo, foram dissolvidos 2 mg de GDH em 0,1ml do tampão de reacção, foram adicionados 50 ul de uma solução contendo 7,6 mg/ml de MBS (Pierce Rockford III USA) em DMSO, e foram deixados em incubação por 30 minutos a 37°C. A reacção foi terminada pela aplicação da mistura numa coluna de dessalinização (PD-10; Amersham) equilibrada no tampão de reacção, e a eluição prosseguiu no mesmo tampão. Foram recolhidas fracções de meio milímetro, e as três fracções contendo a maior parte da proteína foram agrupadas.

### 3. Conjugação do anticorpo com a enzima

O IgG reduzido e o GDH reagido em maleimida foram misturados, um com o outro, numa relação de 1 mg de anticorpo para 0,9 mg de GDH, e deixados em incubação durante uma noite a uma temperatura de 4°C. A reacção foi

terminada adicionando 6mg de HCl cisteamina e permitindo que incubasse por mais 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, aplicando alíquotas de 1,5 ml para separar colunas dessalinizadas equilibradas, e continuando a eluição num tampão contendo 20 mM de Tris e 0,15 M cloreto de sódio pH 7,4 (TBS). As três fracções de 0,5ml contendo a mais elevada concentração de proteína de cada coluna foram agrupadas. Foi adicionado cloreto de cálcio a uma concentração final de 1mM, azida de sódio a uma concentração final de 0,1% e PQQ a uma concentração final de 0.05 mg/ml. O conjugado foi guardado a uma temperatura de 4° antes de ser utilizado.

Imunoensaio convencional para a proteína C reactiva.

Os níveis de PCR em amostras foram também determinados pelo imunoensaio enzimático convencional. Todas as incubações foram efectuadas à temperatura ambiente.

Os poços das microplacas 11 Immulon foram revestidos com 50 ul de um anticorpo monoclonal C2 de 10ug/ml em tampão TBS durante 60 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo não ligado foi removido invertendo e batendo levemente na placa e, em seguida, lavando os poços quatro vezes com 200 ul de tampão TBS contendo 0,1% TWEEN20 (monolaurato de polioxietileno sorbitano; Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA).

Em seguida, adicionaram-se 50  $\mu$ l de substâncias standard conhecidas ou uma amostra contendo quantidades desconhecidas de PCR, geralmente na diluição de 100-1000 em TBS/TWEEN, a cada poço, e foram deixados em incubação por mais uma hora. O antigénio não ligado foi, então, removido pelo procedimento de lavagem acima descrito. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu$ l de uma solução de 220 ng/ml de anticorpo C6 biotinilado em TBS/TWEEN, e permitiu-se a sua incubação por mais 60 minutos. Depois de lavar o segundo anticorpo não ligado, adicionou-se 50  $\mu$ l de uma diluição de 1/1000 de neutraavidina-peroxidase de rábano-silvestre (Pierce Rockford III USA) e permitiu-se que a reacção prosseguisse por mais 15 minutos. Por fim, depois da lavagem para remover enzimas não ligadas, foi detectada uma enzima ligada pela adição de substrato ABTS (Pierce Rockford III USA).

A biotinição do anticorpo C6 foi executada pelo seguinte método. Dois miligramas de anticorpo monoclonal C6 (Hytest, Turku Finland) foram dissolvidos em 1 ml de 50 mM de bicarbonato de sódio e reagidos com 29  $\mu$ l de 1 mg/ml de solução de éster de biotina N-hidroxisuccinimida (Pierce) em dimetilsulfóxido (Sigma). Permitiu-se que a reacção prosseguisse por mais 30 minutos, sendo ocasionalmente mexida. A reacção foi terminada aplicando a mistura a uma coluna de dessalinização (PD-10; Amersham) equilibrada em 20 mM de Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), 0,15 M de cloreto de sódio pH 7,4 (TBS) e a eluição prosseguiu no mesmo tampão. Fracções de meio milímetro foram recolhidas e as três fracções que contêm a maior

parte da proteína foram agrupadas. O material foi guardado a uma temperatura de 4°C. A concentração proteica foi determinada pela absorvância a 280 nm, assumindo que uma solução de 1mg/ml de anticorpo C6 teve uma absorvância de 1,2.

### **BANDAS SENSORAS**

As bandas sensoras foram construídas da seguinte forma:

1) As membranas do eléctrodo consistiram em Melinex, com 178 µm de espessura, que foi revestido por pulverização com uma camada de ouro. A resistência da superfície da cobertura de ouro foi de 8-12 ohms/por quadrado.

O eléctrodo foi revestido com uma solução de 0,3 mM de ácido 2-mercaptoetanol sulfónico durante 20 segundos e, em seguida, foi seco com um jacto de ar. Este procedimento mantém o eléctrodo hidrófilo e reduz a sujidade por hidrocarbonetos transportados pelo ar e outros contaminantes.

3) Um processo com a membrana foi utilizado para secar faixas de químicos (por exemplo, os reagentes acima descritos) sobre o eléctrodo. A membrana foi transportada passando por uma lâmina fixa que deixou uma incisão na superfície e ajudou a definir a área do eléctrodo em

funcionamento. A membrana foi, então, transportada passando por duas agulhas com pipeta, em aço inoxidável e de pontas arredondadas, ligadas a uma bomba de seringa, que depositaram:

- o reagente electroquímico (ferricianeto, glucose, etc.), levando a que este cubra a incisão, e

- o conjugado anticorpo-enzima no outro lado da incisão, a uma distância de cerca de 1-2 mm do reagente electroquímico.

4) As faixas com químicos foram secas com secadores de infravermelhos e ar quente a 50 graus C.

5) Os formatos das câmaras de reacção e detecção foram cortados superficialmente dentro do espaçador, utilizando uma ferramenta de corte rotativa.

6) O espaçador foi laminado por cima do eléctrodo, sendo que o conjugado anticorpo-enzima ficou na câmara de reacção e o reagente electroquímico ficou na câmara de detecção.

7) A câmara de enchimento foi perfurada através do bilaminado utilizando um conjunto de corte macho/fêmea.

8) O antigénio ligado a pérolas paramagnéticas foi barrado sobre uma película de eléctrodo separada.

9) O eléctrodo com as pérolas paramagnéticas foi, então, ligado ao bilaminado da etapa (6), de modo a que a faixa pérola-antigénio ficasse oposta ao conjugado anticorpo-enzima na câmara de reacção.

10) O orifício da saída de ventilação em cada sensor foi perfurado através do trilaminado utilizando um conjunto de cortes macho/fêmea.

11) Os orifícios da saída de ventilação e o lado aberto da câmara de enchimento foram cobertos com "fita mágica" (3M).

12) A membrana trilaminar foi destacada para sensores de rendimento em funcionamento.

Detecção electroquímica de GDH.

A solução continha 5mg/ml 2,3 dimetoxi-5-metil 1,4 benzoquinona (Adrich, WI USA) 326mg/ml de ferricianeto de potássio 400mM glucose num tampão contendo 0,26mg/ml ácido citracónico (Sigma) e 13,3/ml citrato dipotássico.

### Conjugado

Uma solução que continha 400 ug/ml de GDH foi diluída numa solução contendo 1 mM de clorido de cálcio, 10 mg/ml de BSA 0,26 mg/ml de ácido citracónico, 13,3 mg/ml citrato dipotássico e 10 mg/ml de sacarose.

### Pérolas magnéticas

A solução continha 5mg/ml de pérolas revestidas com PCR, 100mg/ml de sacarose, 1mM de cloreto de cálcio, 0,26mg/ml de ácido citracónico e 13,3 mg/ml de citrato dipotássico.

### Preparação da amostra

Na experiência que se segue foi utilizado sangue completo heparinizado, com um hematócrito de 42% e concentração de plasma de 1ug/ml de PCR. (PCR no sangue), para 100ul de sangue completo foi adicionada uma solução de 2,5mg/ml de PCR em salina tamponada com fosfato. Foram adicionados 10ul de salina tamponada com fosfato a outra amostra de 100ul para fins de controlo.

### Procedimento do teste

Foram adicionados aproximadamente 5  $\mu$ l de sangue à câmara de enchimento (identificador 107 da figura 3). O sangue espalhou-se para encher a câmara de enchimento 107 e a câmara de reacção 122 e parou perto da entrada para a câmara de detecção 128. O sangue dissolveu o conjugado da parede da câmara de reacção 122 e permitiu a interacção com as pérolas magnéticas que foram puxadas para o fundo da câmara de reacção 122 pela presença de um íman por baixo da câmara de reacção 122. Na ausência de PCR adicionada, a maioria do conjugado terá capacidade para ligar as pérolas magnéticas.

Depois de uma incubação que durou 40 segundos, o orifício da saída de ventilação 130 na figura 3 foi perfurado. Isto permitiu que o sangue, juntamente com o conjugado GDH não ligado, se espalhasse para além da linha de incisão (106) para o interior da câmara de detecção onde teve início a medição da corrente eléctrica que circulou entre os eléctrodos na câmara de detecção. A corrente gerada pela presença de GDH na câmara de detecção foi medida no decorrer dos 45 segundos que se seguiram. Os resultados abaixo são de seis amostras replicadas do sangue do controlo ou do sangue contendo 250  $\mu$ g/ml de PCR. Eles mostram a corrente em  $\mu$ A aos 5 segundos e aos 45 segundos depois de a câmara de detecção 128 ter sido enchida. A diferença na corrente entre os 5 e os 45 segundos foi utilizada como medida da concentração de PCR na amostra.

Amostra controlo			Com adição de 250 ug/ml PCR				
	5 seg	45 seg	Diferença	5 seg	45 seg	Diferença	
	19,01	27,72	8,71	24,26	40,8	16,54	
	16,99	26,45	9,46	20,32	37,25	16,93	
	20,05	28,41	8,36	26,39	47,25	20,86	
	18,81	31,1	12,29	25,12	50,44	25,32	
	16,75	24,0	7,05	20,41	39,09	18,68	
	22,94	34,22	11,28	17,93	35,77	17,84	

(continuação)

Amostra controlo			Com adição de 250 ug/ml PCR				
	5 seg	45 seg	Diferença	5 seg	45 seg	Diferença	
Méd			9,525			19,36	
Desv Pad			1,77			1,55	

Tal como o mostrado na tabela acima, existiu uma diferença significativa na taxa de alteração da corrente entre a amostra de controlo e a amostra à qual foram adicionados 250 ug/ml de PCR. O imunossensor foi, dessa forma, capaz de detectar a presença de PCR dentro da amostra.

Um perito na técnica irá aperceber-se de outras funcionalidades e vantagens da invenção com base nas realizações acima descritas. Em conformidade com isto, a

invenção não deve ser limitada pelo que foi especificamente mostrado e descrito, excepto no que está indicado nas reivindicações anexadas.

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.*

**Documentos de Patente citados na descrição**

- US 5156972 A [0002]
- US 5965456 A [0002]
- WO 0208763 A [0003]
- EP 1347302 A [0003]
- US 6823750 B [0022]

**Literatura não relacionada com patente citada na descrição**

- O SULLIVAN et al. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 100, 100-108 [0068]

## Reivindicações

1. Um biossensor para utilização na detecção de um analito alvo numa amostra líquida, englobando o dispositivo:

uma câmara de enchimento adaptada para ser enchida por meio de acção capilar;

uma câmara de reacção, incluindo um sítio de ligação imobilizado e um conjugado de sonda, em que o conjugado de sonda engloba um parceiro de ligação adaptado para se ligar ao sítio de ligação imobilizado, em que o sítio de ligação imobilizado está posicionado em, pelo menos, uma pérola magnética, e em que o sítio de ligação imobilizado e o conjugado de sonda estão posicionados em diferentes superfícies dentro da câmara de reacção;

uma câmara de detecção, incluindo eléctrodos para detectar uma reacção electroquímica na câmara de reacção; e

uma passagem de líquidos entre a câmara de reacção e a câmara de detecção, em que a presença ou ausência de um analito alvo na amostra líquida resulta numa alteração na quantidade do conjugado de sonda ligado na câmara de reacção, sendo a alteração detectável com uma reacção electroquímica na câmara de detecção.

2. O biossensor da reivindicação 1, em que o sítio de ligação imobilizado é um antigénio e o parceiro de ligação é um anticorpo.

3. O biossensor da reivindicação 1, em que o sítio de ligação imobilizado é um anticorpo e o parceiro de ligação é um antigénio.
4. O biossensor da reivindicação 1, em que a dimensão capilar da câmara de reacção é inferior, em tamanho, à da câmara de enchimento.
5. O biossensor da reivindicação 1, em que a câmara de detecção inclui uma saída de ventilação.
6. O biossensor da reivindicação 5, em que a saída de ventilação pode ser aberta mediante perfuração de uma camada exterior do dispositivo.
7. O biossensor da reivindicação 5, em que a saída de ventilação pode ser aberta removendo uma porção de uma camada exterior do dispositivo.
8. O biossensor da reivindicação 5, em que a saída de ventilação pode ser aberta rasgando ao longo de uma perfuração.
9. O biossensor da reivindicação 1, em que a câmara de reacção inclui uma abertura para a atmosfera.
10. O biossensor da reivindicação 1, em que, pelo menos, uma das pérolas magnéticas é seca sobre uma superfície interna da câmara de reacção.

**11.** O biossensor da reivindicação 1 engloba, ainda, um íman.

**12.** O biossensor da reivindicação 11, em que o íman está disposto de modo a mover, pelo menos, uma pérola magnética, para que esta fique em contacto íntimo com o conjugado de sonda depois de a amostra líquida ter sido introduzida na câmara de reacção.

**13.** O biossensor da reivindicação 1, em que o conjugado de sonda inclui uma enzima.

**14.** O biossensor da reivindicação 13, que engloba, ainda, um mediador e um substrato enzimático.

**15.** Um método para detectar um analito alvo numa amostra líquida, englobando o método as etapas de:

colocar uma amostra num biossensor, como o definido na reivindicação 1;

permitir que uma reacção prossiga na câmara de reacção entre um sítio de ligação imobilizado e um conjugado de sonda; e

mover a amostra para o interior de uma câmara de detecção e detectar electroquimicamente o nível do conjugado de sonda, em que a presença de um analito alvo na amostra resulta num aumento ou numa diminuição da quantidade de conjugado de sonda detectado na câmara de detecção.

**16.** O método da reivindicação 15, em que o sítio de ligação imobilizado inclui um antigénio alvo e o conjugado

de sonda inclui um anticorpo adaptado para efectuar ligação ao antigénio alvo.

**17.** O método da reivindicação 15, em que o conjugado de sonda inclui uma enzima.

**18.** O método da reivindicação 15, em que a amostra é movida da câmara de reacção para a câmara de detecção por meio de acção capilar.

**19.** O método da reivindicação 15, em que a etapa de mover a amostra inclui abrir uma saída de ventilação.

**20.** O método da reivindicação 15, que engloba, ainda, a etapa de quantificar a quantidade de antigénio alvo na amostra, com base em sinais eléctricos recebidos da câmara de detecção.

**21.** Um método de fabrico de um biossensor, de acordo com a reivindicação 1, para utilização na detecção de um analito alvo numa amostra líquida, englobando o método as etapas de:

proporcionar uma primeira camada (136);

remover uma secção da primeira camada (136) para formar uma parte da câmara de enchimento (107), uma parte da câmara de reacção (122) e uma parte da câmara de detecção (128);

proporcionar uma segunda camada (134);

montar um primeiro lado da segunda camada (134) num primeiro lado da primeira camada (136);

remover uma secção da segunda camada (136), que se estende por cima da parte da câmara de enchimento (107), correspondendo, essencialmente, a essa mesma parte da câmara de enchimento (107), estendendo-se a segunda camada (134) ainda sobre a parte da câmara de reacção (122) e sobre a parte da câmara de detecção (128), em que a parte da câmara de reacção (122) e a parte da câmara de detecção (128) se encontram em comunicação líquida com a parte da câmara de enchimento (107);

proporcionar uma terceira camada (132);

montar um primeiro lado da terceira camada (132) num segundo lado da primeira camada (136), estendendo-se a terceira camada (132) sobre a parte da câmara de enchimento (107), sobre a parte da câmara de reacção (122) e sobre a parte da câmara de detecção (128);

montar um primeiro lado de uma camada de vedação (142) num segundo lado da segunda camada (134), em que as camadas formam uma faixa com uma pluralidade de superfícies exteriores;

formar uma passagem que se estende através de uma superfície exterior da faixa para o interior da câmara de detecção, para que forme uma saída de ventilação (130) da câmara de detecção; e

colocar um sítio de ligação imobilizado (44) e conjugado de sonda (50) no interior da câmara de reacção (122).

**22.** Um método de fabrico de um biossensor, de acordo com a reivindicação 1, para utilização na detecção de um analito alvo numa amostra líquida, englobando o método as etapas de:

proporcionar uma primeira camada (36);

remover uma secção da primeira camada (36) para formar uma parte da câmara de enchimento (107), uma parte da câmara de reacção (22) e uma parte da câmara de detecção (28);

proporcionar uma segunda camada (34);

montar um primeiro lado da segunda camada (34) num primeiro lado da primeira camada (36), estendendo-se a segunda camada (34) sobre a parte da câmara de enchimento (107), sobre a parte da câmara de reacção (22), e sobre a parte da câmara de detecção (28);

proporcionar uma terceira camada (32);

montar um primeiro lado da terceira camada (32) num segundo lado da primeira camada (36), estendendo-se a terceira camada (32) sobre a parte da câmara de enchimento (107), sobre a parte da câmara de reacção (22) e sobre a parte da câmara de detecção (28);

montar um primeiro lado de uma primeira camada de vedação (42) num segundo lado da segunda camada (34);

montar um primeiro lado de uma segunda camada de vedação (46) num segundo lado da terceira camada (32), em que as camadas formam uma faixa com uma pluralidade de superfícies exteriores;

formar uma passagem que se estende através de uma superfície exterior da faixa para o interior da câmara de detecção, para que se forme uma saída de ventilação (30) da câmara de detecção; e

colocar um sítio de ligação imobilizado (44) e conjugado de sonda (50) no interior da câmara de reacção,

em que a altura da câmara de reacção (22) é superior à altura da câmara de detecção (28), ou em que a altura da câmara de reacção (22) e a da câmara de detecção (28) são iguais e as superfícies da câmara de reacção (22) e/ou da câmara de detecção (28) são modificadas, ou materiais de enchimento são adicionados à câmara de detecção (28).

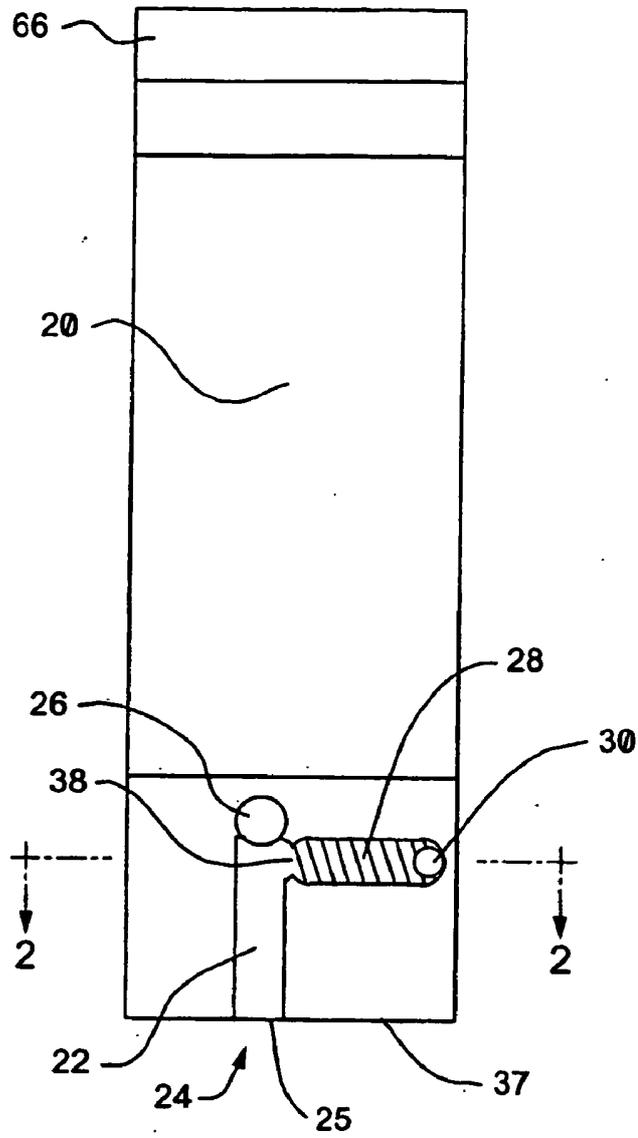


FIG. 1

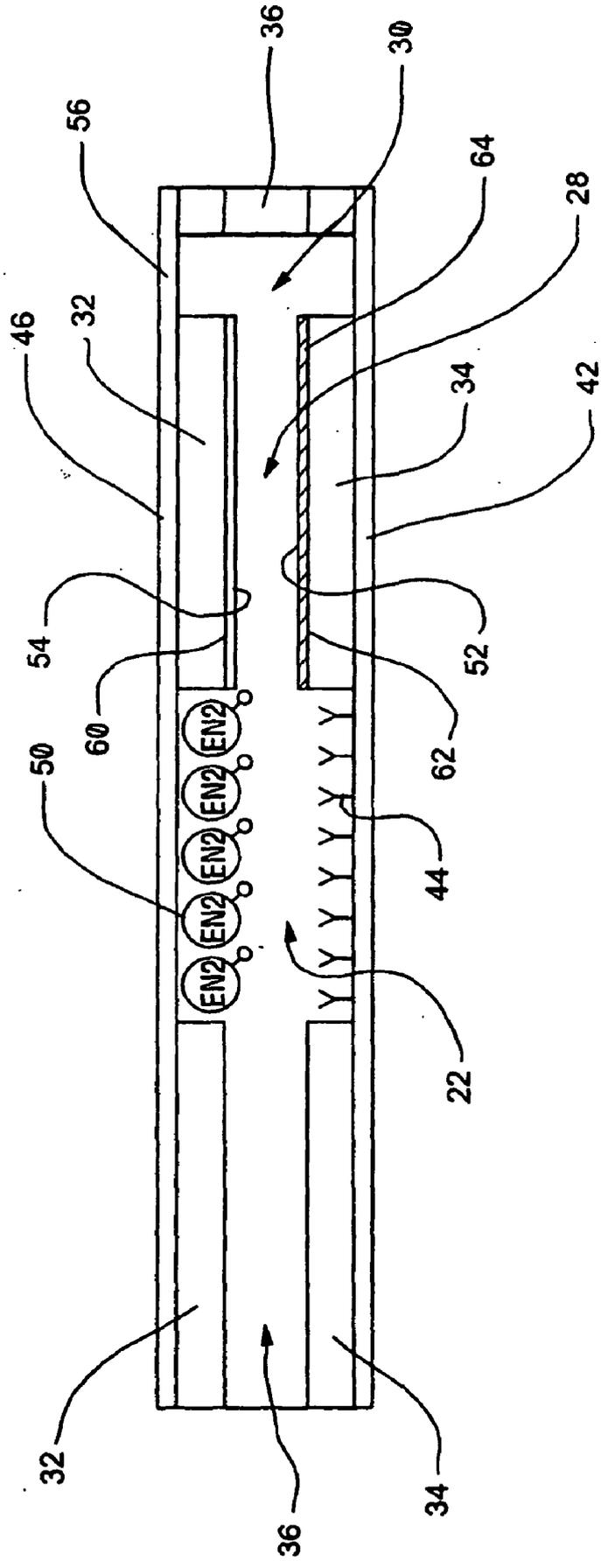


FIG. 2

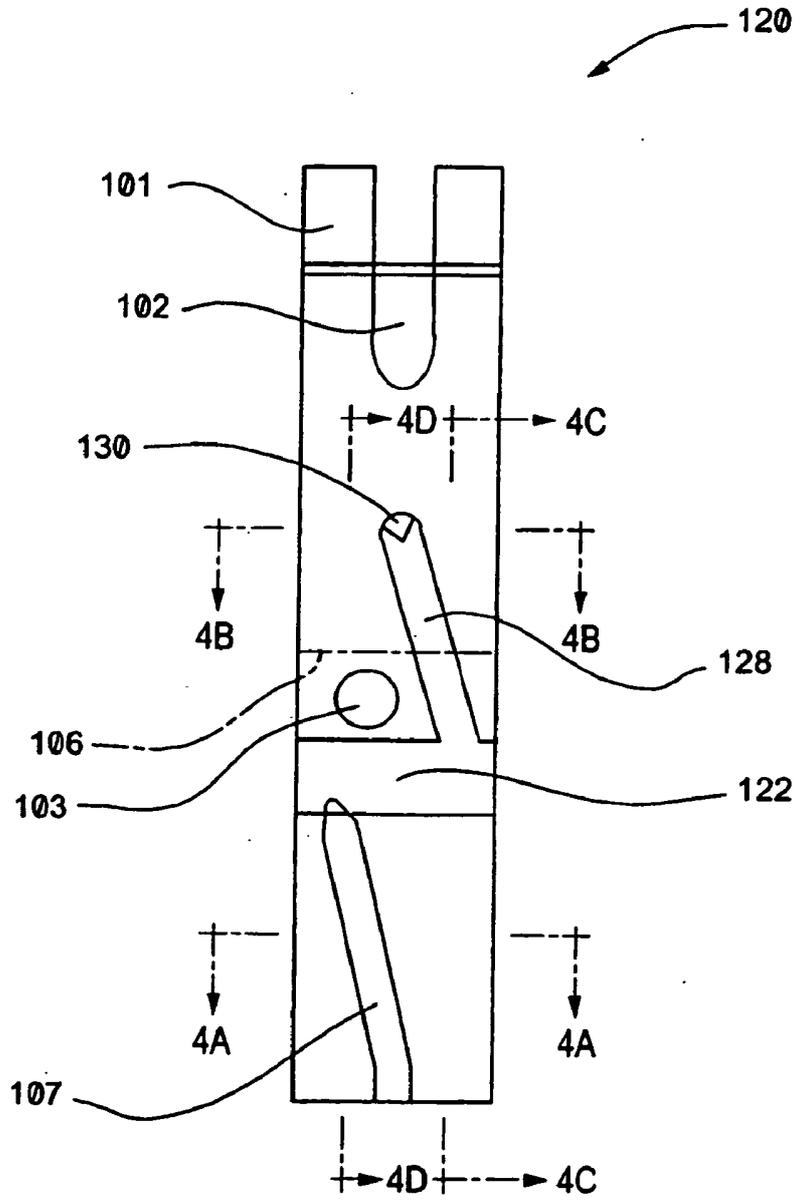


FIG. 3

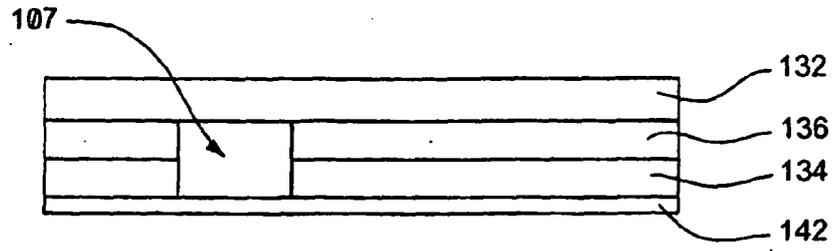


FIG. 4A

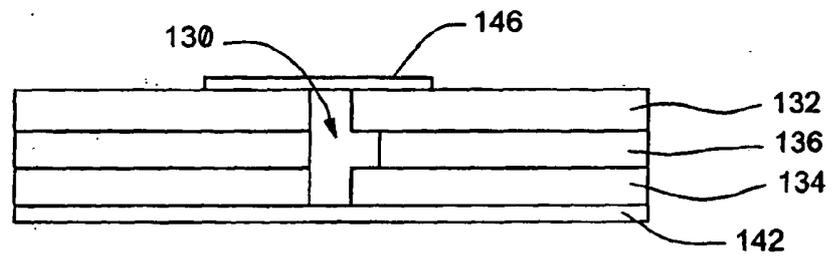


FIG. 4B

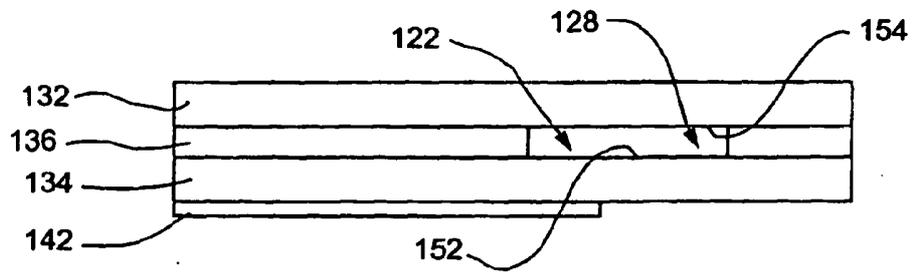


FIG. 4C

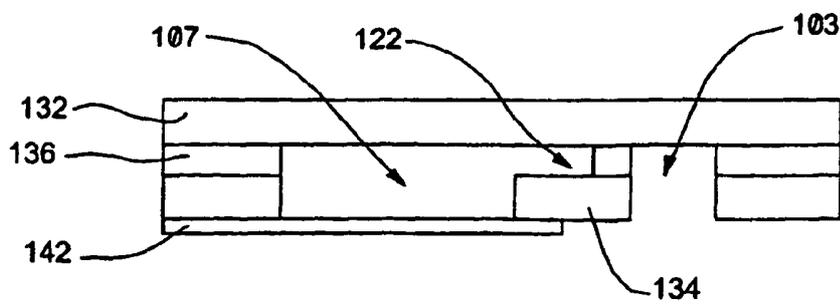


FIG. 4D