

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 881 861**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015** **PCT/US2015/052317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16049506**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015** **E 15778491 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021** **EP 3198280**

54 Título: **Sensores para evaluar la coagulación en muestras de fluidos**

30 Prioridad:

26.09.2014 US 201462055768 P

26.09.2014 US 201462055772 P

26.09.2014 US 201462055780 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2021

73 Titular/es:

ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)

400 College Road East

Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

ZHAO, TIAN-XIAN;

WONG, ANJULIA CHIU-YUK;

MARTIN, GLENN BRIAN;

DI TULLIO, KATRINA PETRONILLA;

THIBODEAU, ISABELLE LOUISETTE;

BREEZE, STEVEN ROY;

SUTRALA, SMITHA RK;

HONG, ERIC y

BALL, SHEILA DIANE

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 881 861 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

Sensores para evaluar la coagulación en muestras de fluidos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a dispositivos de prueba analítica que comprenden sensores microambientales y métodos para analizar la coagulación en una muestra de fluido aplicada a los sensores microambientales y, en particular, a realizar análisis de coagulación mediante el uso de sensores microambientales en un cartucho de prueba de punto de atención.

Antecedentes de la invención

La coagulación de la sangre o la hemostasia es un mecanismo protector importante del cuerpo para sellar las heridas causadas por lesiones corporales. La hemostasia tiene lugar en dos fases. La hemostasia primaria (celular) sirve para detener rápidamente el sangrado y minimizar la pérdida de sangre. La hemostasia primaria involucra células lesionadas del endotelio y la capa subyacente de células que emiten señales que permiten que las plaquetas sanguíneas (trombocitos) se acumulen en una región de un vaso sanguíneo lesionado, lo que forma un tapón que sella provisionalmente la herida. La hemostasia o coagulación secundaria (plasmática) se inicia al mismo tiempo que la hemostasia primaria e implica un proceso por el cual la sangre se coagula. Más específicamente, la coagulación está controlada por una cascada de coagulación de señalización que consta de trece factores de coagulación que interactúan y se activan entre sí. Al final de la cascada de coagulación, el fibrinógeno se convierte en fibrina. Una red de fibras de fibrina refuerza el cierre de la herida, y las plaquetas y otras células sanguíneas quedan atrapadas en esta red y forman un coágulo de sangre (trombo). Por último, las plaquetas y el endotelio liberan factores de crecimiento que controlan el proceso de cicatrización de heridas. Al final de estos procesos, las enzimas del plasma sanguíneo disuelven la red de fibrina.

La hemostasia requiere un equilibrio sutil de procoagulantes y anticoagulantes de modo que la sangre circulante siga siendo un fluido de viscosidad relativamente baja y la coagulación solo comience para sellar las heridas. Los procoagulantes previenen el sangrado excesivo al bloquear el flujo sanguíneo de una herida o un vaso dañado, mientras que los anticoagulantes evitan que se formen coágulos en el sistema circulatorio, que de cualquier otra manera podrían bloquear los vasos sanguíneos y provocar un infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular.

La cascada de coagulación de la hemostasia secundaria se basa en la conversión catalítica de fibrinógeno, una proteína plasmática soluble, en fibrina insoluble. La enzima que cataliza esta reacción es la trombina, que no circula permanentemente en la sangre en forma activa, sino que existe como protrombina, el precursor inactivo de la trombina. La cascada de coagulación que conduce a la trombina activa consta de dos vías, la extrínseca y la intrínseca, que convergen en una vía común que incluye la trombina activa que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina. La vía extrínseca se inicia en el sitio de la lesión en respuesta a la liberación del factor tisular (factor III) y, por lo tanto, también se conoce como la vía del factor tisular. El factor tisular es un cofactor en la activación catalizada por el factor VIIa del factor X (inactivo) al factor Xa (activo). La segunda vía intrínseca, más compleja, se activa mediante los factores de coagulación VIII, IX, X, XI y XII asociados con las plaquetas. También se requieren las proteínas precalcireína (PK) y cininógeno de alto peso molecular (HK o HMWK), así como también iones de calcio y fosfolípidos secretados por las plaquetas. Cada uno de estos componentes conduce a la conversión del factor X en factor Xa. El punto común en ambas vías es la activación del factor X al factor Xa. El factor Xa es una enzima (por ejemplo, una endopeptidasa de serina) que escinde la protrombina en dos lugares (un enlace arg-thr y luego un enlace arg-ile), que produce trombina activa y, en última instancia, da como resultado la conversión de fibrinógeno en fibrina.

La ruptura de un coágulo de sangre o de la red de fibrina, denominada fibrinólisis, requiere la conversión de fibrina en un producto soluble. Esta lisis es catalizada por la enzima proteolítica plasmina, que circula en forma inactiva, plasminógeno. El activador tisular del plasminógeno (tPA), las enzimas hemolíticas bacterianas (por ejemplo, estreptoquinasa) y las enzimas proteolíticas humanas que se encuentran en la orina (por ejemplo, uroquinasa) activan el plasminógeno. Estos materiales se usan típicamente en terapia trombolítica.

En consecuencia, la cascada de coagulación es un objetivo adecuado para diagnosticar y tratar enfermedades que implican una coagulación sanguínea desregulada o la ausencia de coagulación. Por ejemplo, el diagnóstico de afecciones hemorrágicas tal como la hemofilia, en las que uno o más de los trece factores de coagulación de la sangre implicados en la cascada de coagulación pueden ser defectuosos, se puede lograr mediante una amplia variedad de pruebas de coagulación. Además, se han desarrollado varias pruebas para controlar el progreso de la terapia trombolítica. Se han desarrollado otras pruebas para señalar un estado pretrombótico o hipercoagulable, o controlar el efecto de administrar protamina a los pacientes durante la cirugía de derivación cardiopulmonar. Sin embargo, el principal valor de las pruebas de coagulación está en el seguimiento de la terapia de anticoagulación oral e intravenosa. Tres de las pruebas de diagnóstico clave son el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y el tiempo de coagulación activado (ACT).

El PT es el tiempo que tarda el plasma en coagularse después de la adición de factor tisular (obtenido de animales tales como conejos, o factor tisular recombinante, o de cerebros de pacientes con autopsias). Esto mide la calidad de la vía extrínseca (así como también la vía común) de la coagulación. El PT se usa con mayor frecuencia para controlar la terapia de anticoagulación oral. Los anticoagulantes orales tal como Coumadin® suprimen la formación de protrombina. La prueba tradicional de PT incluye la extracción de sangre en un tubo que contiene citrato de sodio líquido, que actúa como un anticoagulante al unir el calcio en una muestra. En consecuencia, la prueba de PT se basa en la adición de calcio y tromboplastina tisular a la muestra de sangre con citrato, y se mide el tiempo que tarda la muestra en coagularse.

El aPTT es el tiempo que tarda en formarse un coágulo de fibrina. Esto mide la calidad de la vía intrínseca (así como también la vía común) de la coagulación. El aPTT se usa con mayor frecuencia para controlar la terapia de anticoagulación con heparina intravenosa. La administración de heparina tiene el efecto de suprimir la formación de coágulos. La prueba tradicional de aPTT incluye la extracción de sangre en un tubo que contiene citrato de sodio líquido, que actúa como anticoagulante al unir el calcio en una muestra. En consecuencia, la prueba aPTT se basa en la adición de un agente activador, calcio y un fosfolípido a la muestra de sangre citrada (por ejemplo, un plasma pobre en plaquetas) y se mide el tiempo que tarda la muestra en formar un coágulo de fibrina.

El ACT es el tiempo que tarda la sangre entera en coagularse tras la exposición a un activador. La prueba de la vía intrínseca evalúa las vías intrínsecas y comunes de la coagulación. El ACT se usa más comúnmente para monitorear el efecto de dosis altas de heparina antes, durante y poco después de procedimientos que requieren la administración intensa de anticoagulantes, tales como derivación cardíaca, angioplastia cardíaca, trombólisis, oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO) y diálisis continua. La prueba ACT tradicional incluye la adición de sangre total a un tubo que contiene un activador de superficie (por ejemplo, celita, caolín o bolas de vidrio), lo que da como resultado la activación de la cascada de coagulación a través de la vía intrínseca (Factor XII). En consecuencia, la prueba ACT se basa en la adición de un activador a la vía intrínseca de sangre entera fresca a la que no se le ha agregado anticoagulante exógeno, y se mide el tiempo que tarda la muestra en formar un coágulo de fibrina.

Los monitores de coagulación son conocidos por el análisis de sangre total. Por ejemplo, se ha descrito un dispositivo de flujo capilar en la patente de Estados Unidos núm. 4,756,884 en la que los reactivos secos se colocan en un analizador, que luego se calienta a 37 °C antes de introducir una gota de sangre. La muestra se mezcla con el reactivo mediante extracción capilar. El mecanismo de detección se basa en la luz láser que atraviesa la muestra. Las células sanguíneas que se mueven a lo largo de la vía de flujo producen un patrón moteado específico de la sangre no coagulada. Cuando la sangre se coagula, el movimiento deja de producir un patrón específico de la sangre coagulada. Se ha diseñado una matriz absorbente con reactivos de coagulación secos para una única prueba de coagulación en un dispositivo (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,344,754) con medios integrados para determinar un cambio en la resistencia eléctrica al agregar una muestra a la matriz. La detección de la reacción se basa en un conjunto óptico separado que se alinea e interroga a la región absorbente del dispositivo.

Los ensayos de coagulación en el punto de atención también son conocidos para el análisis de muestras de fluidos o muestras biológicas. Por ejemplo, se conocen cartuchos en el punto de atención para realizar una variedad de ensayos que responden a un cambio en la viscosidad de una muestra de fluido, que incluye los ensayos que involucran pruebas de coagulación, aglutinación, fibrinólisis de sangre total y, en general, ensayos para obtener información sobre el proceso de coagulación o lítico (lisis) (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 5,447,440 y 5,628,961). Además, se conocen cartuchos en el punto de atención que proporcionan un medio por el cual una muestra de sangre se puede medir y mezclar cuantitativamente con reactivos que activan la vía primaria o secundaria de la cascada de coagulación para la posterior detección de la formación de coágulos mediante el uso de un sensor microfabricado (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,750,053; 7,923,256; 7,977,106 y 6,438,498).

Sin embargo, los sistemas de ensayo de coagulación en el punto de atención configurados para realizar los ensayos de coagulación de muestras fluidas antes mencionados comprenden generalmente el reactivo y el sustrato impresos en una forma soluble en una cubierta o base del cartucho de punto de atención o dispositivo de prueba. Durante el análisis, la muestra se empuja y tira mediante un proceso mecánico para disolver y mezclar el reactivo y el sustrato en la muestra. Esta disposición de tener el reactivo y el sustrato impresos en esta forma en combinación con el requisito de mezclar el reactivo y el sustrato en la muestra ha obstaculizado la integración de las pruebas de coagulación en un solo cartucho de punto de atención o dispositivo de prueba debido al potencial de activación cruzada de las dos vías distintas en la cascada de coagulación. En consecuencia, existe la necesidad de un diseño mejorado de cartucho de punto de atención o dispositivo de prueba que permita realizar una combinación de pruebas de coagulación en un solo cartucho de punto de atención o dispositivo de prueba.

El documento US 2013/002278 describe sensores y dispositivos para determinar la usabilidad del dispositivo sensor, por ejemplo, para monitorear dispositivos en el punto de atención.

El documento WO 2012/013937 describe una capa de revestimiento de sensor que comprende una capa de un polímero depositada sobre un transductor y una capa de un péptido depositada sobre dicha capa de un polímero.

El documento WO 2009/053834 describe un sensor con electrodos opuestos y tiras reactivas que usan este sensor. El sensor puede usarse para medir la coagulación de la sangre o del plasma en ensayos como el tiempo de protrombina (TP) y el potencial de trombina, por ejemplo, en el monitoreo del anticoagulante en el punto de atención.

El documento WO 2004/061418 describe cartuchos que comprenden una cámara de detección con electrodos integrados que pueden usarse para realizar mediciones de luminiscencia de electrodos. También describe métodos para inmovilizar reactivos de ensayo de forma controlada en estos electrodos y otras superficies.

El documento DE 100 16 775 describe un sensor electroquímico basado en química seca para la determinación de la coagulación sanguínea o factores de coagulación individuales que tiene al menos dos electrodos sobre un soporte inerte así como también un reactivo seco, caracterizado porque el reactivo contiene un sustrato de proteasa que está compuesto por un residuo peptídico que se puede escindir mediante una trombina y se une a un residuo de fenilendiamina mediante un enlace amida en su extremo carboxilo.

El documento WO 93/22453 describe un artículo de prueba para determinar la capacidad de coagulación en una muestra de sangre que comprende una membrana porosa que tiene un iniciador de coagulación y un sustrato impregnado en la misma. Las dimensiones de los poros y la composición de la membrana se seleccionan de modo que solo el plasma sanguíneo pueda pasar al interior de la membrana, donde se inicia la coagulación. El sustrato es activado por un componente de la vía de coagulación, típicamente trombina, y produce una señal detectable tras la activación.

Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a un sensor de prueba para un ensayo de coagulación sanguínea que incluye al menos un transductor revestido con una capa de polímero. La capa de polímero es una capa de soporte porosa que incluye inmovilizado en ella un péptido escindible con trombina y en donde el péptido escindible con trombina comprende un resto detectable unido por una amida escindible con trombina.

En algunas modalidades, el sensor de prueba es un sensor de PT, que opcionalmente incluye un polímero neutralizador de heparina. El sensor de PT incluye opcionalmente (i) un reactivo de PT formado como una capa sobre la capa de polímero, (ii) la capa de polímero que comprende el reactivo de PT, o (iii) el reactivo de PT ubicado adyacente al menos un transductor. El reactivo de PT puede incluir, por ejemplo, uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en: factor tisular no recombinante, factor tisular recombinante, un lípido natural o sintético, un fosfolípido natural o sintético, una combinación de lípidos naturales y sintéticos, una combinación de fosfolípidos naturales y sintéticos, portador de proteínas, un agente estabilizante, un agente antimicrobiano, una sal de calcio, una sal de potasio, un polímero soluble en agua, un azúcar, gelatina, agarosa, un polisacárido, un sacárido, sacarosa, polietilenglicol, fosfato de sodio, glicina, un aminoácido, antioxidantes, un detergente, una sal tampón y un tampón.

En algunas modalidades, el al menos un transductor es un electrodo o un detector óptico. Opcionalmente, el resto detectable es una especie electroactiva, un tinte óptico o uno de entre un emisor de fluorescencia, bioluminiscencia o quimioluminiscencia.

En otra modalidad, la capa de polímero se selecciona del grupo que consiste en: alcohol polivinílico (PVA), alcohol polivinílico de estirilpiridinio (SBQ-PVA), agarosa, poliacrilamida, metacrilato de polimetilo, N-metilpirrolidona, polivinilpirrolidona, poliimida, un látex formador de película, sepharose™, poliuretanos, acrilatos, metacrilatos, polietilenglicoles, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), hidroxipropilcelulosa, celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructanos, derivados de ácido fructólidos, polialcóclicos, carboximetilcelulosa, ácido poliláctico y poli (ácido láctico co-glicólico).

En otra modalidad, el péptido escindible con trombina se selecciona del grupo que consiste en: HD-Phe-Pip-Arg, HD-Chg-Abu-Arg, CBZ-Gly-Pro-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, HD -Phe-Pro-Arg, ciclohexilglicina-Ala-Arg, Tos-Gly-Pro-Arg, Bz-Phe-Val-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Hyp -Arg, Ac- (8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Val-Pro-Arg, Ac-Gly-Pro-Arg, Ac- (8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Gly-Pro-Arg, Ac -Gly-Hyp-Arg y HD-Chg-Abu-Arg.

En otra modalidad, el resto detectable se selecciona del grupo que consiste en: p-aminofenol, una quinona, un ferroceno, ferrocianuro, otras especies organometálicas, p-nitroanilina, o-dianisidina, 4,4'-bensidina, 4-metoxi 2-naftilamina, N-fenil-p-fenilendiamina, N-[p-metoxifenil]-p-fenilendiamina y derivados de fenazina.

En algunas modalidades, el sensor de prueba es un sensor aPTT, que opcionalmente incluye un polímero sustancialmente no neutralizante de heparina. El sensor aPTT puede incluir opcionalmente (i) un reactivo aPTT formado como una capa sobre la capa de polímero, (ii) la capa de polímero que comprende el reactivo aPTT, o (iii) reactivo aPTT ubicado adyacente al menos un transductor. El reactivo aPTT puede incluir uno o más componentes

seleccionados del grupo que consiste en: ácido elágico, celita, caolín, tierra de diatomeas, arcilla, dióxido de silicio, lípidos sintéticos o naturales, fosfolípidos sintéticos o naturales, dextrano, dextrina, tergitol, un tampón, una proteína portadora, un aminoácido, un estabilizador, un antimicrobiano, un antioxidante, un detergente, un sacárido, un polisacárido, sacarosa, polietilenglicol, derivados de polietilenglicol, glicina, gelatina, ramnosa, trehalosa y un azúcar.

En otra modalidad, el sensor de prueba es un sensor de ACT, que opcionalmente incluye un polímero sustancialmente no neutralizante de heparina. El sensor de ACT puede incluir opcionalmente (i) un reactivo de ACT formado como una capa sobre la capa de polímero, (ii) la capa de polímero que comprende el reactivo de ACT, o (iii) el reactivo de ACT situado junto al menos un transductor. El reactivo de ACT puede incluir uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en: ácido elágico, celita, caolín, tierra de diatomeas, arcilla, dióxido de silicio, lípidos sintéticos o naturales, fosfolípidos sintéticos o naturales, dextrano, dextrina, tergitol, un tampón, una proteína portadora, un aminoácido, un estabilizador, un antimicrobiano, un antioxidante, un detergente, un sacárido, un polisacárido, sacarosa, polietilenglicol, derivados de polietilenglicol, glicina, gelatina, ramnosa, trehalosa y un azúcar.

En algunas modalidades, la presente invención se dirige a una capa de polímero sustancialmente neutralizante de heparina que incluye alcohol polivinílico reticulado (PVA) y un péptido escindible con trombina con un resto de señal. En modalidades alternativas, la presente invención se dirige a una capa de polímero sustancialmente no neutralizante de heparina que incluye hidroxipropilcelulosa y un péptido escindible con trombina con un resto de señal.

La capa de polímero es sustancialmente plana y tiene un grosor en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 100 μm . Alternativamente, la capa de polímero está sustancialmente abovedada y tiene un grosor máximo de la bóveda en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 100 μm .

La capa de polímero se configura para formarse mediante microdispensación. Alternativamente, la capa de polímero se configura para formarse mediante revestimiento por rotación y modelado.

La capa de polímero comprende además un plastificante para la hidroxipropilcelulosa. Opcionalmente, el plastificante es citrato de trietilo o citrato de acetiltriethyl.

La capa de polímero comprende además un reticulante para la hidroxipropilcelulosa. Opcionalmente, el reticulante es una resina que es reactiva con un grupo hidroxilo disponible de la hidroxipropilcelulosa.

La solicitud describe un método para realizar múltiples pruebas de tiempo de coagulación de diagnóstico en una muestra de sangre total. El método incluye proporcionar un dispositivo de prueba en el punto de atención con un sensor de PT microambiental dispuesto en una primera región de un conducto dentro del dispositivo de prueba y un sensor de PTT microambiental en una segunda región del conducto, modificando la muestra de sangre total con un reactivo de PT en la primera región y un reactivo de aPTT en la segunda región, esperando una cantidad de tiempo predeterminada para que la muestra de sangre total modificada se difunda en un sustrato de PT inmovilizado en la primera región y un sustrato de aPPT inmovilizado en la segunda región, y determinar un PT con el sensor de PT y un aPTT con el sensor de aPTT.

El sustrato de PT inmovilizado se coloca sobre el sensor de PT. Opcionalmente, el sustrato de PTT inmovilizado se coloca sobre el sensor de PTT.

También se describe un método para realizar múltiples pruebas de tiempo de coagulación de diagnóstico en una muestra de sangre total. El método incluye proporcionar un dispositivo de prueba en el punto de atención con un sensor de TP microambiental dispuesto en una primera región de un conducto dentro del dispositivo de prueba y un sensor de ACT microambiental en una segunda región del conducto, modificando la muestra de sangre total con un reactivo de PT en la primera región y un reactivo de ACT en la segunda región, esperando una cantidad de tiempo predeterminada para que la muestra de sangre total modificada se difunda en un sustrato de PT inmovilizado en la primera región y un sustrato de ACT inmovilizado en la segunda región y determinando un PT mediante el uso del sensor de PT, y un ACT mediante el uso del sensor de ACT.

En algunas modalidades, el sustrato de PT inmovilizado se coloca sobre el sensor de PT. Opcionalmente, el sustrato ACT inmovilizado se coloca sobre el sensor de ACT.

Breve descripción de los dibujos:

La presente invención se entenderá mejor a la vista de las siguientes figuras no limitantes.

La Figura 1 muestra un esquema de cartucho de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 2 y 3 muestran un conducto que comprende un reactivo/sustrato soluble y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

- La Figura 4 muestra un reactivo difusible, una capa de sustrato-polímero inmovilizado y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la presente invención;
- 5 Las Figuras 5 y 6 muestran gráficos que proporcionan evidencia empírica de aspectos de la presente invención;
- Las Figuras 7A, 7B y 7C ilustran el principio de funcionamiento del sensor microambiental que comprende un reactivo y/o sustrato, inmovilizado o no en una capa de polímero, y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 10 La Figura 8 muestra un esquema de cartucho de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- La Figura 9 muestra una vista lateral de la fabricación de una capa de reactivo/sustrato-polímero inmovilizado de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 15 Las Figuras 10-12 muestran gráficos que proporcionan evidencia empírica de aspectos de la presente invención;
- Las Figuras 13A, 13B y 13C muestran múltiples disposiciones para un reactivo difusible, una capa de sustrato-polímero inmovilizado y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 20 La Figura 14 muestra una vista lateral de la fabricación de un sensor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- Las Figuras 15 y 16 muestran múltiples configuraciones de sensores de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 25 La Figura 17 muestra una vista superior de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- Las Figuras 18 a 20 muestran múltiples configuraciones de sensores de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 30 Las Figuras 21, 22A y 22B ilustran el principio de funcionamiento de los sensores conductimétricos de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 35 La Figura 23 muestra una vista isométrica de un dispositivo sensor desechable y un dispositivo lector de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- La Figura 24 muestra una vista superior de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 40 Las Figuras 25 y 26 muestran una vista superior de una parte de dispositivos sensores desechables de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- Las Figuras 27-29 muestran sistemas de microfluidos avanzados de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 45 La Figura 30 muestra un gráfico de control de mezcla independiente de acuerdo con aspectos de la invención;
- La Figura 31 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 50 Las Figuras 32 y 33 muestran sistemas de microfluidos avanzados de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- La Figura 34 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 55 La Figura 35 muestra un sistema de microfluidos avanzado de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- La Figura 36 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 60 Las Figuras 37 y 38 muestran sistemas de microfluidos avanzados de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
- 65 La Figura 39 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 40, 41A y 41B muestran gráficos que proporcionan evidencia empírica de aspectos de la presente invención; y

Las Figuras 42 y 43 ilustran el principio de funcionamiento para eliminar el chip de tierra de acuerdo con algunos aspectos de la invención.

Descripción detallada de la invención

La solicitud se refiere a dispositivos de prueba analítica que comprenden sensores microambientales y métodos para analizar la coagulación en una muestra de fluido aplicada a los sensores microambientales y, en particular, realizar uno o más tipos de ensayos de coagulación mediante el uso de uno o más sensores microambientales en un solo cartucho de prueba combinado para el punto de atención.

Se describe un chip de circuito integrado que tiene uno o más sensores de prueba que comprenden al menos un transductor revestido con una capa de polímero que incluye un péptido escindible por trombina con un resto detectable de manera que el uno o más sensores operan de manera localizada y son capaces de determinar uno o más tiempos de coagulación de diagnóstico (por ejemplo, PT, aPTT y/o ACT). Más específicamente, la descripción se refiere a un cartucho de análisis de muestras que comprende una cámara de entrada configurada para recibir una muestra biológica (por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina y formas modificadas y diluidas de las mismas) y un conducto conectado de manera fluida a la cámara de entrada y configurado para recibir la muestra biológica de la cámara de entrada. El conducto puede comprender un primer sensor microambiental y un segundo sensor microambiental que se configuran para operar de manera localizada y son capaces de determinar, respectivamente, un primer tiempo de coagulación de diagnóstico (por ejemplo, PT) y un segundo tiempo de coagulación de diagnóstico (por ejemplo, aPTT) diferente del primer tiempo de coagulación de diagnóstico.

El primer sensor microambiental puede incluir al menos un transductor revestido con una capa de polímero sustancialmente neutralizante de heparina y un péptido escindible con trombina con un resto de señal. El segundo sensor microambiental puede incluir al menos un transductor revestido con una capa de polímero sustancialmente no neutralizante de heparina y un péptido escindible con trombina con un resto de señal. El primer y el segundo sensor microambiental pueden incluir además, respectivamente, reactivos del primer y el segundo tiempo de coagulación de diagnóstico dentro de las capas de polímero (por ejemplo, los reactivos están integrados dentro de las capas de polímero), revestidos sobre las capas de polímero (por ejemplo, los reactivos son una capa separada dispensada encima de las capas de polímero), o colocada sustancialmente adyacente a las capas de polímero y/o al menos un transductor (por ejemplo, los reactivos se colocan dentro del conducto de manera que los reactivos se apoyan en o dentro de una distancia interactiva de las capas de polímero y/o el al menos un transductor para que sigan funcionando en conjunto).

Además, se describen sistemas de microfluidos avanzados para el control de la muestra biológica dentro del cartucho de análisis de muestras. El diseño del cartucho de análisis de muestras permite realizar dos pruebas separadas físicamente (por ejemplo, PT y aPTT) simultáneamente en una sola muestra biológica (por ejemplo, Sangre total) dentro del mismo cartucho de análisis de muestras. Los sistemas de microfluidos avanzados pueden comprender elementos de fluidos pasivos (por ejemplo, válvulas, resistencias y elementos de bloqueo de fluidos) además de elementos de fluidos activos del analizador (por ejemplo, una bomba) para dividir la muestra biológica en conductos/regiones separados de un cartucho de análisis de muestras de manera que cada segmento de muestra pueda ser movido posteriormente a un sensor específico (por ejemplo, biosensor o sensor microambiental como se describe en detalle en la presente descripción). Se describe un chip de circuito integrado que puede comprender electrodos conductimétricos de múltiples conductos (por ejemplo, barras de hematocrito) configurados para proporcionar múltiples puntos de contacto con la muestra biológica para un control de microfluidos avanzado sobre los sensores o sensores microambientales.

Como se usa en la presente descripción, el término "sensor microambiental" se refiere a un sensor configurado de manera que cualquier reacción que ocurra en la vecindad inmediata del sensor de una manera suficiente para lograr la señal deseada en el sensor no interferirá de manera detectable (o impactará) otra reacción que ocurre en un sensor adyacente durante el uso normal.

Como se usa en la presente descripción, el término neutralizante de heparina se refiere a un aspecto del sensor que hace que la heparina no fraccionada y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) sean biológicamente inactivas en una muestra biológica en un área suficiente para abarcar el área del sensor microambiental. Por el contrario, "no neutralizante de heparina" se refiere a un aspecto del sensor que no impacta/afecta la actividad biológica de la heparina no fraccionada o LMWH en el área del sensor microambiental.

Como se usa en el presente documento, el término "inmovilizado" se refiere a un aspecto del sensor microambiental que está sustancialmente limitado en movimiento y, por tanto, localiza este aspecto del microambiente en un área general.

Como se usa en la presente descripción, el término "sustrato" se refiere a una molécula que es el objetivo de una reacción enzimática o una entidad física que forma la base de una estructura.

Descripción general de la coagulación sanguínea

El proceso de coagulación de la sangre y la posterior disolución del coágulo tras la reparación del tejido lesionado se denomina hemostasia. Para que se produzca la hemostasia, las plaquetas deben adherirse al colágeno expuesto, liberar el contenido de sus gránulos y agregarse. La adhesión de las plaquetas al colágeno expuesto en las superficies de las células endoteliales está mediada por el factor von Willebrand (vWF). La activación de las plaquetas a través de la trombina es necesaria para su consiguiente agregación a un tapón plaquetario. Sin embargo, igualmente significativo es el papel de los fosfolípidos de la superficie plaquetaria activados en la activación de la cascada de coagulación.

La vía intrínseca de la cascada de la coagulación requiere los factores de coagulación VIII, IX, X, XI y XII. También se requieren las proteínas precalcireína (PK) y cininógeno de alto peso molecular (HK o HMWK), así como también iones de calcio y fosfolípidos secretados por las plaquetas. Cada uno de estos constituyentes de la ruta intrínseca conduce a la conversión del factor X en factor Xa. El inicio de la ruta intrínseca ocurre cuando la precalcireína, el cininógeno de alto peso molecular, el factor XI y el factor XII se exponen a una superficie cargada negativamente. Esto se denomina fase de contacto y puede ocurrir como resultado de la interacción con los fosfolípidos (principalmente fosfatidiletanolamina, PE) de partículas de lipoproteínas circulantes como quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDL). Ésta es la base del papel de la hiperlipidemia en la promoción de un estado protrombótico.

La activación del factor Xa en la vía intrínseca requiere el ensamblaje del complejo tenasa (Ca^{2+} y factores VIIIa, IXa y X) en la superficie de las plaquetas activadas. Una de las respuestas de las plaquetas a la activación es la presentación de fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) en sus superficies. La exposición de estos fosfolípidos permite la formación del complejo tenasa y la posterior activación del factor Xa.

La vía extrínseca de la cascada de coagulación se inicia en el sitio de la lesión en respuesta a la liberación del factor tisular (factor III) y, por tanto, también se conoce como vía del factor tisular. El factor tisular es un cofactor en la activación del factor X catalizada por el factor VIIa. El factor VIIa, un residuo gla que contiene serina proteasa, escinde el factor X en factor Xa de una manera idéntica a la del factor IXa de la ruta intrínseca. La activación del factor VII se produce mediante la acción de la trombina o el factor Xa. La capacidad del factor Xa para activar el factor VII crea un vínculo entre las vías intrínseca y extrínseca.

El punto común en ambas vías es la activación del factor X al factor Xa. El factor Xa activa la protrombina (factor II) a trombina (factor IIa). La trombina, a su vez, convierte el fibrinógeno en fibrina. La activación de la trombina ocurre en la superficie de las plaquetas activadas y requiere la formación de un complejo de protrombinasa. Este complejo está compuesto por los fosfolípidos plaquetarios, fosfatidilinositol y fosfatidilserina, Ca^{2+} , factores Va y Xa y protrombina. El factor V es un cofactor en la formación del complejo protrombinasa, similar al papel del factor VIII en la formación del complejo tenasa. Al igual que la activación del factor VIII, el factor V se activa a factor Va por medio de cantidades mínimas y se inactiva al aumentar los niveles de trombina. El factor Va se une a receptores específicos en las superficies de las plaquetas activadas y forma un complejo con la protrombina y el factor Xa.

La protrombina es una proteína monocatenaria de 72 kDa que contiene diez residuos gla en su región N-terminal. Dentro del complejo de protrombinasa, el factor Xa escinde la protrombina en 2 sitios. Esta escisión genera una molécula de trombina activa de 2 cadenas que contiene una cadena A y una B que se mantienen juntas mediante un solo enlace disulfuro. La trombina se une a una clase de receptores acoplados a proteína G (GPCR) llamados receptores activados por proteasa (PAR), específicamente PAR-1, -3 y -4. Los PAR utilizan un mecanismo único para convertir el resultado de la escisión proteolítica extracelular en un evento de señalización intracelular. Los PAR llevan su propio ligando, que permanece inactivo hasta que la escisión de la proteasa, como la trombina, "desenmascara" el ligando. Después de la escisión de la trombina, el ligando desenmascarado sigue siendo parte del PAR intacto, pero ahora es capaz de interactuar con el dominio de unión al ligando del PAR, lo que da como resultado la activación de numerosas cascadas de señalización.

Descripción general de las pruebas de coagulación

Los ensayos de tiempo de hemorragia se utilizan para evaluar las respuestas vasculares y plaquetarias asociadas con la hemostasia. El tiempo de sangrado es un ensayo que se realiza con frecuencia en pacientes preoperatorios para garantizar que haya una respuesta adecuada a la lesión de los vasos antes de la cirugía. Como se analiza en el presente documento, las respuestas rápidas a la lesión vascular (que se producen en segundos) son la constricción de los vasos y la adhesión de las plaquetas a la pared del vaso. El método Ivy para determinar el tiempo de sangrado implica el uso de un manguito de presión arterial (esfigmomanómetro) que se coloca en el antebrazo y se infla a 40 mm Hg. Luego se hace una incisión superficial en el antebrazo y se registra el tiempo que tarda en detenerse el sangrado. Con el método Ivy, el sangrado debe detenerse en 1 a 9 minutos. Cualquier tiempo de sangrado superior a 15 minutos sería indicativo de un defecto en las respuestas iniciales de los vasos y las

plaquetas a la lesión vascular. Un ensayo de tiempo de sangrado menos invasivo implica el uso de una lanceta o una aguja especial, con la que se hace un pinchazo de 3-4 mm de profundidad en la yema del dedo o en el lóbulo de la oreja. Este ensayo de tiempo de sangrado se conoce como método de Duke, y en este ensayo el sangrado debe cesar en 1-3 minutos. El tiempo de sangrado se ve afectado (prolongado) por cualquier defecto en la función plaquetaria, por trastornos vasculares y en la enfermedad de von Willebrand, pero no se ve afectado por otros factores de coagulación. Los trastornos que se asocian comúnmente con un aumento del tiempo de hemorragia incluyen trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada (CID), síndrome de Bernard-Soulier y trombastenia de Glanzmann. Los tiempos de sangrado anormales también se encuentran en pacientes con síndrome de Cushing, enfermedad hepática grave, leucemia e insuficiencia de la médula ósea.

Los defectos asociados con factores de las vías de coagulación sanguínea también se pueden evaluar con ensayos específicos. El tiempo de protrombina (TP) es un ensayo diseñado para detectar defectos en fibrinógeno, protrombina y factores II, V, VII y X y, por lo tanto, mide las actividades de la vía extrínseca de la coagulación. Cuando alguno de estos factores es deficiente, el TP se prolonga. Un PT normal es de 11,0 a 12,5 segundos. Un TP mayor de 20 segundos es indicativo de déficit de coagulación. El TP se mide comúnmente usando plasma después de que se extraen las células sanguíneas. Una muestra de sangre se recolecta típicamente en un tubo que contiene citrato para unir cualquier calcio y así inhibir la coagulación, y luego las células se separan por centrifugación. El exceso de calcio se agrega a una alícuota del plasma para iniciar la coagulación. La medida más común de TP es dividir el tiempo de coagulación de la sangre de un paciente por el valor medio de TP normal, y esta relación se eleva posteriormente a una potencia correspondiente al ISI (índice de sensibilidad internacional) del reactivo que se está utilizando. El valor resultante se denomina índice internacional normalizado (INR). Los valores normales oscilan entre 0,8 y 1,2 INR. El PT se utiliza para determinar la dosis correcta de la clase cumarina de fármacos anticoagulantes (por ejemplo, Coumadin®), para detectar la presencia de enfermedad o daño hepático y para evaluar el estado de la vitamina K.

El tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) se usa para analizar defectos en la vía intrínseca de la coagulación. El ensayo aPTT incluye la adición de activadores que acortan el tiempo normal de coagulación y normalmente se prescribe en pacientes con hemorragia o coagulación inexplicables. El ensayo evaluará la función del fibrinógeno, la protrombina y los factores V, VIII, IX, X, XI y XII. Un defecto en cualquiera de estos factores resultará en un aPTT prolongado. Un aPTT normal es de 30 a 40 segundos. El aPTT es un ensayo estándar que se utiliza para evaluar la eficacia de la terapia anticoagulante con heparina. El aPTT se mide comúnmente usando plasma después de que se extraen las células sanguíneas. Una muestra de sangre se recolecta típicamente en un tubo que contiene citrato para unir cualquier calcio y así inhibir la coagulación, y luego las células se separan por centrifugación. El exceso de calcio se agrega a una alícuota del plasma para revertir la anticoagulación con citrato. Los aPTT prolongados se asocian con trastornos hemorrágicos adquiridos o congénitos asociados con deficiencia de factor de coagulación, deficiencia de vitamina K, enfermedad hepática, CID, enfermedad de von Willebrand, leucemia, hemofilia y durante la administración de heparina.

El tiempo de coagulación activado (ACT) es una prueba común de coagulación de sangre total en el lugar de atención que se utiliza para controlar la terapia con heparina en dosis altas o el tratamiento con bivalirudina. La dosis de heparina o bivalirudina requerida en estos entornos está más allá del rango que se puede medir con el aPTT. Normalmente, la sangre total se recoge en un tubo o cartucho que contiene un activador de coagulación (por ejemplo, celita, caolín o partículas de vidrio) y una barra de agitación magnética, y luego se mide el tiempo que tarda la sangre en coagularse. El valor de referencia para el ACT suele oscilar entre 70 y 180 segundos. El rango deseable de anticoagulación depende de la indicación y el método de prueba utilizado. Por ejemplo, durante la cirugía de derivación cardiopulmonar, el rango de ACT deseado con heparina puede exceder de 400 a 500 segundos. Por el contrario, en pacientes que se someten a intervenciones coronarias percutáneas, se recomienda un ACT objetivo de 200 segundos cuando se administra heparina junto con un antagonista de la glucoproteína IIb/IIIa, mientras que un ACT entre 250 y 350 segundos se dirige en ausencia de tal terapia complementaria.

Sistema electroquímico para la determinación de tiempos de coagulación diagnósticos

Se han utilizado ensayos cromogénicos para medir la actividad enzimática de factores de coagulación específicos mediante el desarrollo de sustratos de péptidos artificiales, escindibles, específicos para factores particulares. Cabe señalar que los ensayos basados en el tiempo de coagulación, como aPTT, PT y ACT, son esencialmente medidas funcionales de la formación e inhibición de trombina en presencia de anticoagulantes, como warfarina y heparina o factores de coagulación defectuosos. Por tanto, se puede establecer una analogía entre los ensayos basados en la medición de la formación de fibrina y los ensayos basados directamente en la medición de la actividad de la trombina mediante el uso de sustratos peptídicos apropiados, como en los ensayos cromogénicos.

La detección electroquímica implica el uso de un electrodo de trabajo (por ejemplo, un electrodo amperométrico) y un electrodo de referencia (por ejemplo, un contraelectrodo de referencia), mediante el cual se aplica un potencial constante al electrodo de trabajo que conduce a una reacción de oxidación-reducción (redox) que se puede cuantificar como una corriente eléctrica registrable. Los sensores electroquímicos han encontrado un uso generalizado en el desarrollo de dispositivos de autocomprobación y en el punto de atención (POC), como lo demuestra el desarrollo de las tiras reactivas de glucosa, ya que son fáciles de conectar con instrumentos

electrónicos y reducen los costos de los dispositivos. Dispositivos, como el sistema i-STAT® (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Núm. 7,977,106), han empleado sustratos electrogénicos que dan como resultado la formación de un producto de escisión detectable electroquímicamente que es proporcional a la actividad de la trombina. Luego, estos dispositivos se configuran para devolver un tiempo de coagulación basado en una medida de la actividad de la trombina para permitir comparaciones con la coagulación estándar. Por consiguiente, en algunas modalidades, el sistema de detección electroquímica se denomina "electrogénico" porque las especies detectables electroquímicamente se generan para permitir la determinación de una medición de velocidad o un punto final de prueba, por ejemplo, un tiempo de coagulación de diagnóstico. Esto es similar a las pruebas de punto final cromogénicas o fluorogénicas en las que un cambio en las propiedades de absorción o emisión de luz de una muestra indica la medición de la velocidad o el punto final, por ejemplo, un tiempo de coagulación de diagnóstico.

La Figura 1 ilustra el principio de un sistema de detección electroquímica 10 (por ejemplo, un sistema de detección electroquímica amperométrica) según algunas modalidades de la presente invención para la determinación de los tiempos de coagulación de diagnóstico. Sin embargo, debe entenderse que aunque se describen aquí modalidades específicas para ensayos de tiempo de coagulación de diagnóstico (por ejemplo, ensayos de PT, aPTT y ACT), las estructuras de sensor microambiental descritas en la presente descripción también pueden ser útiles para detectar varios analitos de interés potencial. Más específicamente, el sistema de detección electroquímica de la presente invención no se limita al ensayo de enzimas de coagulación. Por ejemplo, cualquier ensayo en el que una enzima escinde una molécula de sustrato para producir un resto electroactivo puede utilizar la presente metodología. Como debe entenderse, se pueden diseñar ensayos para una variedad de otras enzimas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, glucosa oxidasa, lactato oxidasa y otras oxidoreductasas, enzimas basadas en deshidrogenasa y fosfatasa alcalina y otras fosfatasa, y serina proteasas sin apartándose del alcance de la presente invención. Por ejemplo, algunos aspectos de la presente invención pueden incluir un ensayo de fosfatasa en el que está presente ferroceno con un resto fosfato en una capa de sensor microambiental. La enzima fosfatasa presente en una muestra puede penetrar el sensor microambiental y escindir los grupos fosfato permitiendo que las moléculas de ferroceno liberadas se oxiden en el electrodo. Por consiguiente, la corriente medida puede ser función de la velocidad de la reacción de escisión y, por tanto, proporcional a la actividad fosfatasa en la muestra.

En un análisis ejemplar, se puede introducir una muestra de fluidos 15, por ejemplo, sangre total, en una cámara de retención de muestras 20 de un cartucho 25 de la presente invención. Posteriormente, la muestra de fluidos 15 puede introducirse en una región de análisis 30 del cartucho, por ejemplo, una región de sensor o una o más ubicaciones dentro de uno o más conductos del cartucho que incluye uno o más sensores para la detección de coagulación y opcionalmente para la detección de un analito objetivo (por ejemplo, actividad de trombina durante un tiempo de protrombina y troponina I). La región de análisis 30 incluye uno o más sensores microambientales 35 que comprenden uno o más electrodos o transductores 37, uno o más reactivos 40 y uno o más sustratos 45 en cualquier número de diferentes disposiciones posibles. La forma y orientación de los electrodos, reactivos y sustrato pueden variar ampliamente dependiendo de las modalidades que se describen en detalle a continuación.

El uno o más reactivos 40 pueden incluir un material para inducir la coagulación a través de la ruta intrínseca o extrínseca. Los materiales adecuados para inducir la vía extrínseca (por ejemplo, análisis de PT) pueden incluir uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en factor tisular no recombinante, factor tisular recombinante, un lípido sintético o natural, un fosfolípido sintético o natural, una combinación de lípidos sintéticos o naturales y una combinación de fosfolípidos sintéticos o naturales. Puede incluirse una variedad de otros componentes dentro del uno o más reactivos 40 para contribuir a las características de estabilización y deposición/disolución del uno o más reactivos 40. Por ejemplo, el uno o más reactivos 40 pueden comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas transportadoras tales como albúmina de suero bovino (BSA), agentes estabilizantes, agentes antimicrobianos, una sal de calcio, una sal de potasio, una sal soluble en agua, polímero, un azúcar, gelatina, agarosa, un polisacárido, un sacárido, sacarosa, polietilenglicol, fosfato de sodio, glicina, un aminoácido, antioxidantes, un detergente, una sal tampón y un tampón como 4-(2-hidroxietil) Tampón de ácido -1-piperazinetanosulfónico (HEPES).

El uno o más reactivos 40 pueden incluir material adecuado para inducir la ruta intrínseca. Los materiales adecuados para inducir la ruta intrínseca (por ejemplo, el análisis aPTT o ACT) pueden incluir uno o más componentes seleccionados de ácido elágico, celita, caolín, tierra de diatomeas, arcilla, dióxido de silicio, lípidos sintéticos o naturales y fosfolípidos sintéticos o naturales. Puede incluirse una variedad de otros componentes dentro de uno o más reactivos 40 para contribuir a las características de estabilización y/o deposición/disolución de uno o más reactivos 40. Por ejemplo, el uno o más reactivos 40 pueden comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en dextrano, dextrina, tergitol, tampones, una proteína portadora, un aminoácido, estabilizadores, antimicrobianos, antioxidantes, un detergente, un sacárido, un polisacárido, sacarosa, polietilenglicol, derivados de polietilenglicol, glicina, gelatina, tampón como tampón de ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico (HEPES), ramnosa, trehalosa y azúcares.

El uno o más sustratos 45 usados en el ensayo electrogénico pueden tener un enlace amida que imita el enlace amida escindido por trombina en el fibrinógeno. Específicamente, el uno o más sustratos 45 pueden comprender uno o más péptidos escindibles con trombina tales como los seleccionados del grupo que consiste en HD-Phe-Pip-Arg, HD-Chg-Abu-Arg, CBZ-Gly-Pro-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, HD-Phe-Pro-Arg, ciclohexilglicina-Ala-Arg, Tos-Gly-Pro-Arg,

Bz-Phe-Val-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Hyp-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Val-Pro-Arg, Ac-Gly-Pro-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Gly-Pro-Arg, Ac-Gly-Hyp-Arg y HD-Chg-Abu-Arg. La trombina escinde típicamente el enlace amida en el extremo carboxi del residuo del residuo de arginina porque el enlace se parece estructuralmente al enlace amida escindido por trombina en el fibrinógeno. El producto de la reacción trombina-sustrato incluye compuestos electroquímicamente inertes tales como Tos-Gly-Pro-Arg, HD-Phe-Pip-Arg y/o Bz-Phe-Val-Arg- y compuestos electroactivos o fracciones detectables, preferentemente seleccionadas del grupo formado por p-aminofenol, una quinona, un ferroceno, derivado de ferrocianuro, otras especies organometálicas, p-nitroanilina, o-dianisidina, 4,4'-bensidina, 4-metoxi-2-naftilamina, N-fenil-p -fenilendiamina, N-[p-metoxifenil]- p-fenilendiamina y derivados de fenazina. Se eligió la secuencia de tripéptidos porque hace que el sustrato sea virtualmente no reactivo con proteasas sanguíneas distintas de la trombina y la reactividad de la trombina con el enlace amida de arginina en la molécula es muy similar a su reactividad con el enlace amida objetivo en el fibrinógeno. Cuando el uno o más sustratos 45 están presentes en una muestra de sangre o fluido derivado de la sangre o muestra biológica, la trombina activa generada a partir de la activación de la(s) vía(s) de coagulación a través de uno o más reactivos 40 convierte simultáneamente el uno o más sustratos 45 y fibrinógeno a sus productos de escote. El producto de reacción de la especie electroquímica es detectado por uno o más transductores 37, por ejemplo, un transductor electroquímico.

Estructuras de sensores microambientales

Como se analiza en el presente documento, las estructuras de los sensores microambientales comprenden uno o más reactivos y uno o más sustratos en cualquiera de una serie de disposiciones diferentes, de manera que la introducción de la muestra de fluido, por ejemplo, sangre total, al uno o más reactivos y al o más sustratos se localizan en uno o más sensores. En particular, las estructuras del sensor microambiental se configuran para separar físicamente uno o más reactivos y/o productos de reacción entre sí para evitar la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de sensor cruzado una vez que uno o más reactivos han quedado expuestos a la muestra de fluido.

Como se muestra en la Figura 2, los ensayos de coagulación POC tradicionales han empleado el reactivo/sustrato 60 impreso como una sustancia seca en una pared 65 (por ejemplo, una cubierta) de un conducto que se opone a una superficie de un sensor 70. La muestra de fluido 75 necesitaría mezclarse con la sustancia seca, por ejemplo, mediante oscilación de la bomba, para disolver el reactivo/sustrato 60 en la muestra de fluido 75 y generar una mezcla 80, que puede tener la forma de un gradiente desde la parte superior del conducto hasta el sensor 70. Sin embargo, dicha configuración tiene al menos tres problemas o desventajas. En primer lugar, solo una pequeña parte del producto electroactivo generado a través de la mezcla 80 alcanzará la superficie del sensor 70 y se oxidará, por lo que no se usará la mayor parte del producto electroactivo. Como un resultado, el uso del reactivo/sustrato 60 no es eficaz. Además, la muestra de fluido 75 está adulterada con el reactivo/sustrato 60, lo que puede ser indeseable debido a su posible impacto con otros sensores que pueden entrar en contacto con la muestra de fluido 75 (por ejemplo, interferencia de sensor cruzado). En segundo lugar, para lograr una precisión analítica adecuada, el reactivo/sustrato 60 debe dispersarse uniformemente en la muestra de fluido 75 lo más rápidamente posible. Esto puede ser un desafío para los dispositivos en el punto de atención donde el espacio y la eficiencia de la mezcla pueden ser limitados. Es especialmente cierto cuando el reactivo/sustrato 60 está en forma sólida y en un espacio muy pequeño con respecto al volumen de la muestra de fluido 75. En tercer lugar, existe la posibilidad de que el sustrato interfiera con el reactivo y/o los factores de coagulación. Por ejemplo, mezclar el sustrato junto con el reactivo en la muestra 75 antes de que se ha iniciado la cascada de coagulación puede manifestar tal interferencia.

En contraste con los ensayos de coagulación POC tradicionales, algunas modalidades de la presente invención, como se muestra en la Figura 3, presente el reactivo 85 asociado con una capa de sustrato 90 formada de manera localizada cerca de la superficie del sensor 95. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3, el reactivo 85 y el sustrato 90 pueden imprimirse como una sustancia seca directamente sobre una superficie del sensor 95. La muestra de fluido 100 puede reaccionar con el reactivo 85 y el sustrato 90 sin mezclar (por ejemplo, mediante difusión pasiva) (aunque puede ser conveniente cierto grado de mezcla, por ejemplo, oscilación del fluido), de manera localizada creando un gradiente desde el sensor 95 hasta la parte superior del conducto. Ventajosamente, esta disposición del reactivo y el sustrato presentados directamente sobre una superficie del sensor permite que la mayoría del producto electroactivo se oxide y, por tanto, se utilice en la superficie del sensor. Esta disposición del sensor también es beneficiosa debido al menor volumen de muestra requerido en el entorno inmediato del sensor y, por lo tanto, produce una zona de ensayo de reactivo a muestra más concentrada.

No obstante, algunos de los problemas (por ejemplo, la mitigación de la interferencia de sensor cruzado y la interferencia de sustrato) evidentes dentro de los ensayos de coagulación POC tradicionales pueden no resolverse con la disposición mostrada en la Figura 3. Por ejemplo, cualquier reacción que ocurra en las inmediaciones del sensor podría interferir potencialmente con el reactivo y/o los factores de coagulación y/o posiblemente con otra reacción que ocurra en un sensor adyacente (es decir, un sensor dentro del mismo conducto y dentro de aproximadamente 3 mm del sensor mostrado en la Figura 3). Como tal, este tipo de disposición de sensor no se caracterizaría como un sensor microambiental. Sin embargo, estos problemas restantes pueden superarse mediante sistemas de microfluidos avanzados (por ejemplo, al dividir una sola muestra en dos o más partes y controlar el movimiento de esas partes en dos o más conductos), como se explica a continuación en detalle, y/o separación

apropiada de los sensores entre sí. Por ejemplo, cuando los sensores adyacentes están cubiertos por un mismo fluido de muestra inactivo, para evitar la interferencia de sensores cruzados por debajo de un umbral dado, por ejemplo, por debajo del 1 %, puede ser adecuado usar modelos basados en un coeficiente de difusión conocido para el interferente y el tiempo total de ensayo para determinar una distancia de separación adecuada entre sensores. Cuando la muestra no esté en reposo, otros modelos de mezcla dinámica pueden ser adecuados para seleccionar una distancia de separación del sensor adecuada.

Se ha demostrado inesperadamente que la inmovilización del sustrato 90 en el sensor 95 soluciona muchos o todos los problemas mencionados anteriormente. La inmovilización puede realizarse mediante reticulación (por ejemplo, luz ultravioleta, glutaraldehído, etc.), atrapamiento, unión covalente, etc. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de tal disposición microambiental donde el sustrato 90 se inmoviliza en la superficie del sensor 95 mediante el uso de una capa de polímero 105. La inmovilización se puede realizar al revestir el sensor 95 con una capa de polímero 105 que incluye el sustrato 90 de manera que el sustrato 90 se inmoviliza a través de la capa de polímero 105 en la superficie del sensor 95. En otras palabras, el sustrato 90 se forma como una capa de polímero-sustrato poroso inmovilizado sobre la superficie del sensor 95 para crear un recipiente para mantener la reacción de la muestra de fluido 100, el reactivo 85 y el sustrato 90 de manera localizada sobre una superficie del sensor 95. La muestra de fluido 100 puede reaccionar con el reactivo 85 y el sustrato 90 sin mezclar (aunque puede ser conveniente cierto grado de mezcla, por ejemplo, oscilación del fluido) de una manera localizada dentro de los límites de (o por encima, y luego difundida en) la capa de polímero 105 formada en el sensor.

Ventajosamente, esta disposición del sustrato inmovilizado presentado directamente sobre una superficie del sensor permite que la mayoría del producto electroactivo se oxide y, por tanto, se utilice en la superficie del sensor. Aún de manera más ventajosa, esta disposición del sustrato inmovilizado proporciona un microambiente capaz de mantener el sustrato y el producto electroactivo en la vecindad inmediata del sensor, y así mitigar la interferencia de sensor cruzado con un sensor adyacente durante el uso normal. Otros beneficios potenciales de inmovilizar el sustrato en el sensor incluyen la mitigación de la interferencia del sustrato mediante la separación del sustrato del reactivo, la reducción del uso de material, la simplificación del hardware y el diseño del sensor y la mejora de la robustez del producto.

Las Figuras 5 y 6 proporcionan evidencia empírica de que la inmovilización del sustrato puede aumentar la corriente de respuesta y mejorar la precisión de la detección del analito de manera significativa. Específicamente, la Figura 5 muestra curvas de respuesta aPTT donde el eje x es tiempo/segundos y el eje y es corriente/pA. En este ejemplo, el sustrato se imprimió en un sensor, uno inmovilizado con PVA (curvas de respuesta aPTT 106) y el otro no inmovilizado (curvas de respuesta aPTT 107). Se añadió un reactivo aPTT a la sangre total. Después de mezclar durante aproximadamente 30 segundos, la muestra se extrajo del tubo de muestra y se llenó en cartuchos para la prueba. La corriente eléctrica del sensor de sustrato inmovilizado (curvas de respuesta de aPTT 106) era superior a 30 nA, mientras que la del sensor de sustrato no inmovilizado (curvas de respuesta de aPTT 107) era solo de aproximadamente 3 nA. Su coeficiente de variación de tMed (tiempo en el que la corriente alcanza su punto medio) fue de aproximadamente 1 % y 2 %, respectivamente. Estos datos indican que la presencia del sustrato inmovilizado directamente sobre el sensor permitió la reacción redox inmediata y concentrada del grupo saliente del sustrato de coagulación. Esto, a su vez, produjo tiempos de coagulación más rápidos y una respuesta del sensor más predecible.

Otro ejemplo se muestra en la Figura 6 donde el eje x es tiempo/segundos y el eje y es corriente/pA. Las curvas de respuesta de PT 108 representan la respuesta de un sensor de sustrato no inmovilizado a un nivel de fluido de control de i-STAT® PT 2, mientras que las curvas de respuesta de PT 109 representan la respuesta de un sensor de sustrato inmovilizado al mismo nivel de fluido de control de i-STAT® PT 2. Con respecto al sensor de sustrato no inmovilizado, tanto el sustrato como el reactivo se imprimieron juntos en el electrodo y se mezclaron con la muestra durante la prueba. Con respecto al sensor de sustrato inmovilizado, el sustrato se inmovilizó con PVA en el electrodo y el reactivo se imprimió en la parte superior del sustrato inmovilizado, y no hubo mezcla durante la prueba. El uso del sensor inmovilizado con un control de plasma produjo una mejora significativa en el rendimiento de manera que la corriente eléctrica aumentó de aproximadamente 4 nA a aproximadamente 9 nA y el coeficiente de variación disminuyó de aproximadamente 10 % a aproximadamente 3 %. Estos datos muestran una mejora significativa en el campo de las pruebas de coagulación, de manera que el rendimiento de un dispositivo de punto de atención ahora podría acercarse al rendimiento de un instrumento de laboratorio central (2-3 % CV).

Como se muestra en las Figuras 7A, 7B y 7C, los sensores microambientales de la presente invención pueden tener el reactivo 110 y la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 colocados en varias disposiciones diferentes con los componentes que interactúan entre sí sin mezclarse, aunque puede ser conveniente cierto grado de oscilación. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 7A, el reactivo 110 puede colocarse dentro o encapsularse por la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 (por ejemplo, el reactivo está integrado dentro de la capa de sustrato-polímero inmovilizado). Como se muestra en la Figura 7B, el reactivo 110 puede revestirse sobre la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 (por ejemplo, el reactivo es una capa separada dispensada encima de la capa de sustrato-polímero inmovilizado). Como se muestra en la Figura 7C, el reactivo 110 puede colocarse sustancialmente adyacente a la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 y al menos un transductor del sensor 120 (por ejemplo, el reactivo se coloca dentro del conducto de manera que el reactivo se apoya en o dentro de una distancia interactiva de la capa

de sustrato-polímero y/o el al menos un transductor para que sigan funcionando en conjunto). Como se usa en la presente descripción, una distancia interactiva significa menos que la dimensión más larga del sensor con la restricción de que el reactivo esté posicionado dentro de un mismo plano o en una misma pared/superficie de un conducto que el sensor. Otras variantes también resultarán evidentes para los expertos en la técnica, por ejemplo, el reactivo 110 puede formarse como una combinación del mostrado en las Figuras 7B y 7C, o como se muestra en la Figura 7C con solo una parte del reactivo 110 mostrado en la Figura 7B.

Como se muestra en la Figura 8, un cartucho de análisis 125 que comprende una cámara de entrada 130 se configura para recibir una muestra de fluido 135 y un conducto 140 conectado de manera fluida a la cámara de entrada 130 y configurado para recibir la muestra de fluido 135 desde la cámara de entrada 130. El conducto 140 puede comprender una serie de sensores microambientales, por ejemplo, un primer sensor microambiental 145 y un segundo sensor microambiental 150. El primer sensor microambiental 145 puede comprender un primer reactivo 155 y un primer sustrato 160 (por ejemplo, un sustrato inmovilizado dentro de una capa de polímero) configurado para detectar un primer tiempo de coagulación de diagnóstico. Por ejemplo, el primer sensor microambiental 145 puede ser un sensor de PT que comprende un primer reactivo 155 que incluye uno o más componentes, como se describe en la presente descripción, específicos para desencadenar la vía de coagulación extrínseca y una primera capa de sustrato 160 que comprende un péptido escindible con trombina con un resto detectable como se describe en la presente descripción. El segundo sensor microambiental 150 puede comprender un segundo reactivo 165 y un segundo sustrato 170 (por ejemplo, un sustrato inmovilizado dentro de una capa de polímero) configurado para detectar un segundo tiempo de coagulación de diagnóstico. Por ejemplo, el segundo sensor microambiental 150 puede ser un sensor de aPTT que comprende un segundo reactivo 165 que incluye uno o más componentes, como se describe en la presente descripción, específicos para desencadenar la vía de coagulación intrínseca y una segunda capa de sustrato 170 que comprende un péptido escindible con trombina con un resto detectable (por ejemplo, un reactivo y un sustrato inmovilizados dentro de una capa de polímero). Como debe entenderse, aunque el cartucho de análisis 125 descrito anteriormente se analiza con respecto a un sensor de PT y un sensor de aPTT, se contemplan varias combinaciones y números de sensores, por ejemplo, un sensor de PT, un sensor de aPTT y un sensor de ACT por la presente invención. Por ejemplo, el primer sensor microambiental 145 puede ser un sensor de PT, y el segundo sensor microambiental 150 puede ser un sensor de aPTT o un sensor de ACT. En otro aspecto, el primer sensor microambiental 145 es un sensor de aPTT, y el segundo sensor microambiental 150 es un sensor de PT o un sensor de ACT. En otro aspecto, el primer sensor microambiental 145 es un sensor de ACT, y el segundo sensor microambiental 150 puede ser un sensor de aPTT o un sensor de PT. En aún otras modalidades, uno de los sensores microambientales es un sensor de PT, un sensor de aPTT o un sensor de ACT, y otro de los sensores es un sensor para detectar un analito, relacionado o no relacionado con la coagulación.

Ventajosamente, las estructuras de sensor microambiental de la presente invención se configuran para separar físicamente uno o más reactivos y sustratos para evitar la activación cruzada y/o interferencia de las vías en cascada una vez que uno o más reactivos y sustratos se han expuesto a la muestra de fluido. Incluso de manera más ventajosa, la incorporación del sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo en los ensayos de coagulación proporciona la capacidad de realizar los ensayos de coagulación sin requerir o mientras se minimiza la mezcla, por ejemplo, oscilación del fluido de muestra en un conducto, porque se produce la activación de la coagulación en un área localizada y concentrada sobre el sensor con la posterior propagación de la reacción de prueba en la capa inmovilizada, lo que finalmente da como resultado la oxidación en el transductor.

Capa de polímero-sustrato inmovilizado

Con el fin de separar físicamente uno o más ensayos entre sí para evitar la activación cruzada y promover la localización de señales electroquímicas u ópticas sobre los transductores, un sustrato inmovilizado y/o una capa de reactivo-polímero puede modelarse selectivamente en los sensores (por ejemplo, revestido sobre el transductor o electrodo de trabajo/detector óptico). Como se muestra en la Figura 9, la capa de polímero inmovilizado 175 puede formarse mediante revestimiento por rotación o mediante microdispensación. Más específicamente, se puede utilizar una matriz polimérica acuosa que comprende uno o más reactivos y sustratos y un polímero, tal como un polímero fotoformable (por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA)), para inmovilizar uno o más sustratos sobre o cerca del transductor 180. También se pueden incluir en la matriz acuosa aditivos que incluyen, pero no se limitan a, una proteína tal como BSA, un azúcar o alcohol de azúcar, tal como sacarosa, sorbitol o manitol. Para los expertos en la técnica de la química de polímeros, la adición de algunas sustancias a la(s) capa(s) de polímero da como resultado una serie de alteraciones que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hinchamiento, coeficientes de difusión, estabilidad de la molécula, porosidad, transporte, cinética de la reacción y similares. Estas alteraciones pueden usarse para modular la respuesta del sensor microambiental según sea necesario.

De acuerdo con la invención, uno o más sustratos pueden comprender el uno o más péptidos escindibles con trombina seleccionados del grupo que consiste en HD-Phe-Pip-Arg, HD-Chg-Abu-Arg, CBZ-Gly-Pro-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, HD-Phe-Pro-Arg, ciclohexilglicina-Ala-Arg, Tos-Gly-Pro-Arg, Bz-Phe-Val-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Hyp-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Val-Pro-Arg, Ac-Gly-Pro-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Gly-Pro-Arg, Ac-Gly-Hyp-Arg y HD-Chg-Abu-Arg. Opcionalmente, los dos o más de estos sustratos pueden mezclarse para obtener las actividades de trombina y las propiedades de difusión deseadas en el sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo.

De acuerdo con la invención, el polímero que contiene el sustrato puede comprender uno o más materiales, opcionalmente en forma de matriz. El material para el polímero, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en PVA, polivinilalcohol de estirilpiridinio (SBQ-PVA), agarosa, poli(acrilamida), polimetilmetacrilato, N-metilpirrolidona, polivinilpirrolidona, poliimida, un látex formador de película, sefarsa™, poliuretanos, acrilatos, metacrilatos, polietilenglicoles, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), hidroxipropilcelulosa, celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructanos, derivados de fructanos, ácido carboxílico, poliglicólico™ celulosa, ácido poliláctico y poli (ácido láctico co-glicólico). En algunas modalidades en las que el material para el polímero comprende celulosas (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa), aditivos tales como un plastificante (por ejemplo, citrato de trietilo, citrato de acetiltriethyl, propilenglicol, glicerina, trimetilolpropano, polietilenglicoles, ácidos grasos y derivados de los mismos) y/o reticulantes (por ejemplo, ácidos carboxílicos, glioxal y cualquier resina que sea reactiva con los grupos hidroxilo disponibles de la celulosa) también pueden incluirse en la matriz acuosa. La reticulación de los materiales también puede afectar el hinchamiento, la permeabilidad, la difusión, la cinética de la reacción, etc. de la capa de polímero para modular la respuesta del sensor según se requiera.

Además de la selección del material para el polímero, otro beneficio de inmovilizar el sustrato y/o reactivo incluye el uso de la matriz inmovilizadora como neutralizador de interferencia localizada. Por ejemplo, la selección del material para el polímero puede depender del tipo de prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado. Por ejemplo, se ha encontrado ventajosa e inesperadamente que la inclusión de SBQ-PVA reticulado o no reticulado en la capa de polímero inmovilizado imparte una propiedad de neutralización de la heparina o insensibilidad a la heparina en la capa de polímero inmovilizado. En consecuencia, en las modalidades en las que la prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado es una prueba sensible a la heparina (por ejemplo, se sabe que la prueba de PT es moderadamente sensible a los inhibidores de la coagulación tal como la heparina), el polímero puede seleccionarse para ser un polímero neutralizante de heparina tal como SBQ-PVA reticulado o no reticulado. En algunas modalidades, el PVA puede ser una sal de estilbizonio fotoactivada.

Las Figuras 10 y 11 ejemplifican este concepto de la siguiente manera. Se imprimió directamente un sensor de coagulación con un sustrato de coagulación inmovilizado SBQ-PVA grande (Figura 10) o pequeño (Figura 11). Posteriormente, se imprimió un activador de coagulación PT en la parte superior de la matriz de sustrato inmovilizado. Luego, estos sensores se probaron con los fluidos apropiados para evaluar el tiempo de coagulación. Como ocurre con los resultados de las Figuras 5 y 6, un beneficio de imprimir más de la matriz de sustrato inmovilizado es que la cantidad aumentada de matriz de sustrato inmovilizado condujo a un aumento de pA. Además, cuando se añade heparina a la muestra de sangre total, los tiempos de coagulación no son tan prolongados como se espera (Figuras 10 y 11 (curvas de respuesta 181) (pico de heparina) deberían ser más similares a las curvas de respuesta 182 (anormalmente fluidos de control prolongados) tiempos de coagulación, pero en realidad se comportan más como sangre total sin heparina (curvas de respuesta 183). Estos resultados reflejan el efecto neutralizador de heparina de un polímero tal como SBQ-PVA. Además, la aplicación de una mayor cantidad de la matriz inmovilizadora da como resultado un mayor efecto neutralizante (por ejemplo, compare el sesgo entre sangre total y sangre total con heparina en las Figuras 10 y 11). La Figura 10 representa una impresión de matriz grande y muestra que hay una extensión del 14 % cuando se agrega heparina a 1 UI/mL, mientras que en la Figura 11 hay una extensión del 55 % cuando se deposita una cantidad de impresión más pequeña de la matriz neutralizante. En ambas Figuras 10 y 11, la sangre enriquecida con heparina se comporta más como sangre total inalterada que como un fluido de control anormalmente largo, lo que refleja que hay un efecto neutralizador de interferencia/heparina. Estos datos muestran que el aumento del área de la impresión de PVA reduce el efecto de interferencia de la heparina en el ensayo de PT.

La Figura 12 proporciona evidencia empírica adicional de que puede usarse un SBQ-PVA reticulado para impartir una propiedad neutralizante de heparina o insensibilidad a la heparina a un ensayo de PT de sustrato inmovilizado. Específicamente, la Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de TP realizado en una muestra de sangre total (curva de respuesta 184) y una muestra de sangre total (curva de respuesta 185) enriquecida con 0,4 (curva de respuesta 184) o 1,2 UI/mL (curva de respuesta 185) de heparina sin uso de heparinasa (un reactivo incluido convencionalmente en una prueba de PT para neutralizar la heparina), pero con la adición de cantidades crecientes de SBQ-PVA al mismo tamaño de impresión. Los datos muestran que el aumento de la concentración de la capa de SBQ-PVA da como resultado la disminución de las extensiones del tiempo de coagulación de la sangre total en presencia de heparina. Esto muestra que la respuesta del sensor microambiental de PT se puede modular para reducir la interferencia de la heparina sin el uso de la costosa heparinasa.

Sin pretender imponer ninguna teoría, parece que una carga positiva impartida por el SBQ-PVA reticulado o no reticulado puede impartir la propiedad neutralizante de la heparina o la insensibilidad de la heparina al ensayo de PT del sustrato inmovilizado. Más particularmente, el grupo colgante SBQ es un catión, el PVA es un anión y la heparina es un anión, por lo que se plantea la hipótesis de que la repulsión en el área localizada del electrodo a través del SBQ cargado positivamente excluye la heparina del microambiente del sensor inmovilizado o el SBQ cargado positivamente interactúa con la heparina cargada negativamente e incapacita la capacidad de la heparina para actuar sobre los factores de coagulación. Esta teoría se evidencia además por el hecho de que un polímero aniónico tal como hidroxipropilcelulosa puede usarse para pruebas de tiempo de coagulación de diagnóstico que monitorean

la terapia con heparina (por ejemplo, aPTT y ACT) sin impartir una propiedad neutralizante de heparina o insensibilidad a la heparina al ensayo.

El polímero puede ser un polímero neutralizante sin heparina que luego podría tratarse o modificarse posteriormente para convertirse en neutralizante de heparina. Por ejemplo, en las modalidades en las que la prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado es sensible a la heparina, el polímero puede seleccionarse para incluir al menos un componente neutralizante que no sea de heparina, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en hidroxipropilcelulosa, y Elvace™, carboximetilcelulosa, ácido poliláctico, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructosa, fructanos, derivados de fructanos y ácido poliglicólico. A continuación, el uno o más componentes del polímero neutralizante sin heparina pueden tratarse o modificarse para generar una capa neutralizante de heparina. En algunas modalidades, el tratamiento o modificación puede incluir cambiar la carga de uno o más componentes del polímero neutralizante sin heparina, añadir heparinasa a la matriz del polímero y/o configurar la capa de polímero para que se una preferentemente a grupos sulfato en la heparina.

El polímero puede estar formado por un polímero neutralizante sin heparina. Por ejemplo, en las modalidades en las que la prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado es para monitorear la terapia con heparina (por ejemplo, la prueba aPTT y ACT), la capa de polímero puede incluir al menos un componente neutralizante sin heparina seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en hidroxipropilcelulosa, Elvace™, carboximetilcelulosa, ácido poliláctico, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructanos, derivados de fructanos y ácido poliglicólico.

En el revestimiento por rotación, el sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo se puede modelar fotolitográficamente mediante el uso de luz ultravioleta para reticular el material mediante el uso de una máscara, seguido de la eliminación del material no reticulado de manera que el sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo se reviste selectivamente. En microdispensación (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,554,339), se puede aplicar una cantidad apropiada de cada revestimiento a un área circunscrita opcionalmente por un componente estructural adicional configurado como límite de contención. Alternativamente, pueden usarse tratamientos de superficies, por ejemplo, exposición a plasmas de gas, para controlar la energía de la superficie y, por lo tanto, la propagación del material microdispensado.

El uno o más reactivos y sustratos 187 pueden inmovilizarse dentro de la capa de polímero 175 como se muestra en la Figura 13A. La matriz acuosa de sustrato-polímero-reactivo que comprende uno o más sustratos, un polímero tal como un polímero fotoformable (por ejemplo, PVA) y uno o más reactivos pueden utilizarse para inmovilizar el uno o más sustratos y el uno o más reactivos en o cerca el transductor 180. La capa de polímero inmovilizado 175 puede formarse mediante revestimiento por rotación o microdispensado de la matriz acuosa de sustrato-polímero-reactivo. En modalidades preferidas, el uno o más reactivos o sustratos 187 para una prueba de aPTT o ACT pueden inmovilizarse dentro de la capa de polímero 175 y el volumen seco de la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado 175 que comprende el uno o más reactivos o sustratos 187 estar en el intervalo de aproximadamente 0,55 - 2,0 nL, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1,0 - 1,5 nL. En algunas modalidades, la capa de polímero inmovilizado 175 es sustancialmente plana y tiene un grosor en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 100 µm. La capa de polímero inmovilizado 175 está sustancialmente abovedada y tiene un espesor máximo de la bóveda en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 100 µm. Aunque los reactivos se muestran en la Figura 13A localizados heterogéneamente en la región central de la capa de polímero 17, el(los) reactivo(s) puede(n) dispersarse homogéneamente por toda la capa de sustrato-polímero.

El uno o más reactivos o sustratos 187 pueden formarse como una capa separada sobre y/o adyacente a la capa de polímero inmovilizado 175 como se muestra en las Figuras 13B y 13C. Además, el uno o más reactivos o sustratos pueden localizarse/inmovilizarse juntos o en ubicaciones separadas. El uno o más reactivos o sustratos 187 pueden revestirse por rotación o imprimirse sobre y/o adyacentes a la capa de polímero inmovilizado 175 (por ejemplo, la capa de PVA) para localizar señales electroquímicas u ópticas sobre o cerca del transductor 180. El uno o más reactivos o sustratos 187 para una prueba de PT pueden formarse por separado de la capa de polímero inmovilizado 175 y el volumen seco de la capa de polímero inmovilizado 175 puede estar en el intervalo de 1,5 - 2,2 nL, preferentemente en el intervalo de 1,60 - 2,00 nL. La capa de polímero inmovilizado 175 es sustancialmente plana y tiene un grosor en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 100 µm. La capa de polímero inmovilizado 175 puede ser sustancialmente abovedada y tiene un grosor máximo de la bóveda en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 100 µm.

Diseño de sensores y chips

Una matriz de sensores microfabricados comprende al menos un transductor (por ejemplo, un electrodo de trabajo o un detector óptico). Por ejemplo, la matriz de sensores microfabricados puede comprender un par de sensores o transductores microambientales que comprenden un primer sensor o transductor microambiental (por ejemplo, un sensor de PT) y, opcionalmente, un segundo sensor o transductor microambiental (por ejemplo, un sensor de aPTT).

Los sensores o transductores microambientales pueden fabricarse como estructuras adyacentes, respectivamente, en un chip de silicio.

La matriz de sensores microfabricados puede comprender además, además del primer sensor o transductor microambiental y, opcionalmente, el segundo sensor o transductor microambiental, uno o más sensores de química sanguínea. Por ejemplo, la matriz de sensores puede comprender además uno o más de los sensores configurados para medir uno o más de sodio, potasio, calcio, cloruro, dióxido de carbono, glucosa, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, pH, presión parcial CO₂, presión parcial de O₂, lactato, magnesio u otro analito.

Los transductores pueden formarse como electrodos con superficies doradas revestidas con una capa de poliimida fotodefinida. Por ejemplo, la microfabricación a nivel de oblea de una modalidad preferida del conjunto de sensores puede lograrse como se muestra en la Figura 14. Puede usarse un sustrato plano 190 no conductor como base para la matriz de sensores. Se puede depositar una capa conductora 195 sobre el sustrato 190 por medios convencionales, por ejemplo, impresión conductora o técnica de microfabricación conocida por los expertos en la técnica para formar al menos un transistor. La capa conductora 195 puede comprender un metal noble tal como oro, platino, plata, paladio, iridio o aleaciones de los mismos, aunque también pueden usarse otros metales no reactivos tal como titanio y tungsteno o aleaciones de los mismos, como también pueden usarse muchos electrodos de grafito no metálicos, polímero conductor u otros materiales.

Por ejemplo, un electrodo base puede comprender una matriz cuadrada de discos de oro de 5-10 µm, por ejemplo, discos de oro de 7 µm, en centros de 15 µm. La matriz puede cubrir una región, por ejemplo, una región circular, de aproximadamente 300 a 900 µm de diámetro, opcionalmente 400-800 µm o aproximadamente 600 µm de diámetro, y puede formarse mediante el foto-modelado de una capa delgada de poliimida o fotorresistente de espesor hasta 1,5 µm sobre un sustrato hecho de una serie de capas que comprenden Si, SiO₂, TiW y/o Au, o combinaciones de los mismos. El electrodo base tiene un área de trabajo de aproximadamente 130 000 a 300 000 µm cuadrados, el volumen de muestra directamente sobre el sensor puede ser de aproximadamente 0,1-0,3 µL y el volumen de la muestra sobre el chip puede ser de 1-3 µL. El conducto en una región del electrodo base tiene una relación de volumen a área del sensor de menos de aproximadamente 6 µl a aproximadamente 1 mm cuadrado, preferentemente menos de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 2 mm cuadrados, con mayor preferencia menos de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 500 µm cuadrados. En consecuencia, la matriz de microelectrodos proporciona una alta eficiencia de recolección de un resto detectable que es una especie electroactiva con una contribución reducida de cualquier corriente de fondo electroquímica asociada con la capacitancia del metal expuesto. En particular, las aberturas en la capa aislante de poliimida o fotorresistente definen una región de electrodos de oro en la que las especies electroactivas, por ejemplo, p-aminofenol, pueden oxidarse tal como en una reacción de dos electrones por molécula.

Pueden usarse técnicas de microfabricación (por ejemplo, fotolitografía y deposición de plasma) para la construcción de estructuras de sensores de múltiples capas en espacios confinados. Por ejemplo, los métodos para la microfabricación de inmunosensores electroquímicos sobre sustratos de silicio se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5,200,051 e incluyen, por ejemplo, métodos de dispensación, métodos para unir sustratos y reactivos a superficies que incluyen capas fotoformadas y métodos para realizar ensayos electroquímicos.

La matriz de sensores microfabricados también puede comprender una conexión eléctrica 195 y una capa de polímero inmovilizado 205 (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B y 7C), que se deposita sobre al menos una porción de la capa conductora 195 y/o el sustrato no conductor 190. En la presente invención, la capa de polímero inmovilizado 205 puede ser una capa de polímero poroso que comprende un péptido escindible con trombina con un resto detectable que se configura para responder a la presencia de trombina activa al producir un cambio que puede medirse.

Como se muestra en las Figuras 15 y 16, la matriz de sensores microfabricados puede comprender un chip de silicio 210 que incluye sensores o transductores amperométricos microambientales 215 y 220 ubicados en diferentes planos verticales (a) y (b) del chip de silicio 210. El sensor 215 puede conectarse mediante el cableado 225 a una primera clavija amperométrica 230 (por ejemplo, conector eléctrico temporal) y el sensor 220 puede conectarse mediante el cableado 235 a una segunda clavija amperométrica 240 (por ejemplo, conector eléctrico temporal). El sensor 215 puede configurarse como un sensor de aPTT y el sensor 220 puede configurarse como un sensor de PT, ambos formados en el chip de silicio único 210 y colocados dentro de uno o más conductos del cartucho de prueba en el punto de atención. Como se ilustra en la Figura 15, el sensor 215 puede construirse con un diseño de retícula objetivo que comprende preferentemente una pluralidad de anillos concéntricos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más anillos concéntricos) en un área superior del chip de silicio 210 y el sensor 220 puede construirse con un diseño de retícula objetivo que comprende preferentemente una pluralidad de anillos concéntricos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más anillos concéntricos) en un área inferior del chip de silicio 210. Específicamente, el diseño y la disposición de los sensores 215 y 220 en el chip 210 se seleccionan con base en las características de impresión y rendimiento de cada uno de los sensores 215 y 220. Además, aunque los sensores 215 y 220 en el ejemplo de la Figura 15 son sensores amperométricos, pueden usarse otros procesos electroquímicos o procesos ópticos que usan otros sensores electroquímicos u ópticos, por ejemplo, guías de ondas ópticas y chips de cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD). Por ejemplo, puede usarse un sensor potenciométrico para detectar especies de iones tal como Na⁺ o K⁺.

Como se describe en la presente descripción, los sensores o transductores amperométricos 215 y 220 pueden formarse como electrodos con superficies doradas que están expuestas (por ejemplo, sin cubierta de poliimida o fotorresistente) al ambiente interior del conducto y configurados para entrar en contacto directamente con una muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 225 y 235 pueden formarse con superficies doradas que están revestidas con una capa fotorresistente o de poliimida fotodefinida de manera que los cableados 225 y 235 estén aislados de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 225 y 235 pueden formarse para comprender estructuras de anillo de contención 245 y 250 configuradas para contener la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado. Por ejemplo, la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B y 7C) puede depositarse sobre al menos una porción de los sensores 215 y/o 220 dentro de las estructuras de anillo de contención 245 y/o 250. Los cableados 225 y 235 terminan en la primera clavija amperométrica 230 y la segunda clavija amperométrica 240 respectivamente, que se usan para hacer contacto con un conector en un analizador o lector de cartucho (por ejemplo, un lector de cartucho i-STAT® como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 4,954,087).

El analizador aplica un potencial a través de la primera clavija amperométrica 230 y la segunda clavija amperométrica 240 entre cada uno de los sensores amperométricos 215 y 220 y un electrodo de referencia (descrito en detalle a continuación con respecto a la Figura 17), y mide los cambios de corriente generados por sustrato como una señal electroquímica. La señal electroquímica es proporcional a la concentración del producto en la muestra biológica. Los sensores amperométricos 215 y 220 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,4 V frente al electrodo de referencia y, en otra modalidad, los sensores amperométricos 215 y 220 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,1 V frente al electrodo de referencia. La señal generada por el producto de reacción enzimática a aproximadamente +0,1 V se distingue de la señal generada por el sustrato sin reaccionar a aproximadamente +0,4 V.

En las modalidades de la invención que usan el péptido escindible con trombina Tos-Gly-Pro-Arg-, HD-Phe-Pip-Arg o Bz-Phe-Val-Arg unido a una N-fenil-p-fenilendiamina o N- [p-metoxifenil -] - p-fenilendiamina detectable, los sustratos intactos se detectan a una tensión de aproximadamente +0,4 V. Los productos de reacción electroquímica N-fenil-p-fenilendiamina o N- [p-metoxifenil -] - p-fenilendiamina se detectan a una tensión de aproximadamente +0,1 V. Por lo tanto, en estas modalidades, el analizador aplica un potencial a los sensores amperométricos 215 y 220 con la generación de una señal electroquímica que es proporcional a la concentración del sustrato en la muestra biológica. Además, el analizador aplica un potencial a los sensores amperométricos 215 y 220 con la generación de una señal electroquímica que es proporcional a la concentración del producto en la muestra biológica. Después de la hidrólisis del sustrato por trombina, se forma un producto que reacciona en los sensores amperométricos 215 y 220 con la generación de una señal distinguible de la señal generada por el sustrato.

Se debe señalar que las tensiones exactas usadas para detectar amperométricamente el sustrato y el producto variarán en dependencia de la estructura química del sustrato y del producto. Es importante que la diferencia en las tensiones usadas para detectar el sustrato y el producto sea lo suficientemente grande como para evitar interferencias entre las lecturas. Con algunos sustratos, la tensión requerida para detectar electroquímicamente el sustrato es tan alto que está más allá de la medición práctica en una solución acuosa tamponada. En estos casos, solo es necesario que el producto sea detectable amperométricamente.

El chip de silicio 210 mostrado en la Figura 15 puede incluir además sensores conductométricos de múltiples conductos 255 y 260 (por ejemplo, sensores de hematocrito). Los sensores conductométricos 255 y 260 se configuran para determinar la llegada y/o salida de la muestra biológica en los sensores amperométricos 215 y 220. Más específicamente, los sensores conductométricos 255 y 260 se encuentran perpendiculares a una longitud del conducto o conducto de sensor, y puede usarse una resistencia eléctrica entre pares de electrodos para cada sensor para monitorear una posición relativa de un frente de fluido de la muestra biológica. En los extremos, una lectura de circuito abierto indica que la muestra biológica ha sido expulsada de los sensores amperométricos 215 y 220 y una lectura de circuito cerrado indica que los sensores amperométricos 215 y 220 están cubiertos con la muestra biológica.

Como se muestra en la Figura 15, el sensor conductométrico 255 puede comprender al menos dos electrodos 265 y 270 (es decir, primer par de electrodos) colocados aguas arriba de un punto medio del sensor amperométrico 215. Los electrodos 265 y 270 pueden conectarse a través de los cableados 275 y 280 a una clavija baja conductométrica 285 y una fuente de AC o clavija alta conductométrica 290, respectivamente (por ejemplo, conectores eléctricos temporales). Los cableados 275 y 280 pueden formarse con una superficie dorada que está revestida con una capa fotorresistente o de poliimida fotodefinida de manera que los alambres 275 y 280 estén aislados de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro de los conductos. El sensor conductométrico 260 puede comprender al menos dos electrodos 295 y 300 (es decir, un segundo par de electrodos) situados aguas abajo de un punto medio del sensor amperométrico 220. Los electrodos 295 y 300 pueden conectarse a través de los cableados 275 y 280 a una clavija baja conductométrica 285 y una fuente de AC o clavija alta conductométrica 290, respectivamente (por ejemplo, conectores eléctricos temporales). Como tal, el fluido llega al primer par de electrodos en un primer conducto de fluidos (por ejemplo, antes de llegar al sensor amperométrico 215), luego llega posteriormente al segundo par de electrodos en un segundo conducto de fluidos (por ejemplo, después de llegar al sensor amperométrico 220).

Como se muestra en la Figura 16, el chip de silicio 210 puede incluir además un tercer sensor conductimétrico 301 que comprende al menos dos electrodos 302 y 303. Los electrodos 302 y 303 pueden conectarse mediante el cableado 304 a una segunda fuente de AC o a la clavija alta conductimétrica 305 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). El uso de un tercer sensor permite dos eventos de detección de fluidos binarios, por ejemplo, ambos están APAGADO/ENCENDIDO, lo cual es fácilmente detectable con los circuitos actuales y las limitaciones del software. En el caso de dos sensores de conductividad (mostrados en la Figura 15), el circuito de corriente y el software se basan en la capacidad de detectar dos "caídas" en la resistencia de la muestra en rápida sucesión. Típicamente, la primera caída es grande, ya que pasa de un estado seco a un estado húmedo y el circuito se completa. La segunda caída de resistencia, cuando la muestra llega al segundo conducto de fluidos, es mucho más pequeña y por lo tanto más difícil de diferenciar del ruido de la señal y de los pequeños cambios en la señal. Además, la amplitud de cada cambio de resistencia varía según las propiedades de la muestra. Por consiguiente, la disposición de tener tres sensores conductimétricos permite dos trayectorias de conductividad conmutables mediante el uso del sensor conductimétrico 255 (mostrado en la Figura 15) y el sensor conductimétrico 301 (mostrado en la Figura 16).

Como se muestra en la Figura 17, la matriz de sensores microfabricados puede comprender además un chip de tierra 306 que incluye un sensor o electrodo de referencia. Los sensores 215 y 220 son sensores amperométricos, el electrodo de referencia 307 puede configurarse como un contraelectrodo para completar el circuito. En una modalidad preferida, el electrodo de referencia 307 puede comprender plata metálica (Ag) y su sal de plata (AgCl) depositada sobre un sustrato sólido (es decir, un electrodo de referencia Ag/AgCl). El electrodo de referencia 307 puede conectarse mediante un cableado 308 a una clavija de referencia 309 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). La matriz de sensores microfabricados puede diseñarse de manera que el chip de tierra 306 se coloque aguas arriba del chip semiconductor 210 como se describe con más detalle con respecto a las Figs. 15 y 16. La matriz de sensores puede comprender además uno o más chips de sensores adicionales (no mostrados) configurados para detectar varios analitos de interés potencial, tales como troponina I, troponina T, CKMB, procalcitonina, bHCG, HCG, NTproBNP, proBNP, BNP, mioglobina, hormona paratiroidea, dímero D, NGAL, galectina-3 y/o PSA, entre otros analitos.

Como se muestra en la Figura 18, la matriz de sensores microfabricados puede comprender un chip de silicio 310 que incluye sensores o transductores 315 y 320 amperométricos microambientales ubicados en un mismo plano vertical (a) del chip de silicio 310. El sensor 315 puede conectarse mediante el cableado 325 a una primera clavija amperométrica 330 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal) y el sensor 320 puede conectarse mediante el cableado 335 a una segunda clavija amperométrica 340 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). El sensor 315 puede configurarse como un sensor de aPTT y el sensor 320 puede configurarse como un sensor de PT, ambos formados en un solo chip 310 y colocados dentro del conducto del cartucho de prueba del punto de atención. Como se ilustra en la Figura 18, el sensor 315 puede construirse con un diseño en forma de rosquilla en una posición aguas arriba de la del sensor 320 construido con un diseño de retícula objetivo que comprende una pluralidad de anillos concéntricos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más anillos concéntricos). Específicamente, el diseño y la disposición de los sensores 315 y 320 en el chip 310 se seleccionan con base en las características de impresión y rendimiento de cada uno de los sensores 315 y 320. Además, aunque los sensores 315 y 320 en el ejemplo de la Figura 18 son sensores amperométricos, pueden usarse otros procesos electroquímicos o procesos ópticos que usan otros sensores electroquímicos u ópticos. Por ejemplo, puede usarse un sensor potenciométrico para detectar especies de iones tal como Na^+ o K^+ .

Como se describe en la presente descripción, los sensores o transductores 315 y 320 pueden formarse como electrodos con superficies doradas que están expuestas (por ejemplo, sin revestimiento de poliimida o fotorresistente) al entorno interior del conducto y configurados para entrar en contacto directamente con una muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 325 y 335 pueden formarse con superficies doradas que están revestidas con una capa de poliimida fotodefinida de manera que los cableados 325 y 335 estén aislados de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 325 y 335 pueden formarse para comprender estructuras de anillo de contención 345 y 350 configuradas para contener la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado. Por ejemplo, la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B y 7C) puede depositarse sobre al menos una porción de los sensores 315 y/o 320 dentro de las estructuras de anillo de contención 345 y/o 350. Los cableados 325 y 335 terminan en la primera clavija amperométrica 330 y la segunda clavija amperométrica 340 respectivamente, que se usan para hacer contacto con un conector en un analizador o lector de cartucho (por ejemplo, un lector de cartucho i-STAT® como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 4,954,087).

El chip de silicio 310 incluye además un electrodo de referencia integrado 355 cuando los sensores 315 y 320 son sensores amperométricos, el electrodo de referencia 355 se configura como un contraelectrodo para completar el circuito. El electrodo de referencia 355 puede comprender plata metálica (Ag) y su sal de plata (AgCl) depositada sobre un sustrato sólido (es decir, un electrodo de referencia Ag/AgCl). El electrodo de referencia se puede conectar mediante el cableado 360 a una tierra de AC y a la clavija de referencia 365 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). El cableado 360 puede formarse con una superficie dorada que está revestida con una capa fotorresistente o de poliimida fotodefinida de manera que el cableado 360 esté aislado de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto. El electrodo de referencia 355 está diseñado en un patrón de tablero de

ajedrez como se ilustra en la Figura 18 para mejorar la humectabilidad de una superficie del electrodo de referencia 355. Específicamente, se ha encontrado inesperadamente que la humectabilidad del electrodo de referencia 355 puede mejorarse mediante el patrón de tablero de ajedrez debido a que el AgCl es relativamente hidrófobo y puede promover la formación de una burbuja de aire sobre la superficie del electrodo de referencia 355 cuando un parche sólido de AgCl se usa, lo que da como resultado un circuito defectuoso.

Como se describió en detalle anteriormente con respecto al chip de silicio 310 y como se muestra en la Figura 19, el analizador aplica un potencial a través de la primera clavija amperométrica 330 y la segunda clavija amperométrica 340 entre cada uno de los sensores amperométricos 315 y 320 y el electrodo de referencia 355, y mide los cambios de corriente generados por el sustrato escindido como una señal electroquímica. La señal electroquímica es proporcional a la concentración del producto en la muestra biológica. Los sensores amperométricos 315 y 320 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,4 V frente al electrodo de referencia 355 y, en otra modalidad, los sensores amperométricos 315 y 320 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,1 V frente al electrodo de referencia 355. La señal generada por el producto de reacción enzimática a aproximadamente + 0,1 V se distingue de la señal generada por el sustrato sin reaccionar a aproximadamente +0,4 V.

Con referencia de nuevo a la Figura 18, el chip de silicio 310 puede incluir además sensores conductimétricos 370 y 375 (que también pueden funcionar como sensores de hematocrito). Los sensores conductimétricos 370 y 375 pueden dividirse para formar dos pares de sensores con uno en cada extremo del chip 310. Los sensores conductimétricos 370 y 375 se configuran para determinar la llegada y/o salida de la muestra biológica en los sensores amperométricos 315 y 320, respectivamente. Más específicamente, los sensores conductimétricos 370 y 375 se encuentran en un arco que es perpendicular a una longitud del conducto o conducto de sensor, y puede usarse una resistencia eléctrica entre pares de electrodos para cada sensor para monitorear una posición relativa de un frente de fluido de la muestra biológica. En los extremos, una lectura de circuito abierto indica que la muestra biológica ha sido expulsada de los sensores amperométricos 315 y 320 y una lectura de circuito cerrado indica que los sensores amperométricos 315 y 320 están cubiertos con la muestra biológica.

Como se muestra en la Figura 20, el sensor conductimétrico 370 puede comprender al menos dos electrodos 380 y 385 (es decir, primer par de electrodos) colocados a una distancia predeterminada (d1) entre sí. El sensor conductimétrico 370 puede colocarse en el chip de silicio 310 con relación a un punto medio (v) del sensor amperométrico 315 (por ejemplo, aguas arriba, aguas abajo o en línea con el punto medio (v)). El electrodo 380 se puede conectar mediante el cableado 390 a una clavija de fuente de AC 395 (por ejemplo, conector eléctrico temporal). El electrodo 385 se puede conectar mediante el cableado 400, el electrodo de referencia 355 y el cableado 360 a la tierra de AC y la clavija de referencia 365. Los cableados 390 y 400 pueden formarse con una superficie dorada que está revestida con una capa fotorresistente o de poliimida fotodefinida de manera que los cableados 390 y 400 estén aislados de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto.

El sensor conductimétrico 375 puede comprender al menos dos electrodos 405 y 410 (es decir, un segundo par de electrodos) colocados a una distancia predeterminada (d2) entre sí. En algunas modalidades, el sensor conductimétrico 375 puede colocarse en el chip de silicio 310 con relación a un punto medio (x) del sensor amperométrico 320 (por ejemplo, aguas arriba, aguas abajo o en línea con el punto medio (x)). El electrodo 405 se puede conectar mediante el cableado 415, el electrodo de referencia 355 y el cableado 360 a la tierra de AC y la clavija de referencia 365. El electrodo 410 se puede conectar mediante el cableado 420 y el cableado 390 a la clavija de la fuente de AC 395. Los cableados 415 y 420 pueden formarse con una superficie dorada que está revestida con una capa fotorresistente o de poliimida fotodefinida de manera que los cableados 415 y 420 estén aislados de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto.

Los sensores conductimétricos 370 y 375 se configuran para detectar la llegada de la muestra biológica dentro del conducto a los sensores amperométricos 315 y 320, respectivamente. Como se muestra en la Figura 21, la llegada de la muestra biológica a los sensores amperométricos 315 y 320 puede detectarse con base en la determinación de una primera caída de resistencia 425 cuando la muestra biológica alcanza el sensor de conductividad 370 y una segunda caída de resistencia 430 cuando la muestra biológica alcanza el sensor de conductividad 375. La determinación de un aumento o pico (no mostrado) en la resistencia en uno o ambos de los sensores conductimétricos 370 y 375 puede usarse para detectar la presencia de una burbuja de aire dentro del conducto que está colocado sobre uno o ambos sensores amperométricos 315 y 320.

Un perfil de resistencia para los sensores conductimétricos 370 y 375 debería proporcionar preferentemente dos caídas de resistencia bien definidas de aproximadamente la misma amplitud. En algunos diseños de chips, como se muestra en la Figura 22A, los sensores conductimétricos 435 y 440 pueden configurarse como barras separadas en los extremos opuestos del chip cerca de los respectivos sensores amperométricos 445 y 450. Sin embargo, se encuentra que el perfil de resistencia 455 para tal diseño incluye a menudo una etapa adicional 460, que es atribuible a que la muestra se detiene temporalmente en el electrodo de referencia 465 debido a la naturaleza hidrófoba del electrodo de referencia 465. Como debe entenderse, esto podría dificultar descifrar la segunda caída de resistencia como humedecimiento del electrodo de referencia 465 o como la muestra que llega al segundo sensor conductimétrico 440. Además, el tiempo entre las dos etapas es bastante corto, lo que dificulta la sincronización, y la

caída de resistencia de la segunda llegada es mucho menor en comparación con la primera caída, lo que dificulta la detección.

En consecuencia, como se muestra en la Figura 22B, el diseño del chip usa los sensores conductimétricos 370 y 375, cada uno de los cuales está dividido para comprender al menos dos electrodos 380, 385 y 405, 410 separados a distancias predeterminadas (d1) y (d2), respectivamente. Como se ilustra en el perfil de resistencia 470, las caídas de resistencia dominante 425 y 430 ocurren en los dos pares de sensores conductimétricos 370 y 375. Por lo tanto, se reduce el impacto de la caída de resistencia adicional 460 (mostrada en la Figura 22A) observada a partir del humedecimiento del electrodo de referencia 355. Además, los sensores conductimétricos 370 y 375 se colocan en la parte delantera y trasera del chip para aumentar el tiempo entre las caídas de resistencia 425 y 430 para diferenciar mejor las caídas de resistencia 425 y 430. Además, la separación o distancia predeterminada (d1) proporcionada entre los electrodos 380 y 385 es un valor "n" mayor que el de la separación o distancia predeterminada (d2) proporcionada entre los electrodos 405 y 410 de manera que una amplitud de la segunda caída de resistencia 430 aumenta sobre una caída de resistencia 475 (mostrada en la Figura 22A) del diseño de chip alternativo. Por ejemplo, (d1) se puede construir dos veces más grande que la de (d2) para lograr un aumento de aproximadamente 1000 ohmios en la amplitud de la segunda caída de resistencia. El aumento de (d1) sobre el de (d2) aumenta efectivamente la relación de caídas de resistencia para el diseño de chip mostrado en la Figura 22B por encima de la relación de caídas de resistencia para el diseño de chip mostrado en la Figura 22A. Ventajosamente, este aumento en las caídas de resistencia permite una mejor detección de la llegada de la muestra biológica a los sensores conductimétricos 370 y 375 durante una posición de motor o bomba encendido/en marcha 480.

Se describen procesos que pueden incluir mover continuamente la muestra biológica hacia adelante y hacia atrás sobre el chip a una velocidad controlada. El control del tiempo durante el cual los sensores conductimétricos 370 y 375 permanecen como circuitos abiertos y cerrados controla la posición en la que la muestra biológica cambia de dirección. Por ejemplo, una bomba neumática dentro del analizador puede configurarse para hacer oscilar la muestra biológica en el conducto con el borde posterior de la muestra biológica posicionado en la región del sensor conductimétrico 370 para disolver el sustrato en esa porción de la muestra cerca del borde posterior. La oscilación puede tener una frecuencia en el intervalo de 0,2 a 10 hercios durante un período en el intervalo de 1 a 100 segundos. En un método preferido, la oscilación puede tener una frecuencia en el intervalo de aproximadamente 1,5 hercios durante un período de aproximadamente 20 segundos. En otro método preferido, la oscilación puede tener una frecuencia de aproximadamente 0,3 hercios y los sensores amperométricos 315 y 320 (como se muestra en la Figura 20) pueden configurarse para generar una señal en cada oscilación. Si están presentes eritrocitos en la muestra biológica, la oscilación puede tener una frecuencia adecuada para evitar la sedimentación de eritrocitos en los sensores amperométricos 315 y 320.

Los sensores amperométricos 315 y 320 determinan la concentración de producto cada vez que la muestra biológica se hace oscilar más allá de los sensores amperométricos 315 y 320. Por ejemplo, el analizador puede almacenar una primera señal de sensor amperométrico para cada uno de los sensores amperométricos 315 y 320 y las señales subsiguientes de los sensores amperométricos 315 y 320 pueden almacenarse y compararse con la primera y otras señales almacenadas con el fin de determinar una tasa máxima de cambio en las señales del sensor amperométrico. Estos puntos de datos pueden analizarse luego para determinar una fracción fija de una tasa máxima de cambio de las señales del sensor amperométrico. Por tanto, estos puntos de datos pueden usarse para determinar un parámetro de coagulación de interés para cada uno de los sensores amperométricos 315 y 320.

Alternativamente, los sensores o transductores pueden formarse como un detector óptico, por ejemplo, un chip de cámara CCD y una guía de ondas ópticas. El detector óptico puede ser un detector de emisión de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia del resto detectable o un detector de absorbancia por el resto detectable. En tales modalidades, el resto detectable puede ser un tinte óptico, un emisor de fluorescencia, un emisor de quimioluminiscencia o un emisor de bioluminiscencia.

El sensor o los transductores pueden formarse como una tira reactiva, por ejemplo, una tira reactiva de glucosa, como se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 13/724,348. Por ejemplo, se puede incluir una tira reactiva dentro de los cartuchos descritos en la presente descripción. La muestra se puede colocar manualmente en la tira reactiva. Como es bien conocido en la técnica, los dispositivos de tiras reactivas de glucosa pueden incluir elementos de fluidos capilares pasivos para suministrar la muestra a un sensor o matriz de sensores. Como tal, los elementos, características y funcionalidad de una tira reactiva de glucosa podrían adaptarse a la invención.

Sistemas y procesos para el análisis de muestras

Como se muestra en la Figura 23, el sistema 500 puede comprender un dispositivo sensor o cartucho desechable autónomo 505 y un dispositivo o instrumento lector 510 (por ejemplo, un analizador). El cartucho 505 es un dispositivo de un solo uso configurado para ser desechable después de un solo uso. Una muestra de fluido (por ejemplo, sangre total) que se va a medir se extrae en un orificio de entrada de muestra o puerto 515 en el cartucho 505, y el cartucho 505 puede insertarse en el lector 510 a través de una abertura ranurada 520. El lector 510 puede comprender un procesador configurado para realizar mediciones de concentraciones de analitos, mediciones de resistencias, identificar analitos o conjuntos de analitos que un chip se configura para medir y/o determinaciones del

tiempo de coagulación de diagnóstico dentro de la muestra de fluido, como se describe en la presente descripción en con más detalle. Las mediciones y determinaciones realizadas por el lector 510 pueden enviarse a una pantalla 525 u otro dispositivo de salida, tal como una impresora o un sistema de gestión de datos 530 a través de un puerto 535 en el lector 510 a un puerto de ordenador 540. La transmisión puede ser a través de Wifi, enlace Bluetooth, infrarrojos y similares. En modalidades en las que los sensores 545 en el cartucho 505, por ejemplo, sensores microambientales, se basan en principios electroquímicos de funcionamiento, (por ejemplo, un primer sensor y opcionalmente un segundo sensor) pueden configurarse para hacer contacto eléctrico con el lector 510 a través de un conector eléctrico 550. Por ejemplo, el conector puede ser del diseño descrito en la patente de Estados Unidos núm. 4,954,087 de propiedad conjunta. Los sensores de PT y aPTT pueden configurarse para conectarse con un conector eléctrico de un medidor de prueba dentro del lector 510 a través del conector eléctrico 550 (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,096,669 y 4,954,087). El lector 510 también puede incluir un método para la compensación automática del flujo de fluido en el cartucho 505, como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,821,399 de propiedad conjunta.

En la Figura 24, el dispositivo o cartucho de detección desechable autónomo 555 puede comprender una cubierta 560, una base 565 y una junta adhesiva de película delgada (no mostrada) que se dispone entre la base 565 y la cubierta 560. El cartucho 555 puede configurarse para su inserción en el lector 510 y, por lo tanto, el cartucho 555 puede comprender una pluralidad de conexiones mecánicas y eléctricas (no mostradas) para este propósito. Ventajosamente, una característica del cartucho 555 es que una vez que se carga una muestra de fluido o biológica dentro del cartucho 555, el análisis de la muestra de fluido o biológica puede completarse y el cartucho 555 puede desecharse sin que un operador u otras personas entren en contacto con el fluido o la muestra biológica.

Con referencia a la Figura 24, la cubierta 560 puede hacerse de un material rígido, preferentemente plástico, y ser capaz de deformarse repetidamente en las regiones de bisagra flexibles 570, 575 y 580 sin agrietarse. La cubierta 560 puede comprender una tapa 585, unida a un cuerpo principal de la cubierta 560 por la bisagra flexible 570. En funcionamiento, después de la introducción del fluido o muestra biológica en una cámara de retención de muestras 590 a través de un puerto de entrada de muestra 595, la tapa 585 puede asegurarse sobre una entrada al puerto de entrada de muestra 595, lo que evita fugas de la muestra. La tapa 585 puede mantenerse en su lugar mediante un gancho 600. La cubierta 560 puede comprender además dos miembros deformables 605 y 610 que se pueden mover con relación al cuerpo de la cubierta 560, y que se pueden unir a la cubierta 560 por las regiones de bisagra flexible 575 y 580.

El miembro deformable 610 puede configurarse para ser operado por un primer medio de bombeo de manera que se ejerza una fuerza sobre una bolsa de aire compuesta por la cavidad 615 y la junta. El funcionamiento del miembro deformable 610 desplaza el fluido dentro de los conductos del cartucho 555. El miembro deformable 605 puede configurarse para ser operado por un segundo medio de bombeo de manera que se ejerza una fuerza sobre la junta, que puede deformarse debido a las hendiduras cortadas en la misma. En algunas modalidades, la deformación de la junta puede transmitir presión a un paquete de aluminio que contiene fluido lleno de un fluido, por ejemplo, aproximadamente 130 μL de solución de análisis/lavado, un fluido de control o fluido calibrante, ubicado en la cavidad 620, rompiendo el paquete de lámina y expulsando el fluido en el conducto 625 para su uso posterior en otros conductos durante el análisis de la muestra. Como debe entenderse, si bien los formatos de ensayo de coagulación generalmente no requieren el uso de estos fluidos, los fluidos generalmente pueden requerirse en un solo dispositivo que combina las pruebas de coagulación con otras pruebas, por ejemplo, un fluido de lavado en inmunoensayos para analitos tal como BNP y troponina y un fluido calibrante en pruebas químicas tal como potasio, creatinina y glucosa. Alternativamente, la deformación de la junta puede transmitir presión sobre una bolsa de aire compuesta por la cavidad 620 para desplazar el fluido dentro de los conductos del cartucho 555. Además, los segundos medios de bombeo pueden no operar sobre la cavidad 620 y, en cambio, la cavidad 620 puede configurarse como una cámara de residuos.

La acción adicional en el cartucho 555 generada por mecanismos dentro del lector 510 (descrito con respecto a la Figura 23) aplicados al cartucho 555 puede usarse para inyectar uno o más segmentos de aire en la muestra de fluido o biológica en posiciones controladas dentro de la cámara de retención de muestras 590 y el conducto 630. Los segmentos de aire pueden usarse para lavar una superficie de sensor de la matriz de sensores y el conducto circundante 630 con una cantidad mínima de fluido (por ejemplo, un ciclo de lavado limitado en el que el volumen de lavado puede ser menos de cincuenta veces el volumen del fluido) o muestra biológica y/o menos de tres ciclos independientes de tampón de lavado limpio (por ejemplo, tres etapas de lavado independientes con tampón de lavado nuevo), como deben entender los expertos en la técnica de los procedimientos de inmunoensayo. Por ejemplo, la cubierta 560 puede comprender además un orificio cubierto por una película fina y flexible. En funcionamiento, la presión ejercida sobre la película puede expulsar uno o más segmentos de aire al interior del conducto 630 a través de un pequeño orificio en la junta. En algunas modalidades, el área de la sección transversal del conducto 630 puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mm^2 a aproximadamente 10 mm^2 .

Una superficie inferior de la cubierta 560 comprende además la cámara de retención de muestras 590, el conducto 630 y otro conducto 635 (por ejemplo, un conducto de residuos). La cámara de retención de muestras 590 y el conducto 630 pueden incluir una o más constricciones o topes capilares 640 y 642 que controlan el flujo de fluido al proporcionar resistencia al flujo de fluido o muestra biológica. Los revestimientos opcionales (no mostrados), por

ejemplo, revestimientos de reactivo seco, pueden proporcionar superficies hidrófobas en el conducto 630, que junto con los orificios de la junta controlan el flujo de fluido entre la cámara de retención de muestras 590 y el conducto 635. La cámara de retención de muestras 590 puede configurarse para conectar el puerto de entrada de muestras 595 al conducto 630 en el cartucho ensamblado 555.

Se describen múltiples chips (por ejemplo, un chip de tierra y un chip sensor), el corte 645 puede alojar uno o más chips sensores 650 que comprenden al menos un sensor 655 (por ejemplo, un sensor microambiental de PT, aPTT o ACT), o una superficie sensible, junto con un sensor o sensores conductimétricos opcionales 660. El corte 665 puede alojar un chip de tierra 670 que comprende un electrodo de tierra 675 si es necesario como una trayectoria de corriente de retorno para un sensor electroquímico, y también puede alojar un sensor conductimétrico opcional. Cuando hay un solo chip (por ejemplo, un chip combinado de tierra y sensor), el corte 665 y el chip de tierra 670 pueden no estar incluidos con el cartucho 555.

Puede proporcionarse un medio dosificador que comprende la cámara de retención de muestras 590 limitada por la constricción o tope capilar 640 y que tiene a lo largo de la longitud de la cámara de retención de muestras 590 un punto de entrada de aire 680 desde la bolsa que comprende la cavidad 615. La presión de aire ejercida en el punto de entrada 680 impulsa un volumen medido de la muestra más allá de la constricción o tope capilar 640. Por lo tanto, un volumen medido de muestra puede predeterminarse por un volumen de la cámara de retención de muestras 590 entre el punto de entrada de aire 680 y la constricción o tope capilar 640. Una cantidad de la muestra correspondiente a este volumen puede desplazarse al interior del conducto 630 cuando se desplaza el miembro deformable 605. Por lo tanto, esta disposición puede proporcionar un medio de medición para suministrar una cantidad medida de una muestra no medida en los diversos conductos aguas abajo del cartucho 555. La dosificación puede ser ventajosa en algunas modalidades si se requiere la cuantificación de un analito. Por lo tanto, un operador puede verse aliviado de medir con precisión el volumen de la muestra antes de la medición, lo que ahorra tiempo, esfuerzo y aumenta la precisión y reproducibilidad.

Se describe un proceso para usar un cartucho para determinar los tiempos de coagulación de diagnóstico en una muestra de sangre total. El proceso puede incluir la introducción de una muestra de fluido sin dosificar en la cámara de retención de muestras 590 del cartucho 555 a través del puerto de entrada de muestras 595 (como se muestra en la Figura 24). El tope capilar 640 evita el paso de la muestra de fluido al conducto 630 en esta etapa, y la cámara de retención de muestras 590 se llena con la muestra. La tapa 585 está cerrada para evitar la fuga de la muestra de fluido del cartucho 555. A continuación, el cartucho 555 puede insertarse en el dispositivo o aparato de lectura 510, como se muestra en la Figura 23 y se describe además en la patente de Estados Unidos núm. 5,821,399. La inserción del cartucho en el aparato de lectura 510 activa un mecanismo que perfora el paquete que contiene fluido ubicado en la cavidad 620 cuando el paquete se presiona contra una púa (no mostrada). De esta manera, el fluido puede ser expulsado a uno o más conductos (por ejemplo, el conducto 630) que llegan en secuencia a la región de sensor. A partir de entonces, el funcionamiento de un medio de bomba (por ejemplo, una bomba neumática) aplica presión a la bolsa de aire que comprende la cavidad 615, lo que fuerza aire a través de un conducto hacia la cámara de retención de muestras 590 en el punto de entrada de aire 680. El tope capilar 640 delimita una porción medida de la muestra de fluido original. La porción medida de la muestra se expulsa luego a través del tope capilar 640 mediante la presión de aire producida dentro de la bolsa de aire que comprende la cavidad 615. La muestra pasa al conducto 630 y entra en contacto con uno o más reactivos, el uno o más sustratos (por ejemplo, una capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado) y/o el uno o más sensores que comprenden uno o más transductores y opcionalmente el electrodo de referencia ubicado dentro del corte 665.

Como también se muestra en la Figura 24, para promover (i) la difusión de uno o más reactivos en la muestra de fluido, o la difusión de la muestra en la capa de polímero que contiene los reactivos (en dependencia de la modalidad específica), (ii) la activación de la cascada de coagulación por una de dos vías para generar trombina, (iii) difusión de la trombina activa a través del sustrato inmovilizado y/o capa de polímero reactivo, (iv) escisión del péptido escindible con trombina, (v) activación del resto detectable, y/o (vi) detección del resto detectable por el al menos un transductor, la muestra de fluido puede colocarse dentro del conducto 630 para entrar en contacto con uno o más reactivos y/o sustratos, la una o más capas de polímero inmovilizados y/o uno o más sensores, por ejemplo, sensores microambientales, durante un período de tiempo predeterminado.

El uso de un cartucho se ilustra en la presente descripción mediante una modalidad específica en la que se determina el tiempo de coagulación de diagnóstico para una muestra de fluido, que se introduce en la cámara de retención de muestras del cartucho seguido de la inserción del cartucho en el dispositivo de lectura del cartucho. El dispositivo de lectura del cartucho hace contacto eléctrico con los electrodos/sensores a través de almohadillas y realiza ciertas pruebas de diagnóstico. Las pruebas de diagnóstico determinan si hay fluido o muestra en los conductos mediante el uso de los electrodos de conductividad; determinar si hay cortocircuitos eléctricos en los electrodos; y asegurarse de que el sensor y los electrodos de tierra estén equilibrados térmicamente a, preferentemente, 37 °C antes del ciclo de ensayo.

Una porción medida de la muestra de fluido, preferentemente entre 4 y 200 μL , con mayor preferencia entre 4 y 20 μL , y con la máxima preferencia 7 μL , puede usarse para realizar el ensayo, mientras que un subvolumen (entre 0,1 y 3,5 μL) del mismo puede usarse para hacer entrar en contacto los electrodos/sensores. La muestra de fluido se

coloca con respecto a la región de sensor de manera que una porción de la muestra de fluido se coloca sobre el uno o más reactivos, el uno o más sustratos (por ejemplo, capas de polímero inmovilizado) y el uno o más sensores que comprenden uno o más transductores y el electrodo de tierra. Después del período de tiempo predeterminado, por ejemplo, 0-10 segundos de oscilación en la sección superior o inferior de 630 (o en cualquiera de los conductos de ensayo en las Figuras 24, 25, 26, 31, 34, 36 por ejemplo) la muestra puede moverse a un segundo conducto o área para mezclas o interacciones posteriores, o volverse estático o bloquearse dentro de los conductos o cartucho antes de la generación de la señal. Pueden usarse uno o más sensores de conductividad en el chip sensor para controlar estos procesos como se describe con respecto a las Figuras 20, 21, 22A y 22B. Durante la posterior división o desvío de los fluidos, puede haber un paso a través de elementos controlados por presión o tamaño. Estos aspectos se describen con más detalle más adelante.

Durante el tiempo de contacto entre la muestra y los sensores, (i) los reactivos modificadores tienen tiempo para difundirse en la muestra de fluido o la muestra de fluido tiene tiempo para difundirse en los reactivos modificadores (que podrían inmovilizarse en algunas modalidades) con el fin de promover la activación de la cascada de coagulación por una de dos vías para generar trombina, (ii) la trombina activa tiene tiempo para difundirse a través de una capa de sustrato, por ejemplo, un sustrato inmovilizado y/o una capa de polímero reactivo, y escindir el péptido escindible con trombina, y (iii) el resto detectable activado tiene tiempo para ser detectado por el al menos un transductor.

Función de fluidos y configuraciones de cartuchos

Se proporciona una configuración de cartucho desechable que permite la modalidad simultánea o posterior de dos pruebas separadas físicamente en una única muestra de sangre total dentro del mismo cartucho desechable. Los elementos de la configuración del cartucho desechable incluyen el uso de elementos de fluidos pasivos (por ejemplo, válvulas, resistencias y elementos de bloqueo de fluidos) además de los mecanismos activos del analizador (por ejemplo, una bomba) para dividir la muestra en conductos/regiones separados como que cada segmento de muestra se pueda mover posteriormente a un sensor específico. En la presente descripción se describen varias configuraciones separadas que permiten mantener la muestra en un solo canal, dividir la muestra en conductos de fluidos separados, controlar el movimiento del fluido en cada conducto para, por ejemplo, mezclar reactivo seco y/o sustrato en el segmento de muestra y/o posteriormente aparcar (y bloquear) la muestra sobre los sensores para su análisis.

Como se describe a continuación, un usuario puede insertar la muestra en la cámara de entrada del cartucho. Luego, el cartucho se cierra y se inserta en el analizador. La bomba de diafragma formada como una bolsa de aire en el cartucho y un émbolo mecánico en el analizador (como se describe con respecto a la Figura 24) se usan para mover la muestra por todo el cartucho.

Las Figuras 25-29 se configuran para dividir una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) y permitir el control de mezcla independiente de al menos dos segmentos de la muestra en dos conductos donde se encuentran los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. Como se describe, los sustratos pueden o no estar localizados sobre el sensor. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra permanecen dentro del conducto donde se formaron, lo que elimina de esta manera cualquier posible interferencia cruzada entre las pruebas. Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas en las que podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación).

La Figura 25 pertenece a una primera configuración de sensor de tierra para un cartucho 700 en el que un conducto 705 se divide en una unión 707 en un primer conducto 710 y un segundo conducto 715 antes o aguas arriba de un chip de tierra 720. El segundo conducto 715 puede comprender una constricción o tope capilar 725 y se configura para pasar sobre una región inferior del chip sensor 730 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El primer conducto 710 se configura para pasar sobre el chip de tierra 720 (por ejemplo, el chip de tierra con sensor de referencia como se describe con respecto a la Figura 17) y la región superior del chip sensor 730 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El cartucho 700 puede comprender además al menos un mecanismo de bloqueo de fluidos 735 (por ejemplo, una válvula de esponja de membrana, un capilar de microcanal o una válvula de micromatriz) colocado dentro del primer conducto 710, y uno o más conductos 740 (por ejemplo, ventilaciones), que van desde el primer conducto 710 y el segundo conducto 715 a la cavidad 747. En esta modalidad, la cavidad 747 se configura como una cámara de residuos (como se explica con respecto a la Figura 24). Sin embargo, los expertos en la técnica deben entender que uno o más conductos 740 pueden configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se explica con respecto a la Figura 24).

La Figura 26 muestra una primera configuración de sensor de tierra alternativa para un cartucho 750 en el que el conducto 755 se divide en una unión 760 en un primer conducto 765 y un segundo conducto 770 antes o aguas arriba de un chip de tierra 775. El segundo conducto 770 puede comprender una constricción o tope capilar 780 y se configura para pasar sobre una región inferior del chip sensor 785 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El primer conducto 765 se configura para pasar sobre el chip de tierra 775 (por ejemplo, el chip de tierra con sensor de referencia como se describe con

respecto a la Figura 17) y la región superior del chip sensor 785 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El cartucho 750 puede comprender además al menos un mecanismo de bloqueo de fluidos 790 colocado dentro del primer conducto 765. Y uno o más conductos 793 y 795 (por ejemplo, ventilaciones), que conducen desde el primer conducto 765 y el segundo conducto 770 respectivamente a un conducto de residuos 797 (como se explica con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en la Figura 27, durante el funcionamiento de los cartuchos 700 y 750, la muestra de fluido o biológica se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras a los conductos 705/755. La muestra biológica se divide en una primera porción y una segunda porción en la unión 707/760 (por ejemplo, una unión en T). La constricción o tope capilar 725/780 (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) colocada dentro del segundo conducto 715/770 hace que la muestra llene preferentemente el primer conducto 710/765 y se mueva sobre el chip de tierra 720/775 y el al menos un electrodo (por ejemplo, un electrodo de aPTT) dentro de la región superior del chip sensor 730/785. Por lo tanto, la bomba de diafragma puede mover una primera porción de la muestra hacia adelante y hacia atrás en el primer conducto 710/765 para disolver y mezclar el reactivo y/o sustrato en la muestra, mientras que una segunda porción de la muestra en el segundo conducto 715/770 tampoco deja libre el segundo conducto 715/770 ni se mueve hacia el chip sensor 730/785. Una vez que se ha logrado una mezcla adecuada en el primer conducto 710/765, la primera porción de la muestra se empuja sobre el chip sensor 730/785 hasta el mecanismo de bloqueo de fluidos 735/790 (por ejemplo, se forma una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), lo que proporciona resistencia a la presión y bloquea eficazmente la primera porción de la muestra en el primer conducto 710/765. A partir de entonces, puede comenzar el análisis en el primer conducto 710/765. A medida que la resistencia a la presión en el primer conducto 710/765 aumenta significativamente, la segunda porción restante de la muestra se fuerza a través de la constricción o tope capilar 725/780 en el segundo conducto 715/770. A continuación, se puede aplicar un proceso similar de mezcla hacia adelante y hacia atrás al segundo conducto 715/770. Una vez que el reactivo y/o el sustrato se mezclan en la segunda porción de la muestra, la segunda porción de la muestra puede colocarse sobre el chip sensor 730/785 y puede comenzar el análisis en el segundo conducto 715/770. Por ejemplo, la segunda parte se puede mover a través del segundo conducto 715/770 sobre al menos un electrodo (por ejemplo, un electrodo de PT) dentro de la región inferior del chip sensor 730/785. De acuerdo con aspectos de la presente invención, los electrodos dentro de la región superior e inferior del chip sensor 730/785 pueden formarse con o sin inmovilización del reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9.

Como se muestra en la Figura 28, durante el funcionamiento adicional de los cartuchos 700 y 750, el fluido o la muestra biológica se puede mover mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o cámara de retención de muestras hasta el chip sensor 730/785 (como se describe con respecto a la Figura 24). Además, una vez que el reactivo y/o el sustrato se mezclan en la segunda porción de la muestra, la segunda porción de la muestra se empuja sobre el chip sensor 730/785 hacia un mecanismo de bloqueo de fluidos adicional 745/798 (mostrado en las Figuras 25 y 26) (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que proporciona resistencia a la presión y bloquea eficazmente la segunda porción de la muestra en el segundo conducto 715/770. Una vez que la segunda porción de la muestra está bloqueada en su posición sobre el chip sensor 730/785, puede comenzar el análisis en el segundo conducto 715/770.

Como se muestra en la Figura 29, durante el funcionamiento adicional de los cartuchos 700 y 750, el fluido o la muestra biológica se puede mover mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o la cámara de retención de muestras hasta los conductos 705/755. Sin embargo, antes de que la muestra se mueva a la unión 707/760, la muestra se puede mover a través de una unión adicional (por ejemplo, una unión en T) (no mostrada en las Figuras 25 y 26). La unión adicional se configura para separar el primer conducto 710/765 y el segundo conducto 715/770 de un conducto de alivio (por ejemplo, un respiradero), que tiene una constricción o un tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra a través de la unión 707/760. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra pasará al conducto de alivio. La constricción adicional o tope capilar en el conducto de alivio está diseñado de manera que tiene una menor resistencia a la presión que las elementos de bloqueo de fluidos en el primer conducto 710/765 y/o el segundo conducto 715/770.

Como se muestra en la Figura 30, la mezcla dentro de los conductos se puede realizar al hacer oscilar la primera y la segunda porción de la muestra sobre los electrodos mediante el uso de los sensores conductimétricos de múltiples conductos para determinar y mantener el posicionamiento de la muestra como se describe en la presente descripción. La primera porción de la muestra biológica se mezcla primero para iniciar una reacción entre la primera porción de la muestra biológica y el reactivo y/o sustrato dentro del primer conducto antes del inicio de una reacción entre la segunda porción de la muestra biológica y el reactivo. y/o sustrato dentro del segundo conducto. Por ejemplo, una prueba de aPTT requiere convencionalmente un tiempo de prueba más largo que el de la prueba de PT y, por lo tanto, una prueba de aPTT realizada dentro del primer conducto podría iniciarse antes que la prueba de PT realizada dentro del segundo conducto, de manera que las pruebas se completen aproximadamente al mismo tiempo.

Como debe entenderse, el primer diseño del sensor de tierra para los cartuchos 700 y 750 proporciona ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (por ejemplo, PT y aPTT) dentro de dos conductos separados. Cuando la mezcla es necesaria o ventajosa, las características de los cartuchos 700 y 750 permiten un control de mezcla independiente dentro del primer y el segundo conducto sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos han quedado expuestos a la muestra biológica debido a que los sensores están físicamente separados entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto.

Las Figuras 31-35 se configuran para dividir una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) en dos segmentos en dos conductos donde se ubican los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. La principal diferencia entre las configuraciones descritas con respecto a las Figuras 31-35 a las de las Figuras 25-29 es que en las configuraciones de las Figuras 31-35, la muestra se empuja sobre los sensores y se bloquea en su lugar y los reactivos y/o sustratos ubicados en los sensores están diseñados específicamente para disolverse en la muestra por difusión pasiva o permanecer dentro de una capa de inmovilización. En el ejemplo de modalidad de análisis de coagulación, la activación de las vías en cascada y su detección se produce en una región de alta concentración en las proximidades de los sensores. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra o contenidos en la capa inmovilizada permanecen dentro del conducto donde fueron impresos, lo que elimina de esta manera cualquier posible interferencia cruzada entre las pruebas (datos no mostrados). Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas en las que podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación).

La Figura 31 pertenece a un sensor de tierra integrado y un diseño de conducto de sensor dividido para un cartucho 800 en el que un conducto 805 se divide en una unión 810 en un primer conducto 815 y un segundo conducto 820 antes o aguas arriba de un chip sensor/de tierra 825. El primer conducto 815 se configura para pasar sobre una primera región del chip sensor/de tierra 825 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende una porción del electrodo de referencia y al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de aPTT). El segundo conducto 820 comprende una constricción o tope capilar 822 y se configura para pasar sobre una segunda región del chip sensor 825 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende otra porción del electrodo de referencia y al menos otro electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de detección de analito diferente, tal como un electrodo de PT). Los electrodos de detección de analito dentro del primer conducto 815 y el segundo conducto 820 pueden formarse con o sin inmovilización del reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9.

El cartucho 800 puede comprender además al menos dos mecanismos de barrera de fluidos 830 y 835 (por ejemplo, un mecanismo de bloqueo de fluidos, un tope capilar o una constricción de fluidos) colocados dentro del primer conducto 815 y el segundo conducto 820 respectivamente, y uno o más conductos 840 y 845 (por ejemplo, respiraderos), que van desde el primer conducto 815 y el segundo conducto 820 respectivamente a una cavidad 850. En esta descripción, la cavidad 850 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Sin embargo, alternativamente, el uno o más conductos 840 y 845 pueden configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en la Figura 32, durante el funcionamiento del cartucho 800, la muestra de fluido o biológica se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o la cámara de retención de muestras hasta el conducto 805. La muestra biológica se divide en una primera porción y una segunda porción en la unión 810 (por ejemplo, una unión en T). En modalidades preferidas, la constricción o tope capilar 822 (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) colocada dentro del segundo conducto 820 hace que la muestra llene preferentemente el primer conducto 815 y se mueva sobre la primera región del chip sensor/de tierra 825. La primera porción de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 825 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 830 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que proporciona una resistencia a la presión mayor que la del segundo conducto 820, y bloquea eficazmente la primera porción de la muestra en el primer conducto 815. A continuación, puede comenzar el análisis en el primer conducto 815. A medida que la resistencia a la presión en el primer conducto 815 aumenta significativamente, la segunda porción restante de la muestra es forzada a través de la constricción o tope capilar 822 en el segundo conducto 820. De manera similar, la segunda porción de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 825 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 835 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado) y bloquea eficazmente la segunda porción de la muestra en el segundo conducto 820. A continuación, puede comenzar el análisis en el segundo conducto 820.

Como se muestra en la Figura 33, durante el funcionamiento adicional del cartucho 800, la muestra de fluido o biológica se puede mover mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o la cámara de retención de muestras hasta el conducto 805. Sin embargo, antes de que la muestra se mueva a la unión 810, la muestra se puede mover a través de una unión adicional 855 (por ejemplo, una unión en T) (mostrada en la Figura 31). La unión adicional 855 (por ejemplo, una unión en T) se configura para separar el primer conducto 810 y el segundo conducto 820 de un conducto de alivio 860 (por ejemplo, un respiradero), que tiene una constricción o un tope capilar (por

ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra a través de la unión 810. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra pasará al conducto de alivio 860. La constricción adicional o tope capilar en el conducto de alivio está diseñado de manera que tiene una menor resistencia a la presión que los mecanismos de barrera de fluidos en el primer y el segundo conducto 815 y 820.

Como deben entender los expertos en la técnica, el sensor de tierra integrado y el diseño del conducto de sensor dividido para el cartucho 800 proporciona ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (como debe entenderse, los ensayos pueden ser diferentes o iguales, por ejemplo, PT y aPTT, PT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de dos conductos separados sin el requisito de mezclar la muestra biológica con el reactivo y/o sustrato. Las características del cartucho 800 permiten realizar dos pruebas analíticas separadas dentro del primer y el segundo conducto 815 y 820 sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia entre electrodos una vez que uno o más reactivos se han expuesto a la muestra biológica debido a que los electrodos están físicamente separados entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto 815 y 820. Además, el diseño de sensor de tierra integrado para el cartucho 800 proporciona un diseño de cartucho más simple y compacto que el de los primeros diseños de sensor de tierra descritos anteriormente debido a que el diseño elimina el requisito de espacio para un sensor de tierra completamente separado y una longitud adicional de conducto necesaria para mover la muestra biológica al sensor de tierra separado.

La Figura 34 pertenece a un sensor de tierra integrado y un diseño de conducto dividido para un cartucho 870 que comprende un conducto 875 con una unión 880 (por ejemplo, una unión en T). La unión 880 se configura para separar un primer conducto de sensor 885 y un segundo conducto 890 de un conducto de alivio 895 (por ejemplo, un respiradero). El primer conducto de sensor 885 se configura para pasar sobre una primera región de un chip sensor/de tierra 900 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende una porción de un electrodo de referencia y al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo aPTT). El segundo conducto de sensor 890 se configura para pasar sobre una segunda región del chip sensor 900 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende otra porción del electrodo de referencia y al menos un electrodo de detección de analito diferente (por ejemplo, un electrodo de PT). Los electrodos de detección de analito dentro del primer conducto de sensor 885 y el segundo conducto de sensor 890 pueden formarse con o sin inmovilización del sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9.

El cartucho 870 puede comprender además al menos dos mecanismos de barrera de fluidos 905 y 910 colocados dentro del primer conducto de sensor 885 y el segundo conducto de sensor 890 respectivamente, y uno o más conductos 915 y 920 (por ejemplo, respiraderos), que parten del primer conducto de sensor 885 y el segundo conducto 890 respectivamente a una cavidad 925. La cavidad 925 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Alternativamente, el uno o más conductos 915 y 920 pueden configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en la Figura 35, durante el funcionamiento de los cartuchos 870, la muestra de fluido o biológica se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras hasta el conducto 875 y a través de la unión 880. El conducto de alivio 895 (por ejemplo, un respiradero) tiene una constricción o tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra al primer conducto de sensor 885 y al segundo conducto de sensor 890. Una primera porción de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 900 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 905 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea efectivamente la primera porción de la muestra en el primer conducto de sensor 885. A continuación, puede comenzar el análisis en el primer conducto 885. Una segunda porción de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 900 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 910 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea efectivamente la segunda porción de la muestra en el segundo conducto de sensor 890. A continuación, puede comenzar el análisis en el segundo conducto 890. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra pasará entonces al conducto de alivio 895. En modalidades preferidas, la constricción o tope capilar en el conducto de alivio está diseñado de manera que tiene una menor resistencia a la presión que los mecanismos de barrera de fluidos en el primer y el segundo conducto de sensor 885 y 890.

Como debe entenderse, el sensor de tierra integrado alternativo y el diseño de conducto dividido para el cartucho 870 proporciona ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (como debe entenderse, los ensayos pueden ser diferentes o iguales, por ejemplo, PT y aPTT, PT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de dos conductos de sensor separados sin el requisito de mezclar la muestra biológica con el reactivo y/o sustrato. Las características del cartucho 870 permiten realizar dos pruebas analíticas separadas dentro del primer y el segundo conducto de sensor 885 y 890 sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos se han expuesto a la muestra biológica porque los electrodos están físicamente separados entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto de sensor 885 y 890. Además, el diseño de sensor de tierra integrado para

el cartucho 870 proporciona un diseño de cartucho más simple y compacto que el de los primeros diseños de sensor de tierra descritos anteriormente debido a que el diseño elimina el requisito de espacio para un sensor de tierra completamente separado y una longitud adicional de conducto necesaria para mover la muestra biológica al sensor de tierra separado. Además, el volumen de muestra necesario para cubrir todo el circuito del sensor se reduce significativamente.

Las Figuras 36-38 se configuran para mantener una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) en un único conducto donde se ubican los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. La principal diferencia entre las configuraciones descritas con respecto a las Figuras 36-38 a las de las Figuras 27-29 es que en las configuraciones de las Figuras 36-38 la muestra se mantiene en un único conducto y se empuja sobre los sensores en serie y se bloquea o se mantiene en su lugar y los reactivos y/o sustratos ubicados en los sensores están diseñados específicamente para disolverse en la muestra por difusión pasiva o permanecer dentro de una capa de inmovilización. En el ejemplo de modalidad de un análisis de coagulación, la activación de las vías en cascada y su detección se produce en una región de alta concentración en las proximidades de los sensores. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra permanecen cerca de los sensores donde fueron impresos, lo que elimina de esta manera cualquier posible interferencia cruzada entre las pruebas. Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas en las que podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación).

La Figura 36 pertenece a un sensor de tierra integrado y un diseño de un único conducto para un cartucho 930 que comprende un conducto 935 con una unión 940 (por ejemplo, una unión en T). La unión 940 se configura para separar un conducto de sensor de un único conducto 945 de un conducto de alivio 950 (por ejemplo, un respiradero). El conducto de sensor único 945 se configura para pasar sobre una primera región de un chip sensor/de tierra 955 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de aPTT), una segunda región que comprende en al menos una porción del electrodo de referencia, y una tercera región que comprende al menos un electrodo de detección de analito igual o diferente (por ejemplo, un electrodo de PT). Los electrodos de detección de analito dentro del conducto de sensor de un único conducto 945 se forman con la inmovilización del reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B, 7C y 9.

El cartucho 930 puede comprender además un mecanismo de barrera de fluidos 960 posicionado dentro del conducto de sensor 945, y un conducto 965 (por ejemplo, respiraderos) que conduce desde el conducto de sensor 945 a una cavidad 970. En esta modalidad, la cavidad 970 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Alternativamente, el conducto 965 puede configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en las Figuras 36 y 37, durante el funcionamiento del cartucho 930, la muestra de fluido o biológica se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras hasta el conducto 935 y a través de la unión 940. El conducto de alivio 950 (por ejemplo, un respiradero) tiene una constricción o tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra al conducto de sensor 945. La muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 955 hasta el mecanismo de barrera de fluidos 960 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea de manera efectiva la muestra en el conducto de sensor 945. A continuación, puede comenzar el análisis en el conducto de sensor 945. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra procederá entonces al conducto de alivio 950. La constricción o tope capilar en el conducto de alivio 950 está diseñado de manera que tiene una menor resistencia a la presión que los mecanismos de barrera de fluidos en el conducto de sensor 945.

Como se muestra en las Figuras 36 y 38, durante el funcionamiento alternativo del cartucho 930, el fluido o la muestra biológica se puede mover mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o la cámara de retención de muestras hasta el conducto 935. A continuación, la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 955 hasta el mecanismo de barrera de fluidos 960 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un microcanal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea de manera efectiva la muestra en el conducto de sensor 945. A continuación, puede comenzar el análisis en el conducto de sensor 945.

Como debe entenderse, el sensor de tierra integrado y el diseño de un único conducto para el cartucho 930 proporcionan ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (por ejemplo, como debe entenderse, los ensayos pueden ser diferentes o iguales, por ejemplo, PT y aPTT, PT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de un único conducto sin el requisito de mezclar la muestra biológica con el reactivo y/o sustrato. Las características del cartucho 930 permiten realizar dos pruebas analíticas separadas dentro del conducto de sensor 945 sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia entre electrodos una vez que uno o más reactivos han quedado expuestos a la muestra biológica debido a que los electrodos de detección de analito son sensores microambientales con un reactivo/sustrato localizado (por ejemplo, inmovilizado) formado mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen en la presente descripción en detalle. Además, el diseño del sensor de tierra integrado para el cartucho 930

proporciona un diseño de cartucho más simple y compacto que el de los primeros diseños de sensor de tierra descritos anteriormente debido a que el diseño elimina el requisito de espacio para un sensor de tierra completamente separado y una longitud adicional de conducto necesaria para mover la muestra biológica al sensor de tierra separado. Además, el volumen de muestra necesario para cubrir todo el circuito del sensor se reduce significativamente.

La Figura 39 describe la división de una única muestra biológica (por ejemplo, sangre total) y permite realizar múltiples pruebas separadas físicamente (por ejemplo, pruebas de coagulación y pruebas de química analítica) simultánea o posteriormente en una única muestra de sangre total dentro del mismo cartucho desechable. El control de mezcla independiente se proporciona para al menos dos segmentos de la muestra en dos conductos donde se pueden ubicar los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. Los sustratos pueden estar o no localizados (por ejemplo, inmovilizados) sobre los sensores. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra permanecen dentro del conducto y cerca del sensor donde fueron impresos o depositados, lo que elimina de esta manera cualquier posible interferencia cruzada entre las pruebas. Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas en las que podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación y pruebas de química analítica).

La Figura 39 pertenece a una configuración de sensor múltiple para un cartucho 1000 que comprende un conducto 1005 con una unión 1010 (por ejemplo, una unión en T). La unión 1010 puede comprender una primera constricción o tope capilar 1015 y se configura para separar un primer conducto de sensor 1020 de un conducto auxiliar 1025. El primer conducto de sensor 1020 se configura para pasar sobre al menos una porción de un chip sensor 1030 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de PT. El electrodo de detección de analito dentro del primer conducto de sensor 1020 puede formarse con o sin localización (por ejemplo, inmovilización) de un reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones descritas con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9. Una segunda constricción o tope capilar 1035 puede colocarse dentro del primer conducto de sensor 1020, y un conducto 1040 (por ejemplo, respiraderos) puede configurarse para conducir desde el primer conducto de sensor 1020 a un conducto de residuos 1045 (como se describe con respecto a la Figura 24).

El cartucho 1000 puede comprender además un segundo conducto de sensor 1050 que conecta una cavidad 1055 con el conducto de residuos 1045. El conducto auxiliar 1025 se conecta al segundo conducto de sensor 1050 en una unión 1060. La unión 1060 puede comprender una tercera constricción o tope capilar 1065. En algunas modalidades, la primera constricción o tope capilar 1015 y la tercera constricción o tope capilar 1065 se configuran más grandes (por ejemplo, de mayor ancho) que la segunda constricción o tope capilar 1035 para permitir el control de la muestra como se describe a continuación en detalle. El segundo conducto de sensor 1050 se configura para pasar sobre al menos una parte de cada uno de uno o más chips sensores 1070 que comprenden al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de sodio o cloruro). El uno o más chips sensores 1070 pueden configurarse para realizar cualquier número de ensayos, que incluyen electrolitos, química general, gases en sangre y hematología (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 7,419,821, 6,379,883, 5,514,253, 5,200,051, y 5,096,669). Por ejemplo, el uno o más chips sensores 1070 pueden configurarse para realizar cualquier número de ensayos capaces de detectar uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en presión parcial de oxígeno, presión parcial de dióxido de carbono, dióxido de carbono total, pH, potasio, sodio, cloruro, glucosa, BUN, creatinina, lactato, magnesio, hematocrito, calcio ionizado, troponina I, troponina T, CKMB, procalcitonina, bHCG, HCG, NTproBNP, proBNP, BNP, mioglobina, hormona paratiroidea, dímero d, NGAL, galectina -3, y/o PSA, entre otros analitos. Cuando se utiliza un sustrato para realizar el ensayo, el al menos un electrodo de detección de analito dentro del segundo conducto de sensor 1050 puede formarse con o sin localización (por ejemplo, inmovilización) de un reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones como se describió con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9. Cuando no se utiliza un sustrato, el al menos un electrodo de detección de analito dentro del segundo conducto de sensor 1050 puede formarse sin ningún sustrato.

Como se muestra en la Figura 39, durante el funcionamiento del cartucho 1000, la deformación de una junta por parte del analizador puede transmitir presión a un paquete de aluminio que contiene fluido lleno de un fluido, por ejemplo, aproximadamente 130 µL de solución de análisis/lavado, fluido de control o fluido calibrante, ubicado en la cavidad 1055, rompiendo el paquete de aluminio y expulsando fluido al segundo conducto de sensor 1050 y pasando la tercera constricción o tope capilar 1065 para uso posterior en análisis de muestras (como se describió con respecto a la Figura 24). El paquete de aluminio es un paquete de calibrante (CALPAK) que contiene una solución calibrante. La secuencia típica de eventos incluye el CALPAK que se rompe y luego la solución de calibración pasa sobre uno o más chips sensores 1070 para humedecer uno o más chips sensores 1070. A continuación, la muestra de fluido o biológica se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describió con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras hasta el conducto 1005. La muestra biológica se divide en una primera porción y una segunda porción en la unión 1010 (por ejemplo, una unión en T). La primera constricción o tope capilar 1015 (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) colocada dentro del conducto auxiliar 1025 hace que la primera porción de la muestra llene preferentemente el primer conducto de sensor 1020 y se mueva sobre el chip sensor 1030 y el al menos un electrodo (por ejemplo, un electrodo de PT). La primera porción de la muestra dentro del primer conducto de sensor 1020 se detiene en la segunda constricción o tope capilar 1035, lo que hace que la segunda porción de la muestra empuje a través de la primera constricción o tope capilar 1015 y la tercera constricción o tope capilar 1065.

La segunda porción de la muestra llena el segundo conducto de sensor 1050 y se mueve sobre uno o más chips sensores 1070 y el al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de sodio o cloruro). La segunda porción de la muestra puede configurarse para mezclarse con la solución de análisis/lavado, fluido de control o fluido calibrante presente dentro del segundo conducto de sensor 1050. Para permitir la mezcla de los segmentos de fluido, se pueden diseñar características, que incluyen estructuras de retención, tales como matrices de postes, cortes de conductos, ranuras u hoyuelos, en el segundo conducto de sensor 1050 para retener la solución de análisis/lavado, el fluido de control o el fluido calibrante. Alternativamente, la mezcla de los dos segmentos de fluido se puede lograr al fusionar las dos corrientes de fluido del conducto 1025 y el paquete de aluminio 1055 en la unión 1060. En otras modalidades, la solución de análisis/lavado, fluido de control o calibrante puede haberse bombeado a través del segundo conducto de sensor 1050 al conducto de residuos 1045 de manera que la segunda porción de la muestra no se mezcle con la solución de análisis/lavado, fluido de control, o calibrante. Además, para minimizar el arrastre de la solución de análisis/lavado, fluido de control o calibrante, el cartucho puede diseñarse de manera que introduzca un segmento de aire entre el primer fluido y la segunda porción de la muestra. El volumen del conducto auxiliar 1025 debería determinar el tamaño del espacio de aire entre los segmentos de fluido.

Como debe entenderse, las configuraciones de sensores múltiples para el cartucho 1000 proporcionan ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (por ejemplo, PT y un ensayo de química analítica, PT y PT, aPTT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de dos conductos separados. En modalidades en las que se requiere o es ventajoso mezclar, las características del cartucho 1000 permiten un control de mezcla independiente dentro del primer y el segundo conducto sin preocuparse por la activación cruzada u otra interferencia entre electrodos una vez que uno o más reactivos se han expuesto al muestra biológica debido a que los sensores están físicamente separados entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto de sensor.

Como se muestra en la Figura 40 donde el eje x es tiempo/segundos y el eje y es corriente/pA, modalidades pertenecientes al control de mezcla independiente de una muestra en dos conductos separados de un cartucho (como se muestra en las Figuras 25-29 y 39) y la mezcla completa del reactivo/sustrato (es decir, sin microambiente localizado) son capaces de lograr resultados de coagulación (por ejemplo, tiempos PT indicados por la línea vertical marcada en cada una de las curvas de coagulación) mediante el uso de múltiples tipos de muestras (sangre total representada por curvas de respuesta 1071, dos niveles de sangre reducida en factor representados por las curvas de respuesta 1072 y 1073, un nivel de plasma de control representado por las curvas de respuesta 1075). La Figura 41A se refiere a ninguna mezcla de una muestra sobre los reactivos/sustratos inmovilizados o localizados en uno o más conductos de un cartucho (como se muestra en las Figuras 30-38) que también son capaces de lograr resultados de coagulación mediante el uso de muestras (sangre total representada por las curvas de respuesta 1076, sangre reducida en factor representada por las curvas de respuesta 1077, y dos niveles de plasma de control representados por las curvas de respuesta 1078 y 1079) similares a las usadas en la Figura 40. Como se muestra en la Figura 41B (sangre total representada por las curvas de respuesta 1076, sangre reducida en factor representada por las curvas de respuesta 1077 y dos niveles de plasma de control representados por las curvas de respuesta 1078 y 1079), las respuestas del sensor a la mezcla de la muestra sobre los reactivos/sustratos inmovilizados o localizados también son alcanzables, sin embargo, la resolución de las muestras de control de plasma con factor reducido y extendido no es tan clara como en la modalidad inmovilizada sin mezcla (como se muestra en la Figura 41A). Además, la preferencia es que los tiempos de coagulación de la sangre total (curvas 1071 y 1076) sean muy cercanos a los tiempos de coagulación normales del control de plasma (curvas 1072 y 1078); las modalidades no mezcladas, inmovilizadas/localizadas reflejan esto de la mejor manera, lo que da crédito adicional a su mejora sobre el sistema de la Figura 40. Aunque son posibles versiones no mezcladas o mezcladas de las modalidades, la generación de corriente (pA) es mayor y la variabilidad (pA y tiempo de coagulación) es menor en la versión no mezclada (como se muestra en la Figura 41A) de las modalidades. Estos resultados inesperados y más consistentes son directamente atribuibles al uso de los sensores microambientales como se describe en la presente descripción con respecto a las modalidades sin mezcla. La modalidad sin mezcla en combinación con la impresión de reactivo/sustrato localizado (por ejemplo, inmovilizado) representa una mejora del sistema en la activación/propagación de la señal de coagulación en una relación más alta de reactivo/sustrato a menor volumen de muestra, lo que produce de esta manera un tiempo de respuesta de ensayo/sensor más rápido. Además, la localización (por ejemplo, inmovilización) de la impresión del reactivo/sustrato directamente sobre el sensor da como resultado el recambio inmediato (oxidación) del grupo saliente del sustrato difundido una vez generado por la trombina activa. En última instancia, esto conduce a que se genere una señal de corriente mayor (y más reproducible) directamente en el sensor de ensayo amperométrico. Finalmente, la combinación de respuesta rápida a la trombina (evidente por el rápido aumento de las curvas en la Figura 41A en comparación con el aumento más lento en la Figura 41B) con corrientes más altas y una mayor reproducibilidad produce curvas de respuesta que se analizan de manera más fácil y reproducible, lo que produce de esta manera un ensayo mejorado (la modalidad actual, representada en la Figura 41A) sobre cualquiera de los de la Figura 40 o 41B.

Eliminación del chip de tierra e identificación del cartuchos

El chip de tierra puede incorporarse o integrarse en el chip sensor como se describe en detalle en la presente descripción. Un chip de tierra típico (como se describe con respecto a la Figura 17) puede incluir un electrodo de

tierra que sirve como retorno del chip sensor y cuatro clavijas de contacto para la identificación del cartucho (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,419,821). En consecuencia, la integración del chip de tierra en el chip sensor incluye mover estas dos funciones al chip sensor. Las ventajas de integrar el chip de tierra con el chip sensor incluyen (i) un proceso de fabricación simplificado, ya que hay un componente menos con el que lidiar durante la fabricación de obleas, metalización, corte en cubos y ensamblaje del cartucho, (ii) costo reducido, y (iii) volumen de muestra reducido ya que el conducto de sensor se puede acortar como se muestra en una comparación entre al menos las Figuras 25 y 31.

Como se muestra en la Figura 42, el chip de tierra separado y la disposición de chip sensor 1080 (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 17) típicamente funciona mediante el uso de un detector 1082 conectado con la clavija de tierra 1085 en el chip de tierra 1090 y una clavija amperométrica 1095 en el chip sensor 1100 para detectar una diferencia de corriente entre el electrodo de referencia 1105 y el electrodo de detección de analito 1110 (por ejemplo, un electrodo amperométrico). Para impartir la funcionalidad del electrodo de referencia en una disposición de chip sensor único 1115 (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 18), el electrodo de referencia 1105 puede integrarse con el chip sensor 1100 al conectar el electrodo de referencia 1105 con la clavija baja conductimétrica 1120. Se puede implementar un interruptor electrónico 1125 en el analizador, que se configura para conectar la clavija de tierra 1085 y la clavija conductimétrica baja 1120. En consecuencia, el electrodo de referencia 1105 se puede mover esencialmente desde el chip de tierra 1090 al chip sensor 1100.

Con el fin de impartir la funcionalidad de identificación del cartucho en una disposición de chip sensor único (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 18), se puede incluir un mecanismo o medio adicional en la disposición para la identificación del cartucho. Como se muestra en la Figura 42 para una disposición de electrodo único 1130, por ejemplo, un electrodo de detección de analito solo aPTT 1110, se puede implementar una resistencia 1135 entre una clavija amperométrica 1140 no usada y la clavija baja conductimétrica 1120. El electrodo de detección de analito 1110 puede conectarse a la clavija amperométrica 1095, la resistencia 1135 puede conectarse a la clavija amperométrica no usada 1140 y la clavija conductimétrica baja 1120, y el electrodo de referencia 1105 puede conectarse a la clavija conductimétrica baja 1120. La resistencia de la resistencia 1135 puede ser medida por un detector 1145 (por ejemplo, un procesador) al aplicar una pequeña tensión, por ejemplo, 1 mV, entre la clavija amperométrica no usada 1140 y la clavija conductimétrica baja 1120, después (por ejemplo, inmediatamente después) de que el cartucho que se inserta en el analizador. El valor de la resistencia medida puede usarse para la identificación del cartucho. Por ejemplo, cada tipo de cartucho (por ejemplo, cartuchos i-STAT® EC8+, CG8+, EG7+, CHEM8+, etc.) puede estar asociado con un cierto intervalo de resistencia o resistencia, de manera que puede usarse una resistencia medida del cartucho para identificar el tipo de cartucho mediante el uso de una tabla de consulta.

La resistencia 1135 puede estar compuesta por un alambre de metal, preferentemente un alambre de oro fabricado al mismo tiempo que las almohadillas de contacto y el electrodo sensor. El alambre de oro puede ser tan pequeño como de 5 μm de ancho y 0,1 μm de espesor, lo que forma un área de 0,5 μm^2 . Como la resistividad del oro es 2,44 $\mu\Omega\text{-cm}$, o 0,0244 $\Omega\text{-}\mu\text{m}$, un alambre de oro de 1000 μm de longitud tendrá una resistencia de 0,0244 $\Omega\text{-}\mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m} / 0,5 \mu\text{m}^2 = 48,8 \Omega$. Después de insertar el cartucho en el analizador, se puede aplicar una pequeña tensión, por ejemplo, 0,5 mV y el analizador puede generar y detectar una corriente de alrededor de 10 μA . Para minimizar el consumo de energía, opcionalmente el alambre de oro podría ser más largo, la tensión aplicada podría ser menor o el tiempo para la aplicación de la tensión podría ser más corto.

La disposición de electrodo único 1130 puede incluir un electrodo de detección de analito solo de PT 1110 en lugar de un electrodo de detección de analito solo de aPTT 1110. La longitud del alambre de oro puede aumentarse a unos 10 cm, lo que aumenta la resistencia del alambre de oro a unos 5000 Ω , con el fin de distinguir la identificación del cartucho de PT de la del cartucho de aPTT.

La resistencia puede implementarse entre la clavija amperométrica 1095 y la clavija conductimétrica baja 1120. Como deben entender los expertos en la técnica, el concepto de usar una resistencia para identificar el tipo de cartucho puede implementarse en cualquiera de las disposiciones de sensor/cartucho descritas en la presente descripción. Además, se pueden obtener diferentes valores para la resistencia al variar las geometrías del alambre o mediante el uso de materiales variados para el alambre (por ejemplo, mediante el uso de TiW en lugar de oro), que luego pueden usarse para identificar diferentes cartuchos.

Para impartir la funcionalidad de identificación del cartucho en una disposición de chip sensor múltiple (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 18), se puede incluir un mecanismo o medio adicional en la disposición para la identificación del cartucho. Como se muestra en la Figura 43 para una disposición de electrodo múltiple (por ejemplo, dos) 1150, por ejemplo, un electrodo de detección de analito de PT 1155 y un electrodo de detección de analito de aPTT 1160, se puede implementar una resistencia 1165 entre una clavija amperométrica no usada 1170 y la clavija baja conductimétrica 1175. El electrodo de detección de analito de PT 1155 puede conectarse a la clavija amperométrica 1180, el electrodo de detección de analito de aPTT 1160 puede conectarse a la clavija amperométrica 1185, la resistencia 1165 puede conectarse a la clavija amperométrica no usada 1170 y a la clavija conductimétrica baja 1175, y el electrodo de referencia 1190 se puede conectar a la clavija baja conductimétrica 1175. La resistencia de la resistencia 1165 puede medirse mediante un detector 1195 al aplicar una pequeña

tensión, por ejemplo, 1 mV, entre la clavija amperométrica no usada 1170 y la clavija conductimétrica baja 1175, después (por ejemplo, inmediatamente después) de que el cartucho se inserta en el analizador. El valor de la resistencia medida puede usarse para la identificación del cartucho. Por ejemplo, cada tipo de cartucho (por ejemplo, cartuchos i-STAT® EC8+, CG8+, EG7+, CHEM8+, etc.) puede estar asociado con un cierto intervalo de resistencia o resistencia, de manera que puede usarse una resistencia medida del cartucho para identificar el tipo de cartucho mediante el uso de una tabla de consulta.

Como se describió anteriormente, la resistencia 1165 puede estar compuesta por un alambre de metal, preferentemente un alambre de oro fabricado al mismo tiempo que las almohadillas de contacto y el electrodo sensor. El alambre de oro puede ser tan pequeño como de 5 μm de ancho y 0,1 μm de espesor, lo que forma un área de 0,5 μm^2 . Como la resistividad del oro es 2,44 $\mu\Omega\text{-cm}$, o 0,0244 $\Omega\text{-}\mu\text{m}$, un alambre de oro de 1000 μm de longitud tendrá una resistencia de $0,0244 \Omega\text{-}\mu\text{m} \cdot 1000 \mu\text{m} / 0,5 \mu\text{m}^2 = 48,8 \Omega$. Después de insertar el cartucho en el analizador, se puede aplicar una pequeña tensión, por ejemplo, 0,5 mV y el analizador puede generar y detectar una corriente de alrededor de 10 μA . Para minimizar el consumo de energía, opcionalmente el alambre de oro podría ser más largo, la tensión aplicada podría ser menor o el tiempo para la aplicación de la tensión podría ser más corto.

REIVINDICACIONES

1. Un sensor de prueba para un ensayo de coagulación sanguínea que comprende al menos un transductor revestido con una capa de polímero, en donde la capa de polímero es una capa de soporte porosa que comprende inmovilizado en ella un péptido escindible con trombina, y en donde el péptido escindible con trombina comprende un resto detectable unido por una amida escindible con trombina.
2. El sensor de prueba de la reivindicación 1, en donde el sensor de prueba es un sensor de tiempo de protrombina (PT).
3. El sensor de prueba de la reivindicación 2, en donde la capa de polímero comprende un polímero neutralizador de heparina.
4. El sensor de prueba de la reivindicación 2, en donde la capa de polímero comprende un polímero no neutralizante de heparina.
5. El sensor de prueba de la reivindicación 4, en donde la capa de polímero se modifica para impartir una propiedad neutralizante de heparina sobre el polímero no neutralizante de heparina.
6. El sensor de prueba de la reivindicación 5, en donde la capa de polímero se modifica para unir preferentemente grupos sulfato en la heparina.
7. El sensor de prueba de la reivindicación 2, que comprende además un reactivo de PT que:
 - i) se forma como una capa sobre la capa de polímero,
 - ii) está presente en el polímero, o
 - iii) se ubica adyacente al menos a un transductor.
8. El sensor de prueba de la reivindicación 7, en donde el reactivo de PT comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en: factor tisular no recombinante, factor tisular recombinante, un lípido natural o sintético, un fosfolípido natural o sintético, una combinación de lípidos naturales y sintéticos, una combinación de fosfolípidos naturales y sintéticos, vehículo de proteína, agente estabilizante, agente antimicrobiano, sal de calcio, sal de potasio, polímero soluble en agua, azúcar, gelatina, agarosa, polisacárido, sacárido, sacarosa polietilenglicol, fosfato de sodio, glicina, un aminoácido, antioxidantes, un detergente, una sal tampón y un tampón.
9. El sensor de prueba de la reivindicación 2, en donde el al menos un transductor es un electrodo que comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en: oro, platino, paladio, iridio y sus aleaciones.
10. El sensor de prueba de la reivindicación 2, en donde el al menos un transductor es un detector óptico.
11. El sensor de prueba de la reivindicación 10, en donde el detector óptico es un detector de emisión de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia del resto detectable o un detector de absorbancia por el resto detectable.
12. El sensor de prueba de la reivindicación 2, en donde el resto detectable es una especie electroactiva, un tinte óptico o uno de entre un emisor de fluorescencia, bioluminiscencia y quimioluminiscencia.
13. El sensor de prueba de la reivindicación 2, en donde la capa de polímero comprende poli (alcohol vinílico) (PVA), preferentemente un PVA reticulado.
14. El sensor de prueba de la reivindicación 13, en donde el PVA es una sal de estilbizonio fotoactivada.
15. El sensor de prueba de la reivindicación 1, en donde la capa de polímero se selecciona del grupo que consiste en: alcohol polivinílico (PVA), alcohol polivinílico de estirilpiridinio (SBQ-PVA), agarosa, poli(acrilamida), metacrilato de polimetilo, N-metilpirrolidona, polivinilpirrolidona, poliimida, látex filmógeno, Sepharose™, poliuretanos, acrilatos de polietileno, metacrilatos de polietileno poli (ácido láctico co-glicólico), hidroxipropilcelulosa, celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructanos, derivados de fructanos, ácido poliglicólico, Elvace™, carboximetilcelulosa, ácido policláctico y poli (ácido láctico co-glicólico).
16. El sensor de prueba de la reivindicación 1, en donde el péptido escindible con trombina se selecciona del grupo que consiste en: HD-Phe-Pip-Arg, HD-Chg-Abu-Arg, CBZ-Gly-Pro-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, HD-Phe-Pro-Arg, ciclohexilglicina-Ala-Arg, Tos-Gly-Pro-Arg, Bz-Phe-Val-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Pro-Arg, Ac -Val-

Hyp-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Val-Pro-Arg, Ac-Gly-Pro-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Gly-Pro-Arg, Ac-Gly-Hyp-Arg y HD-Chg-Abu-Arg.

- 5 17. El sensor de prueba de la reivindicación 1, en donde el resto detectable se selecciona del grupo que consiste en: p-aminofenol, una quinona, un ferroceno, ferrocianuro, otras especies organometálicas, p-nitroanilina, o-dianisidina, 4,4'-bensidina, 4-metoxi-2-naftilamina, N-fenil-p-fenilendiamina, N- [p-metoxifenil-]-p-fenilendiamina y derivados de fenazina.

10

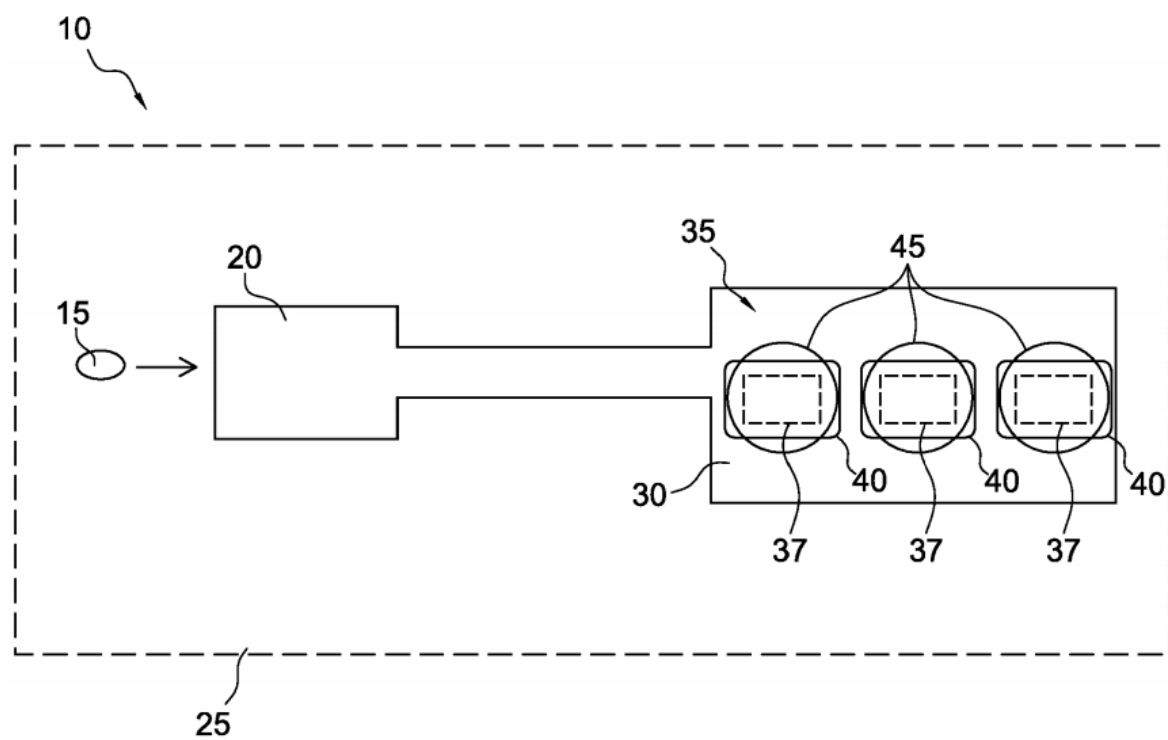


FIG. 1

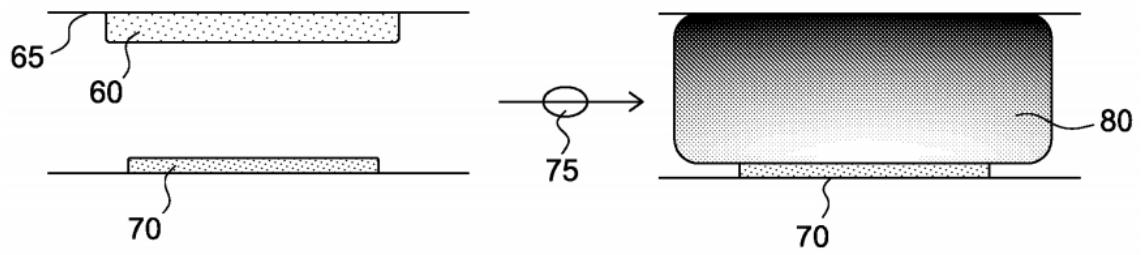


FIG. 2

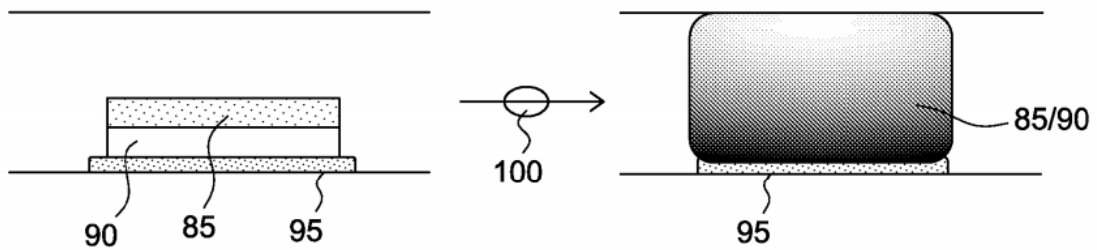


FIG. 3

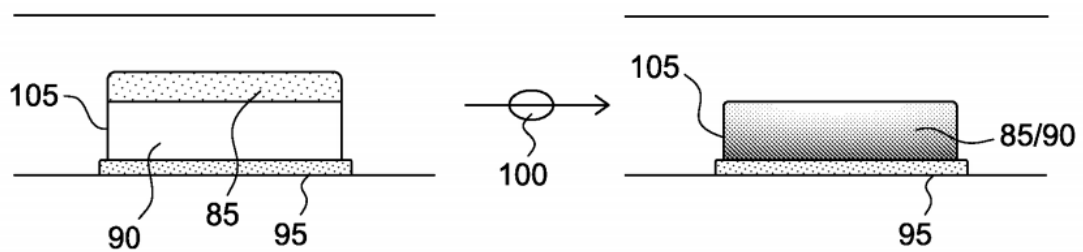


FIG. 4

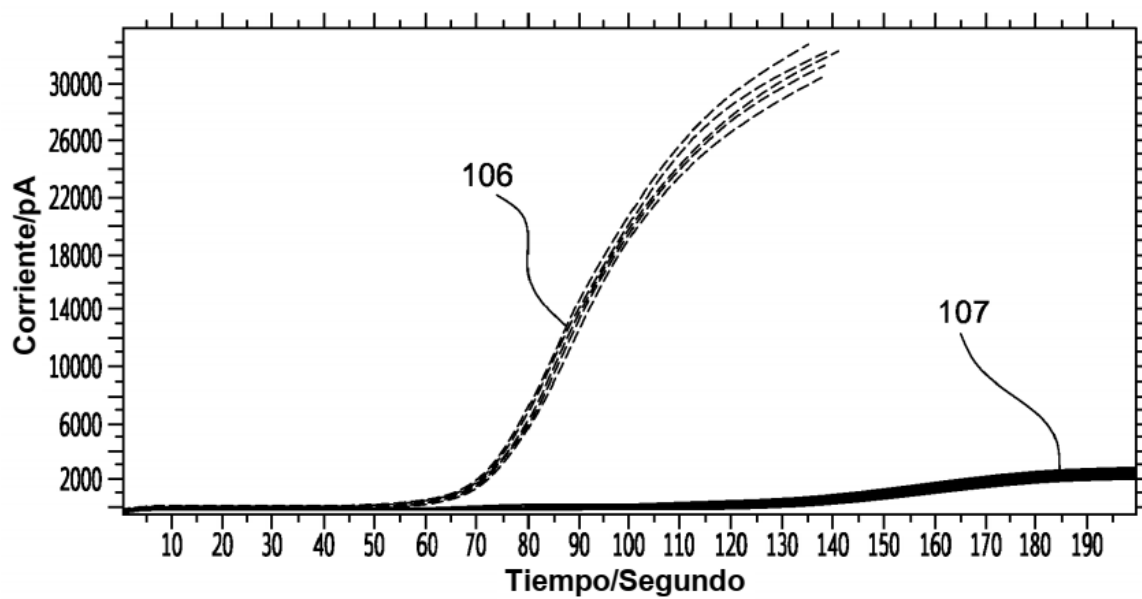


FIG. 5

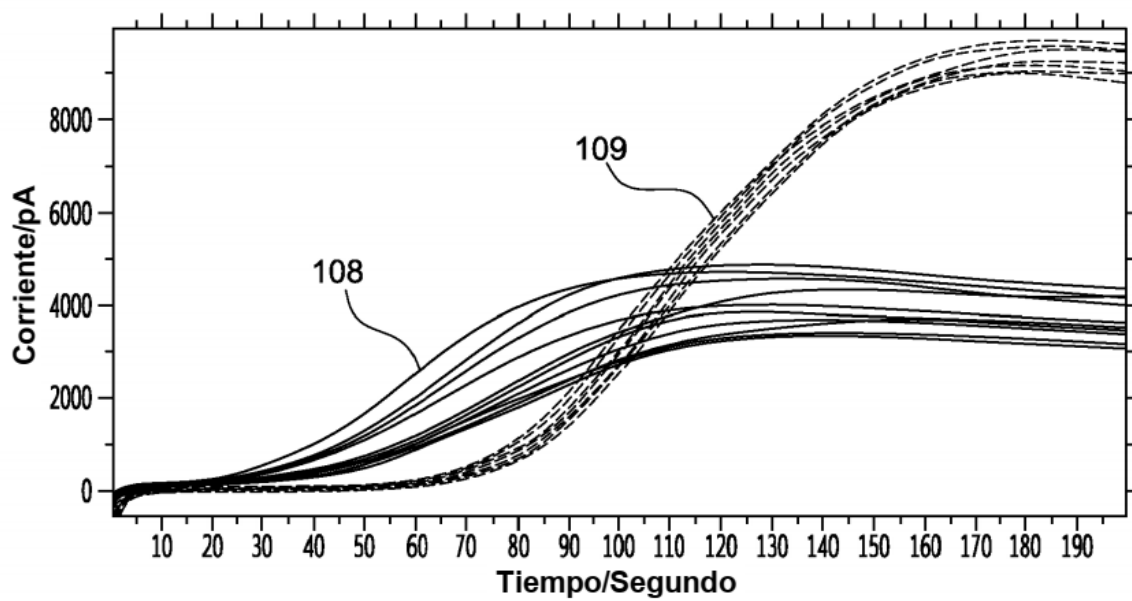


FIG. 6

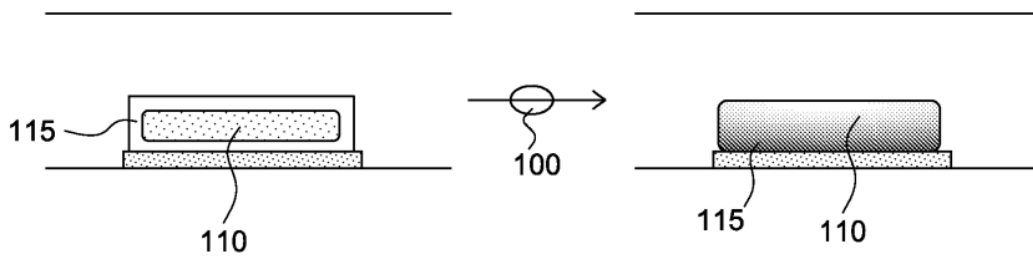


FIG. 7A

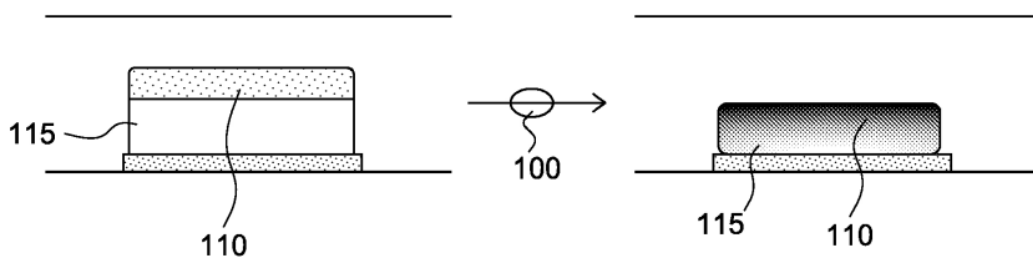


FIG. 7B

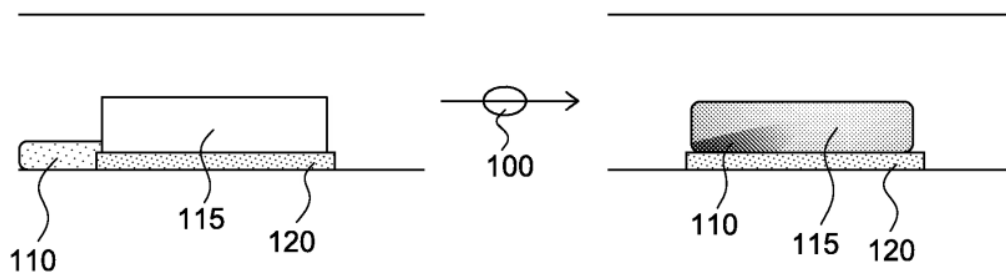


FIG. 7C

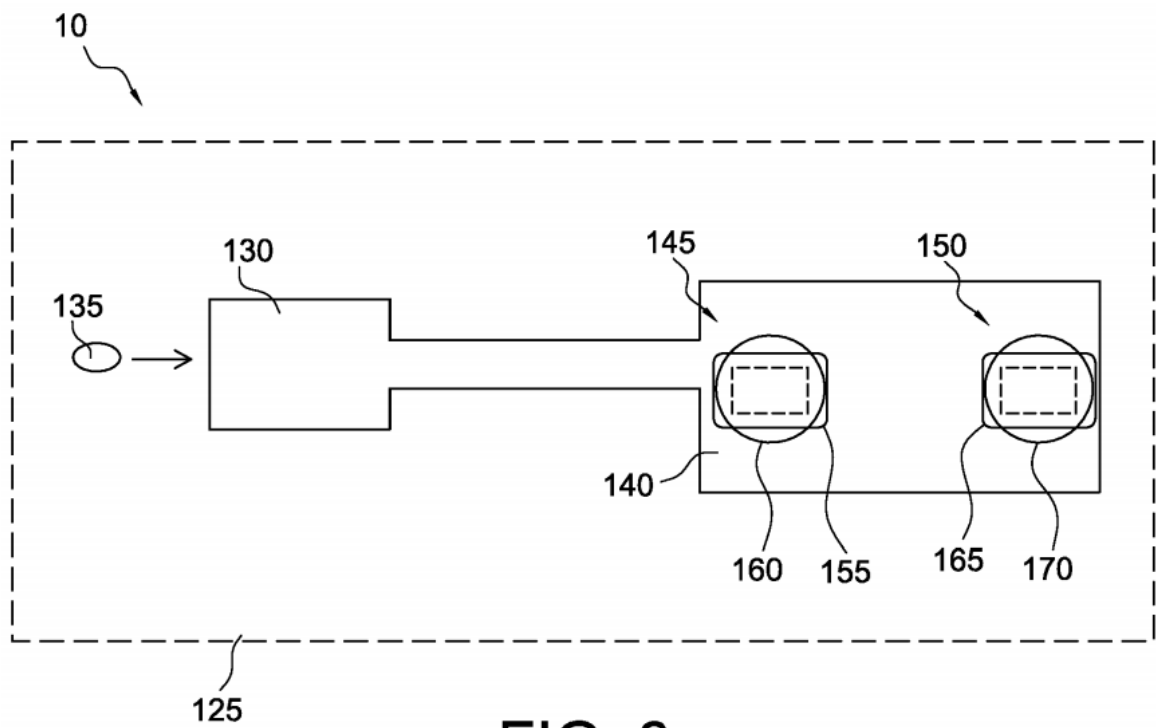


FIG. 8

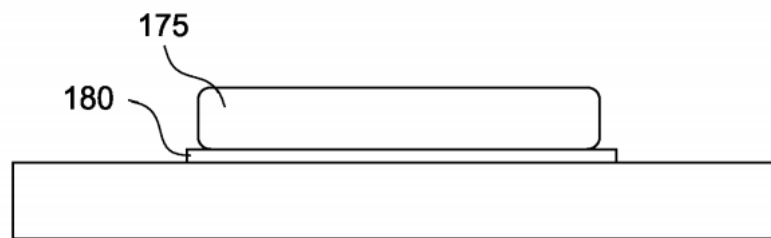


FIG. 9

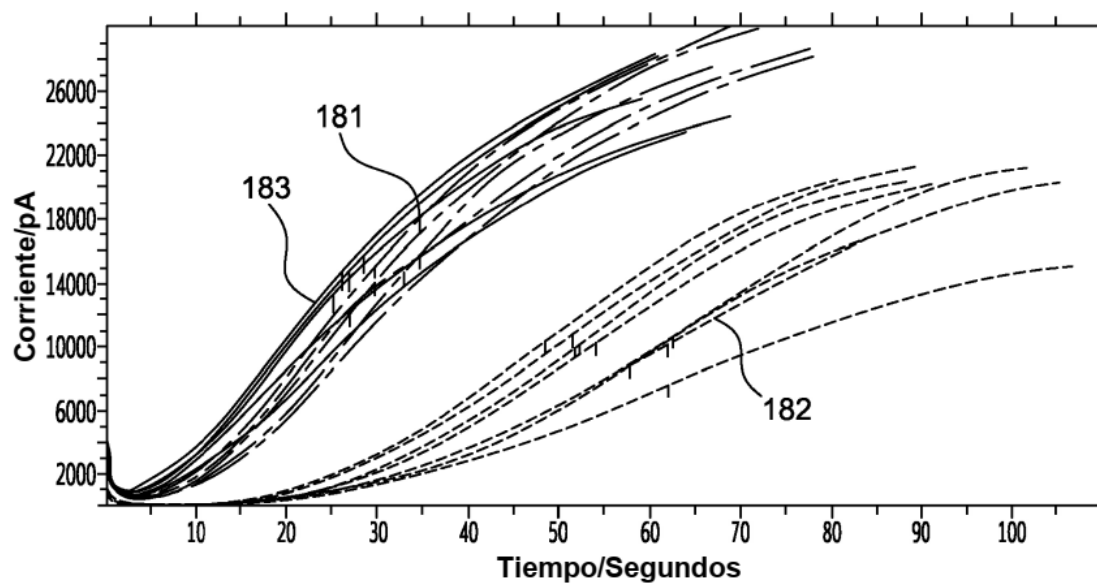


FIG. 10

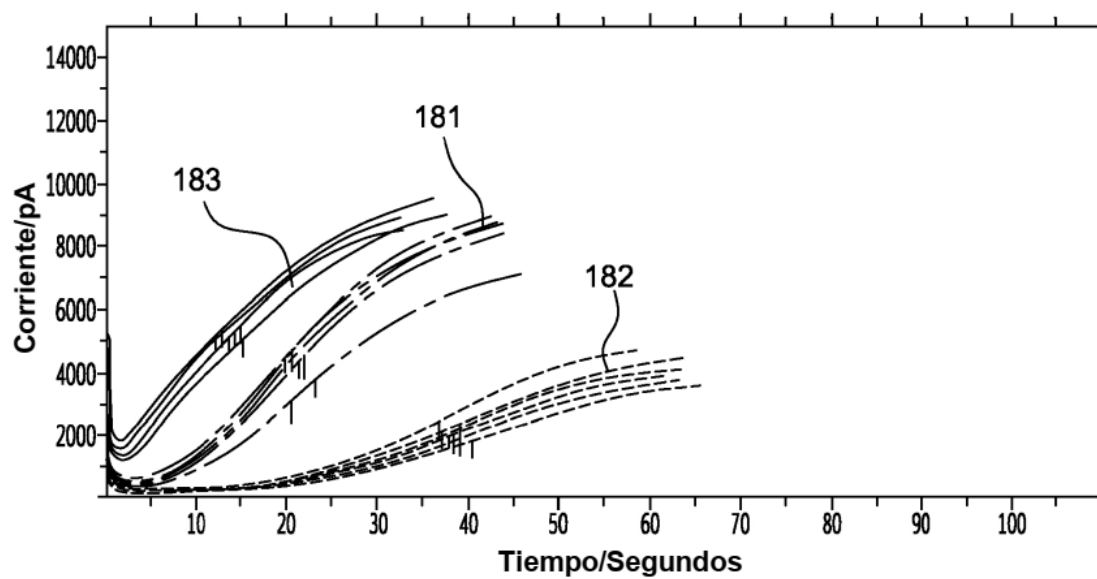


FIG. 11

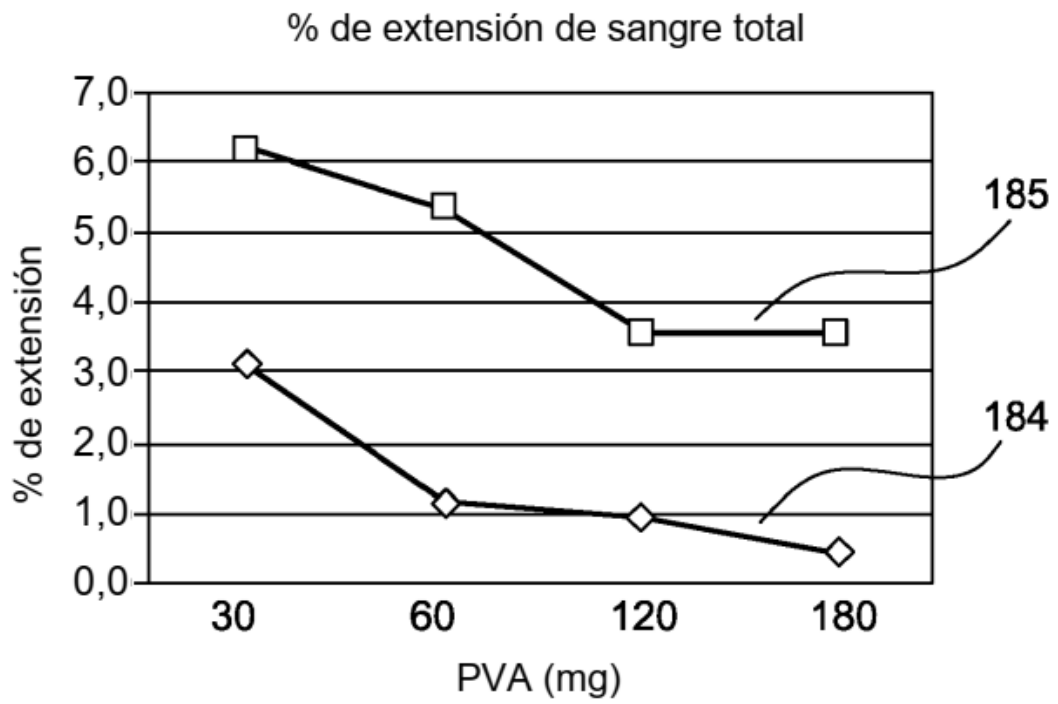


FIG. 12

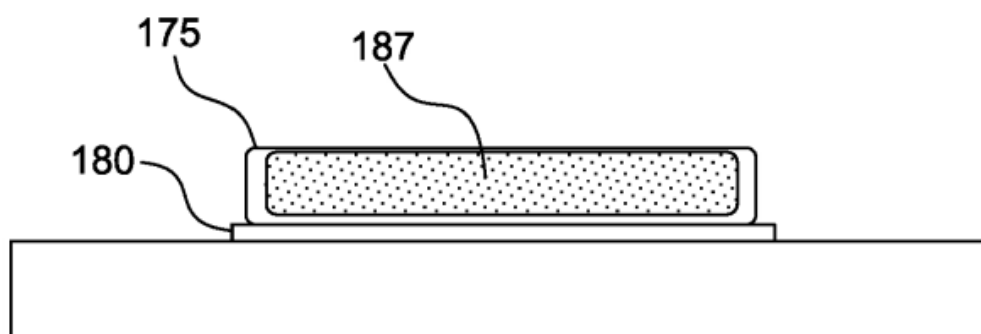


FIG. 13A

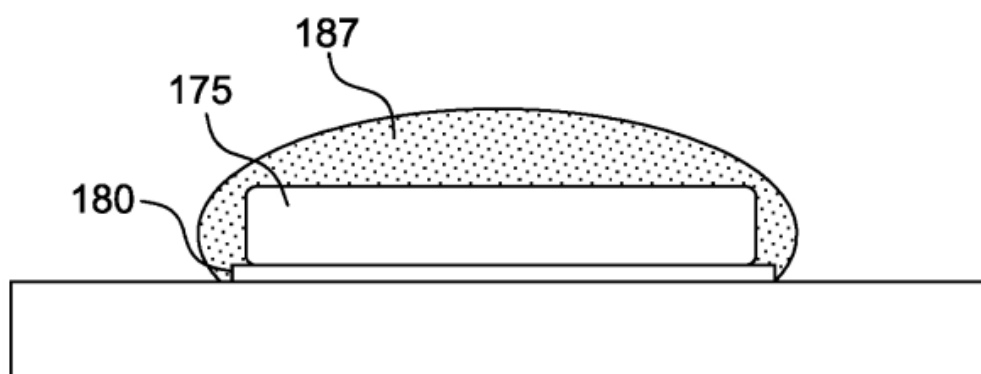


FIG. 13B

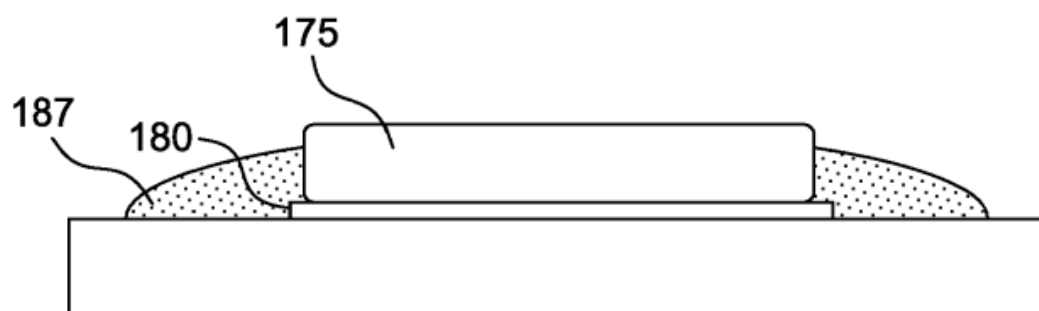


FIG. 13C

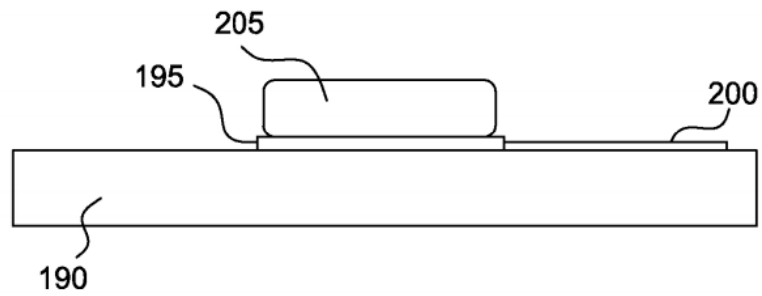


FIG. 14

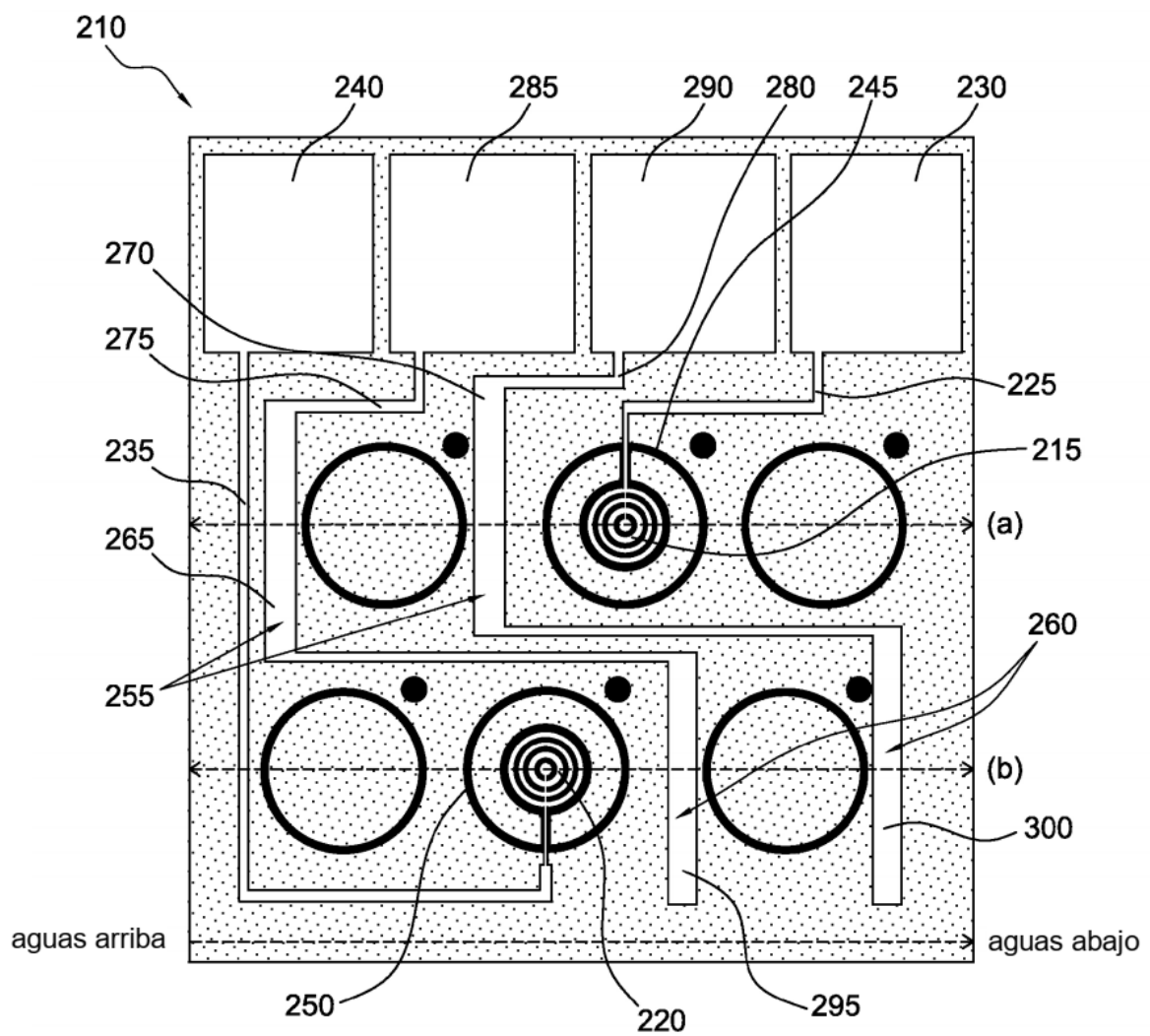


FIG. 15

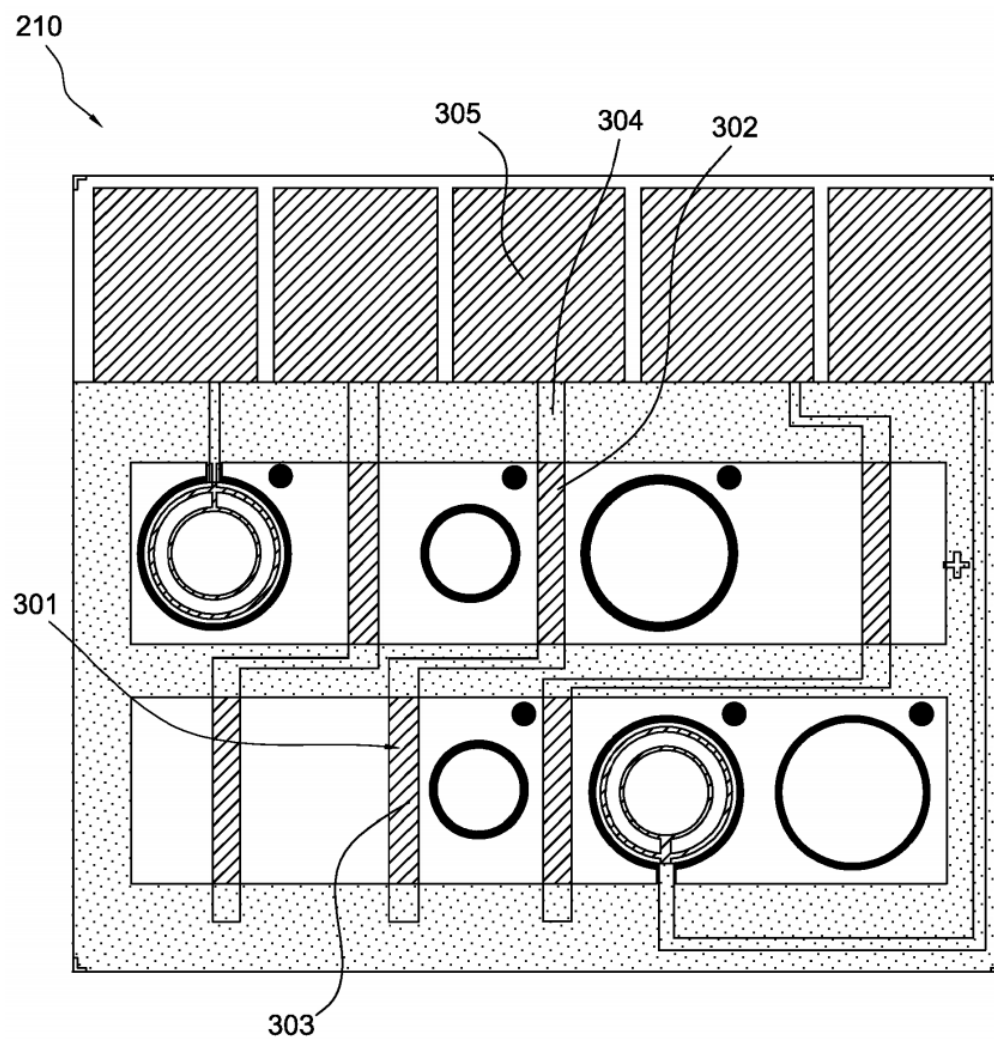


FIG. 16

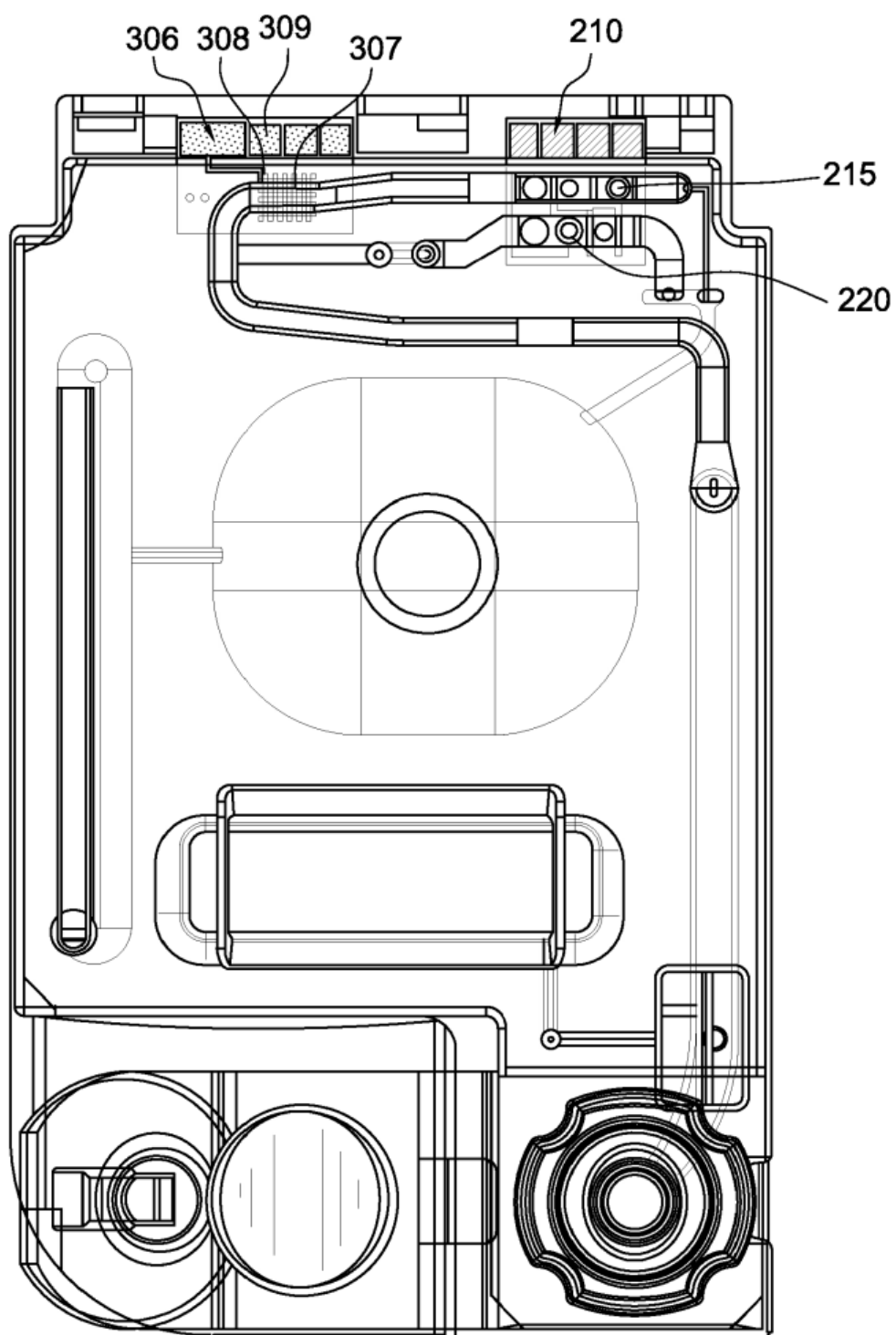


FIG. 17

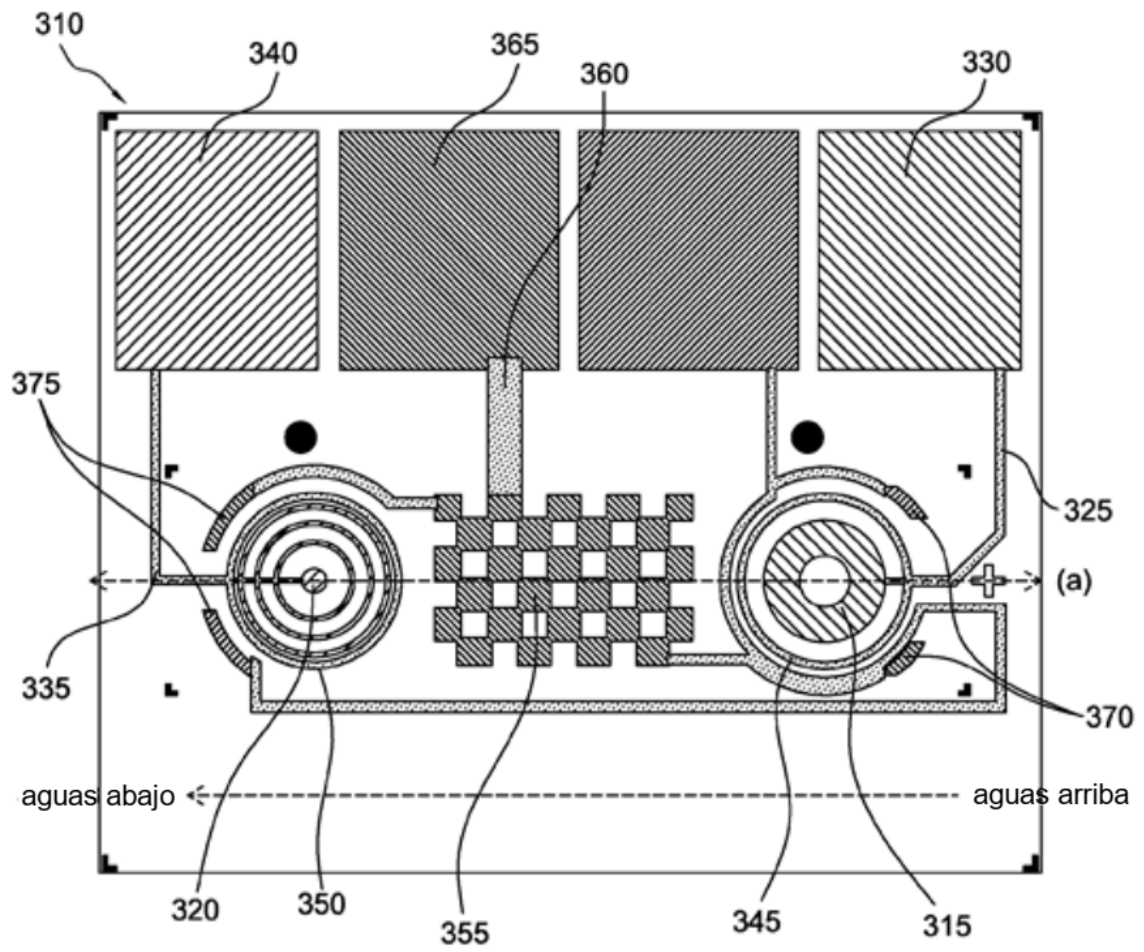


FIG. 18

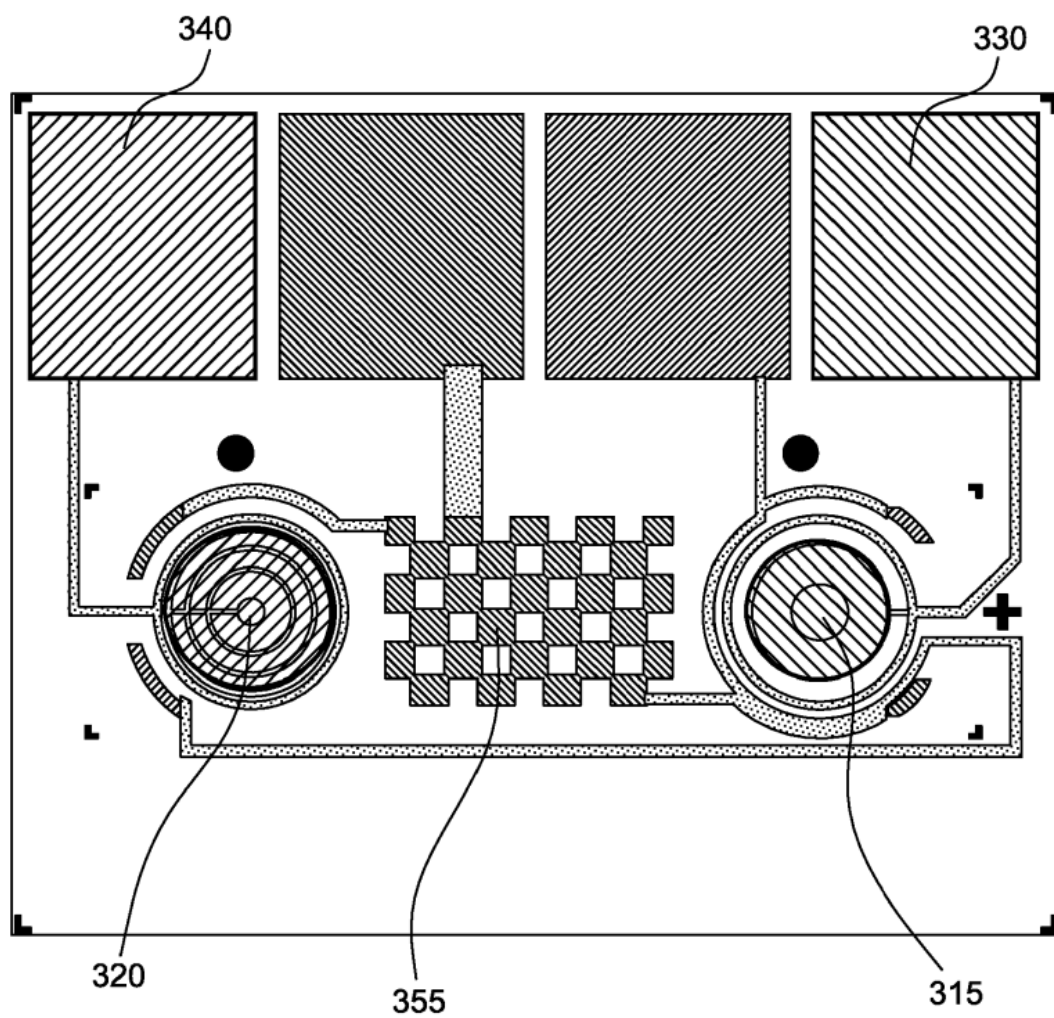


FIG. 19

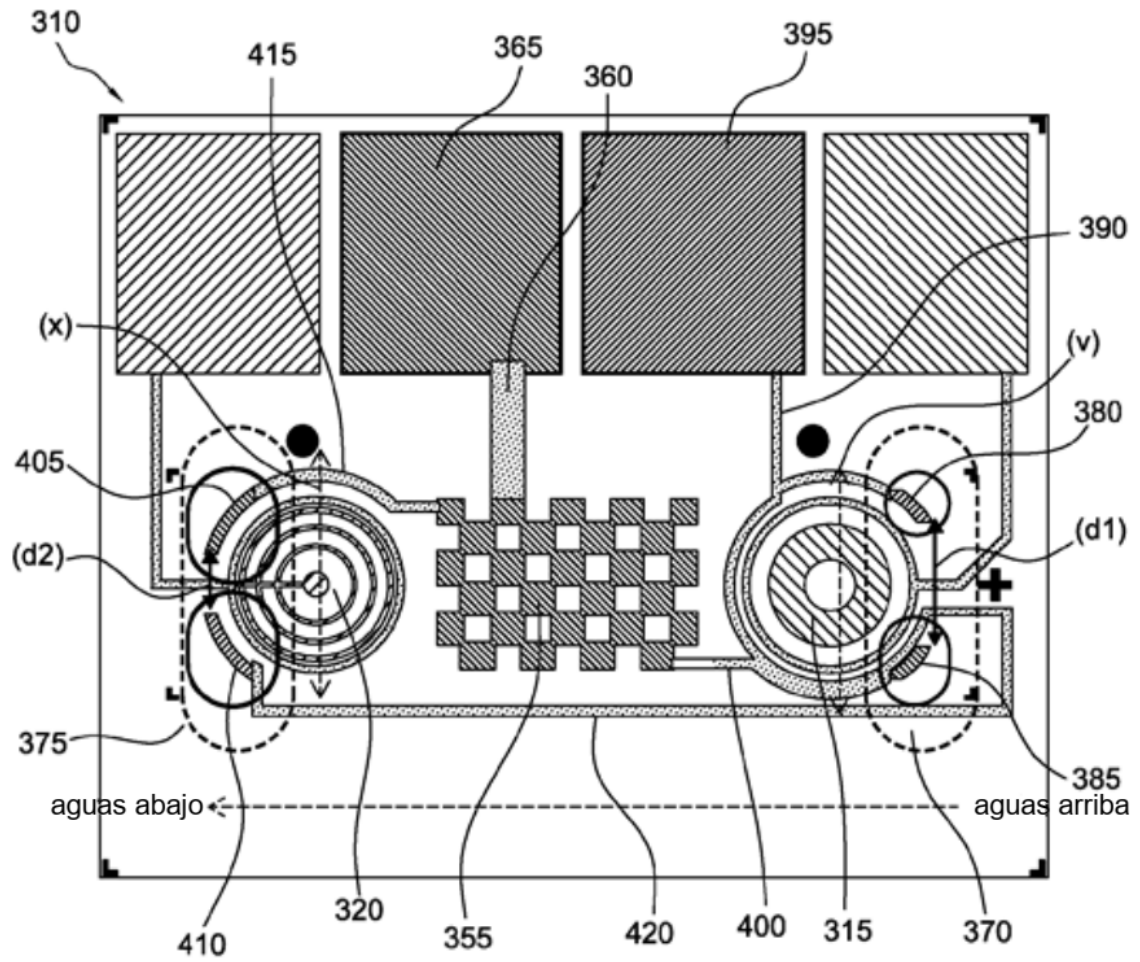


FIG. 20

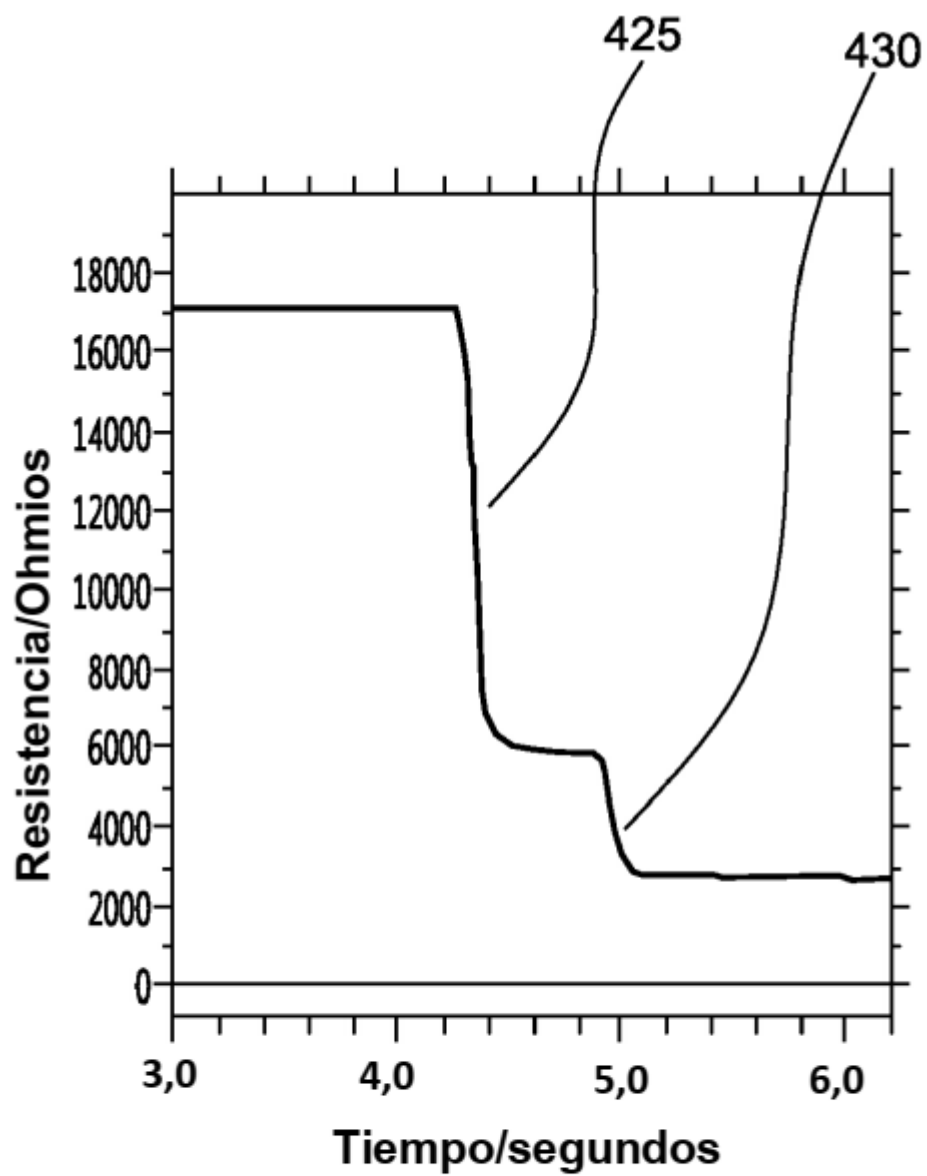


FIG. 21

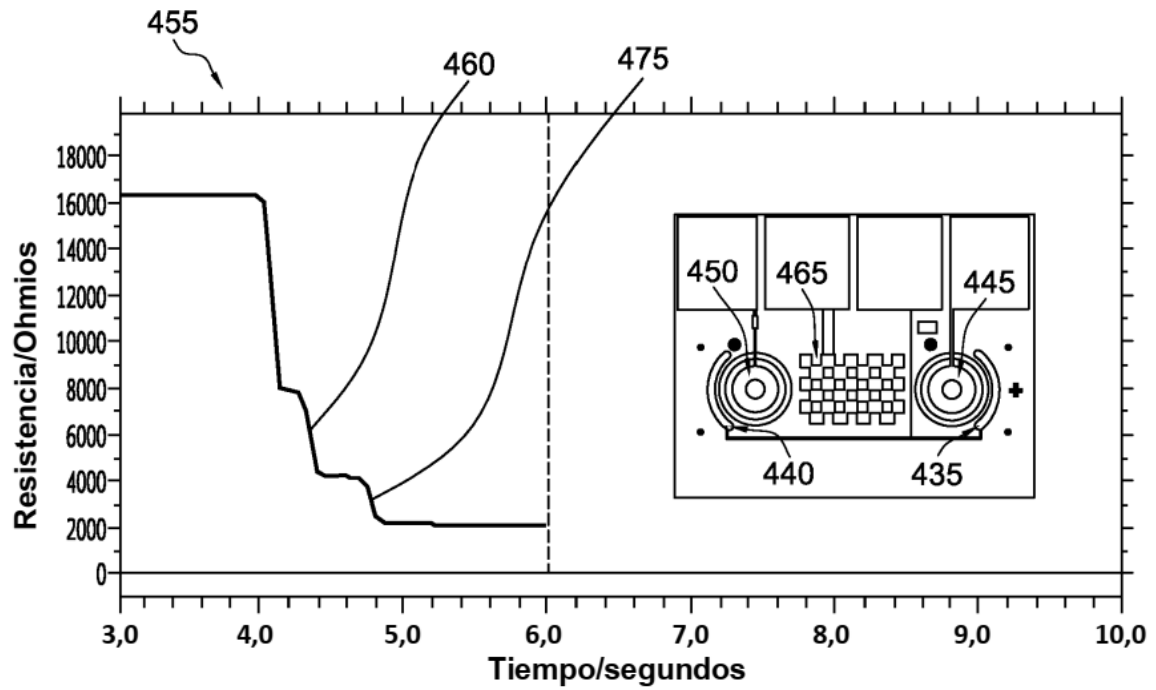


FIG. 22A

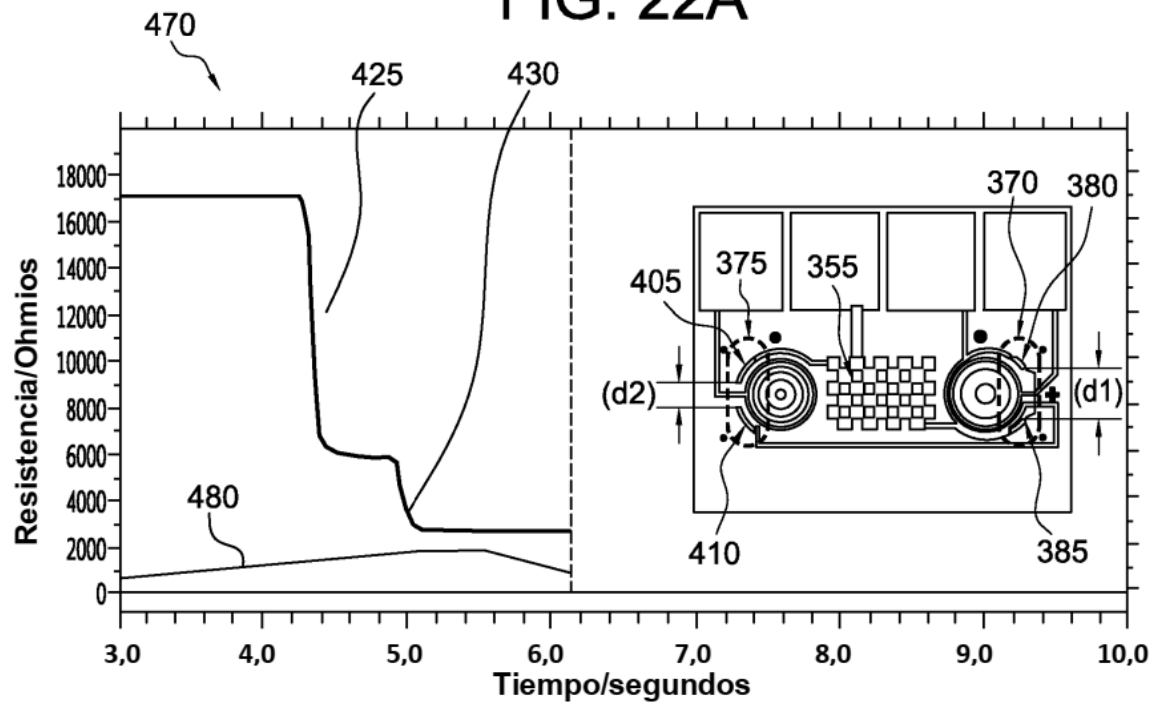


FIG. 22B

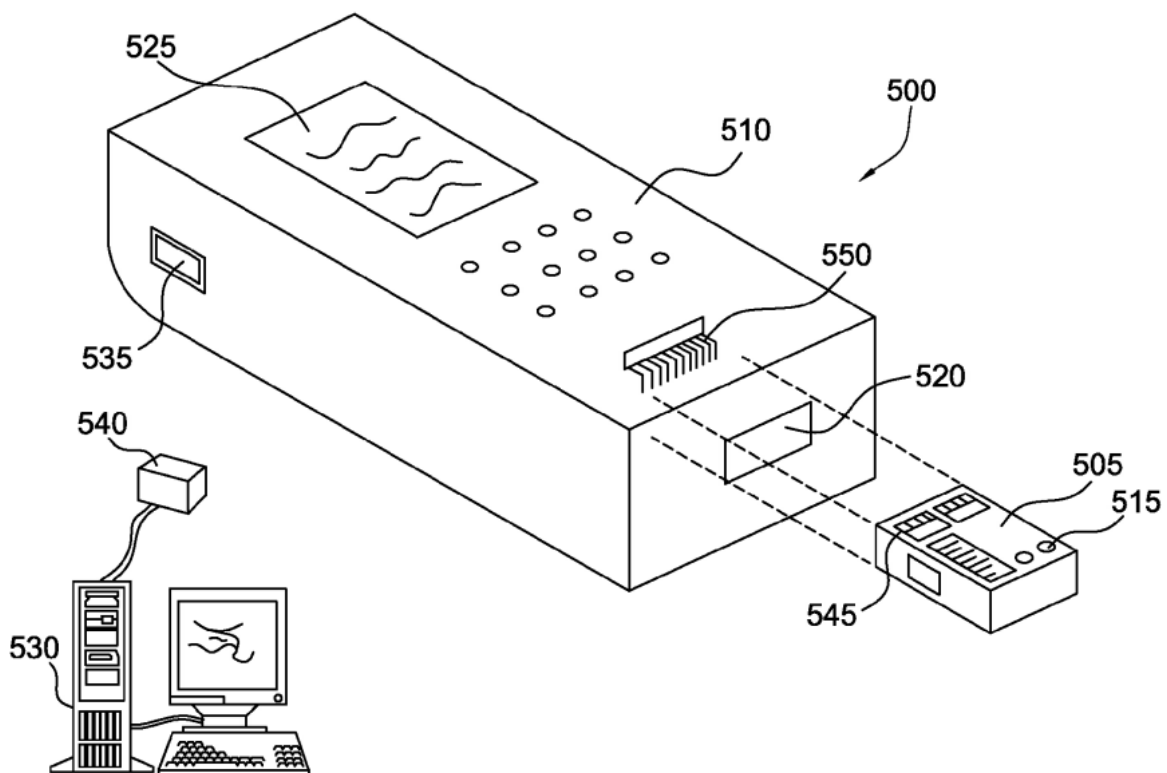


FIG. 23

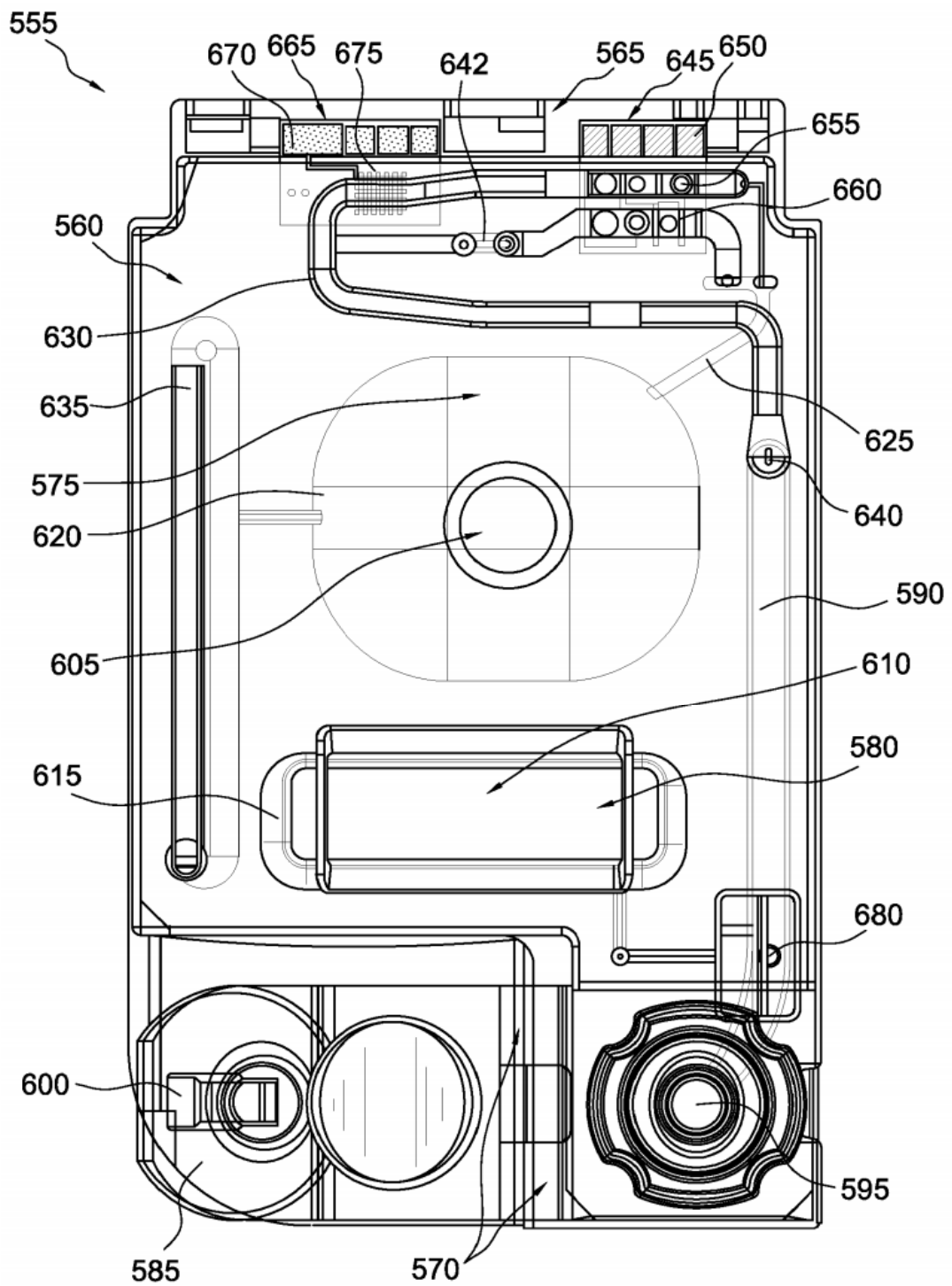


FIG. 24

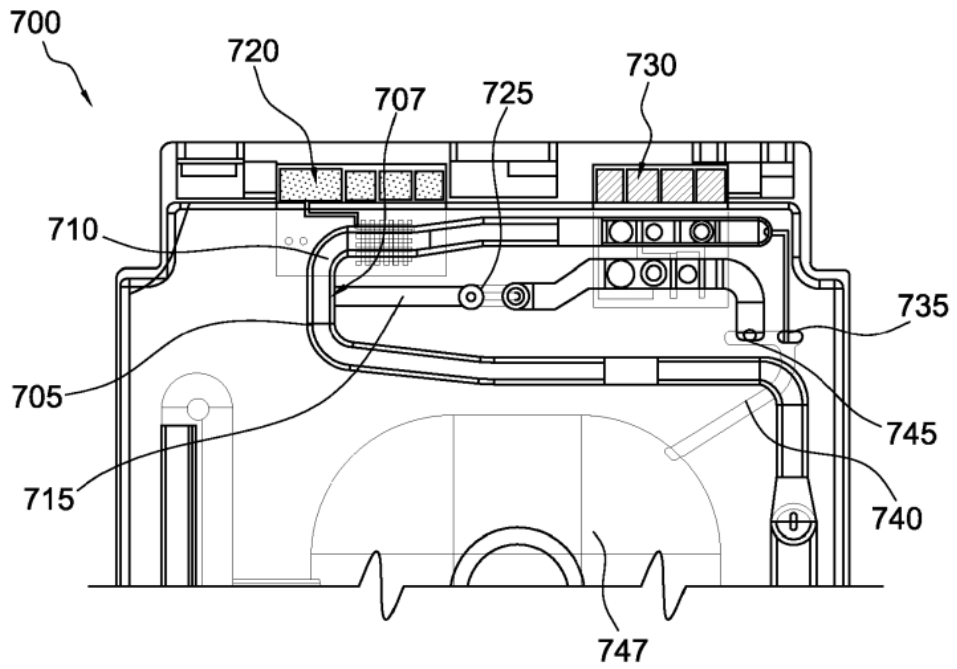


FIG. 25

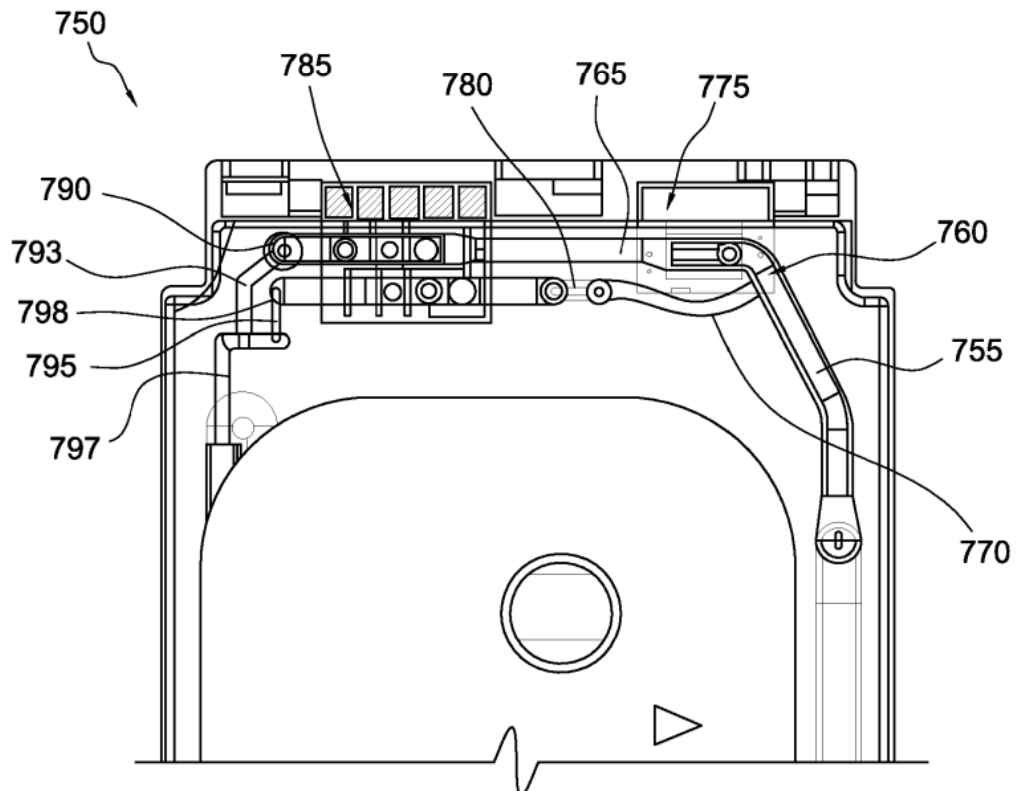


FIG. 26

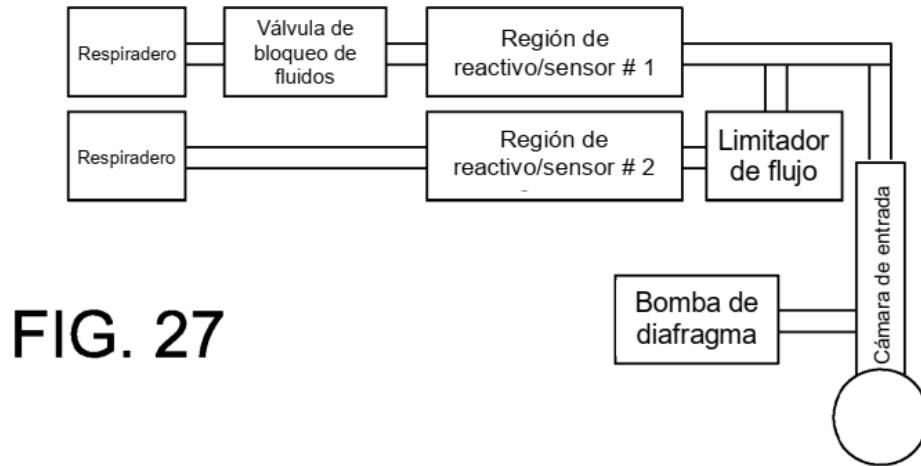


FIG. 27

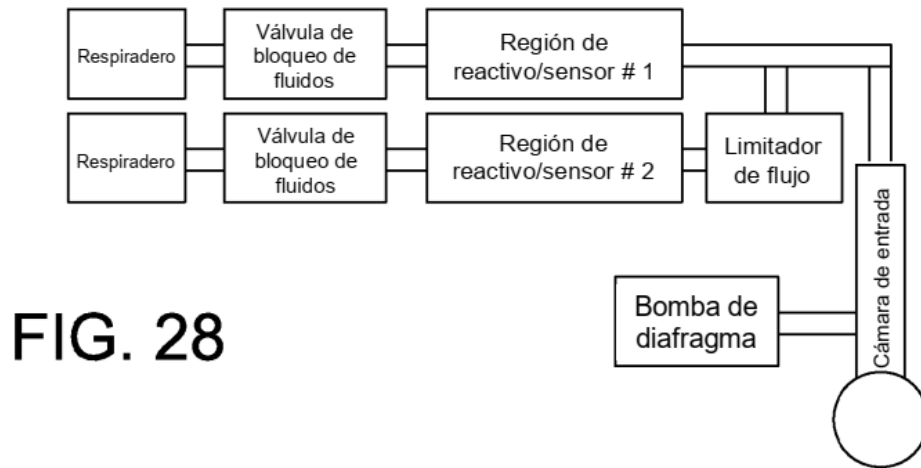


FIG. 28

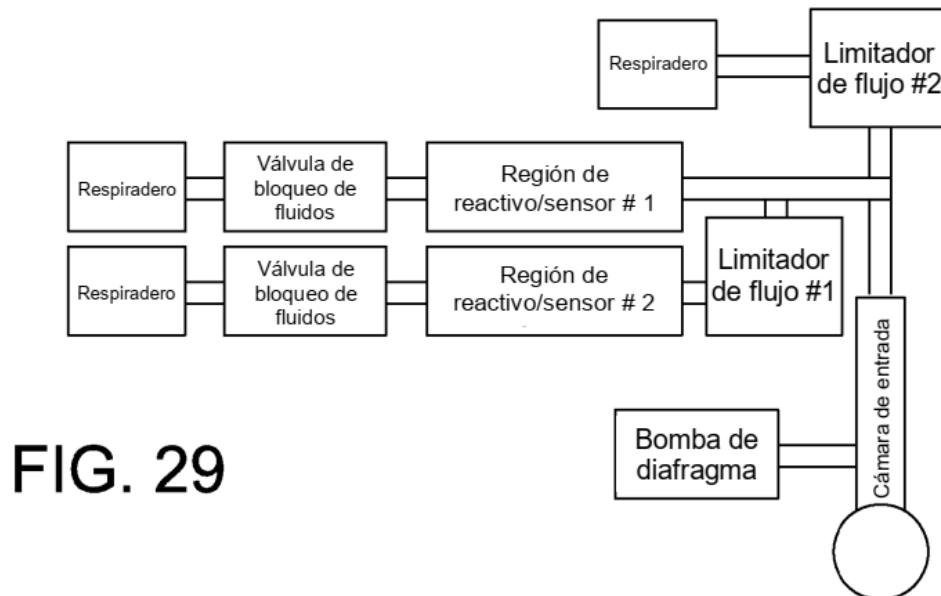


FIG. 29

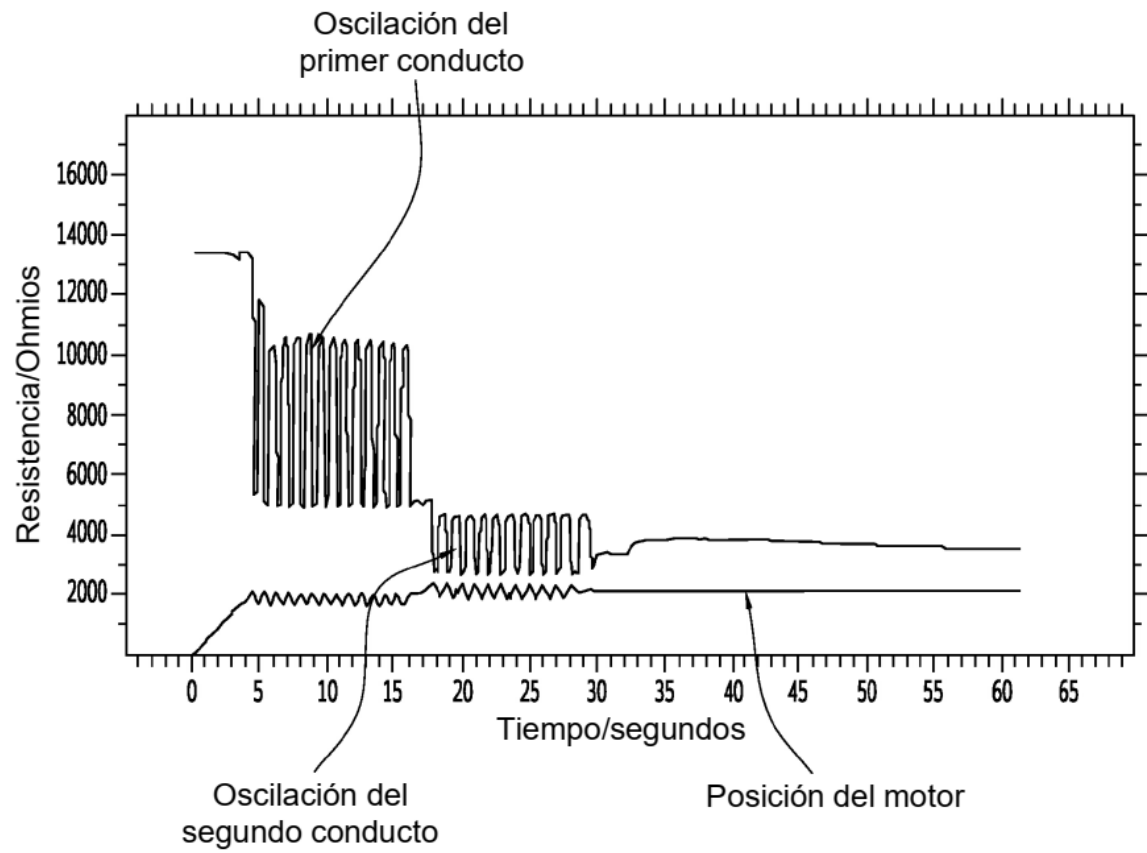


FIG. 30

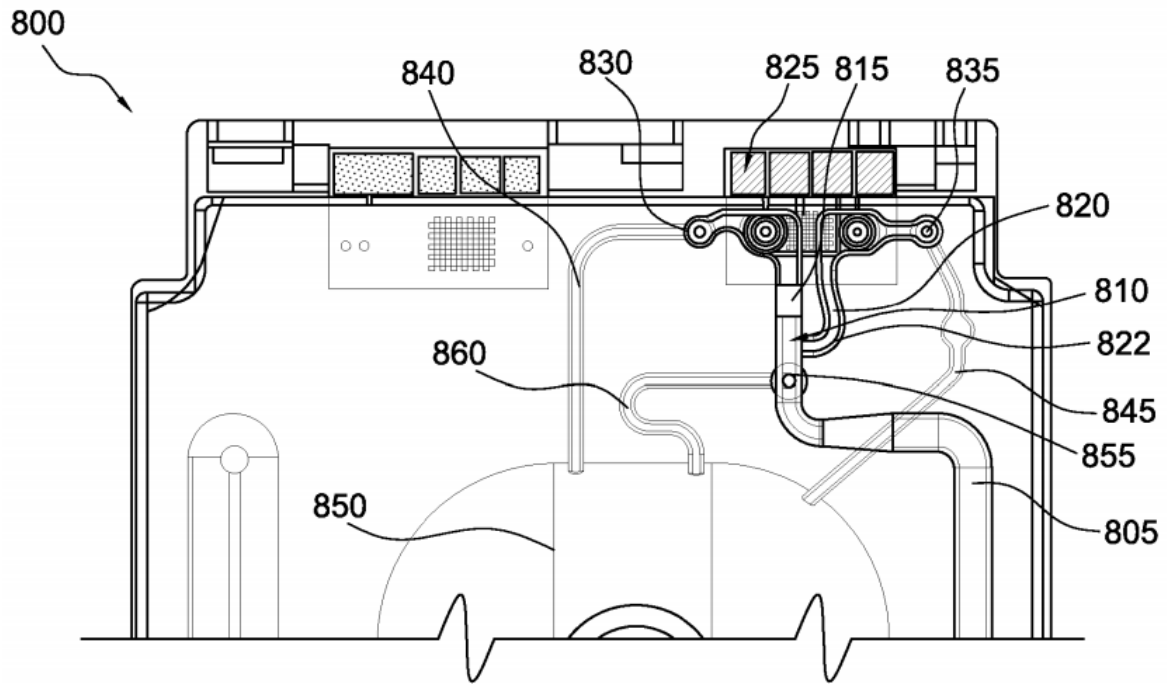


FIG. 31

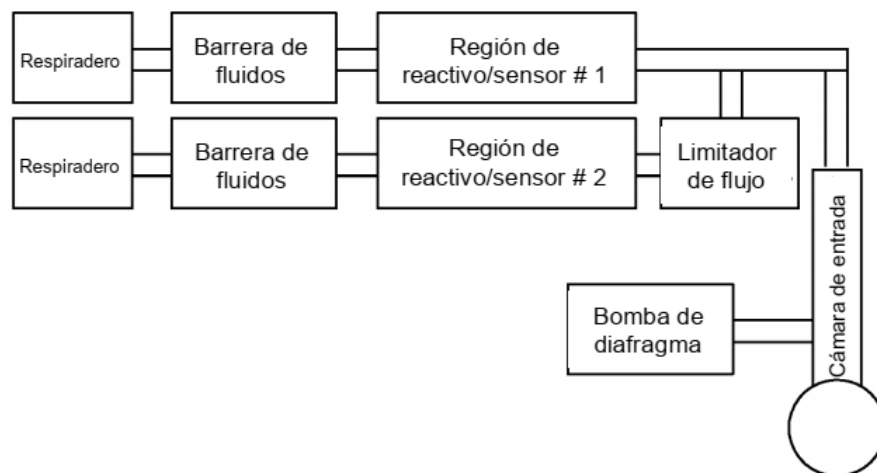


FIG. 32

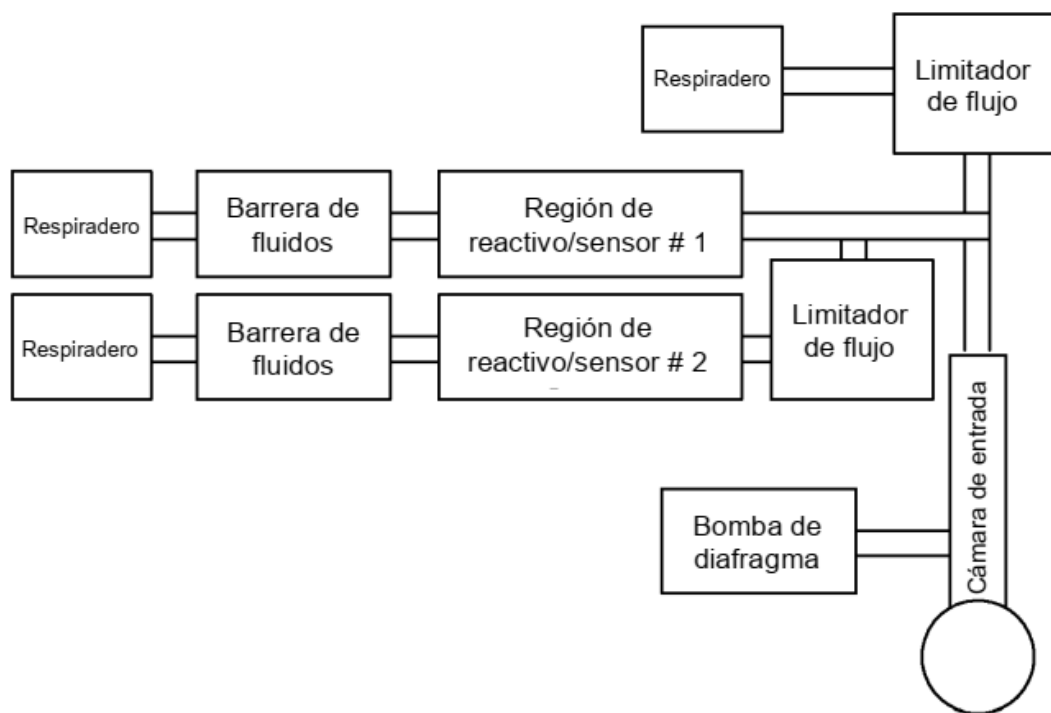


FIG. 33

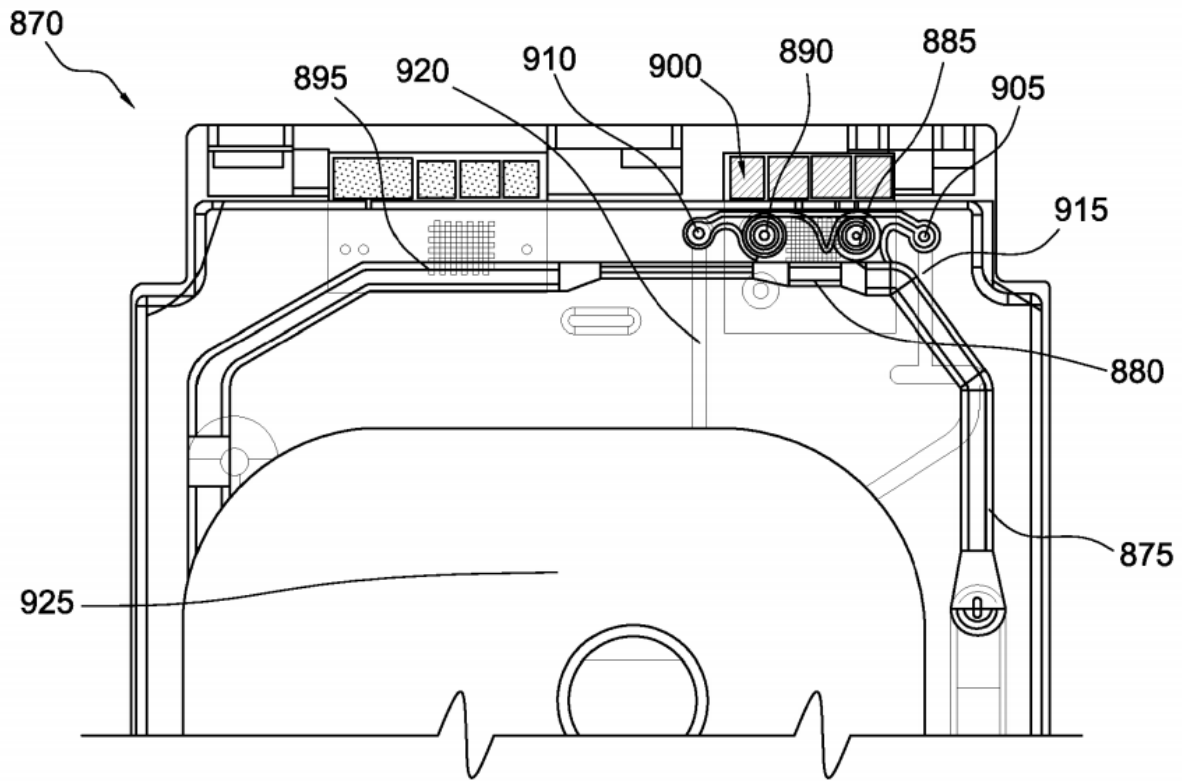


FIG. 34

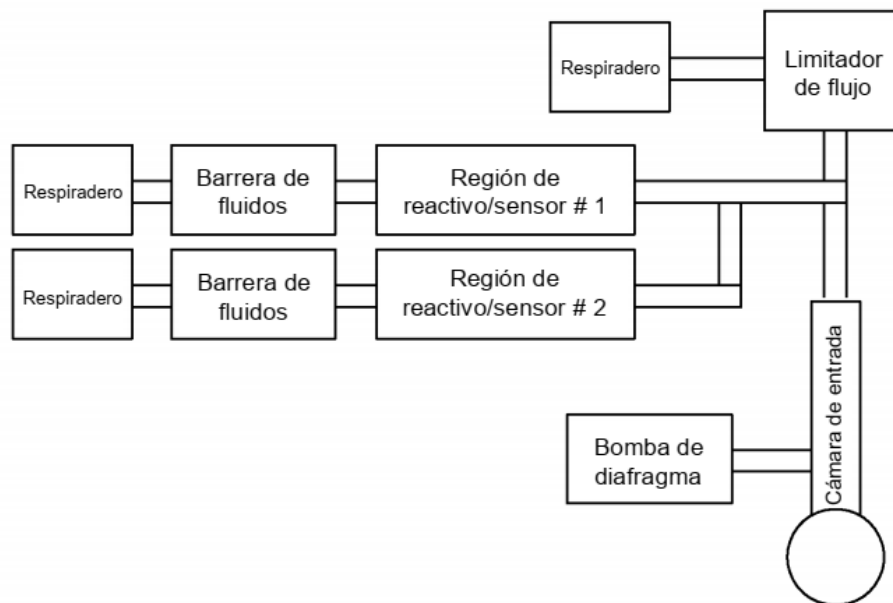


FIG. 35

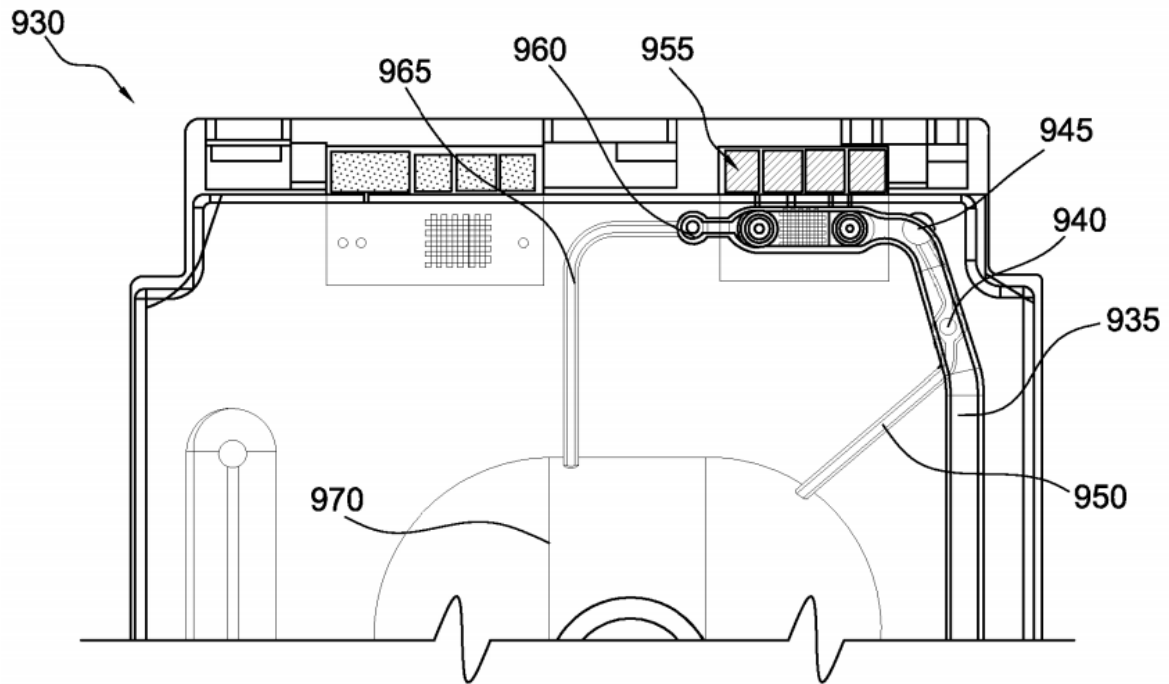


FIG. 36

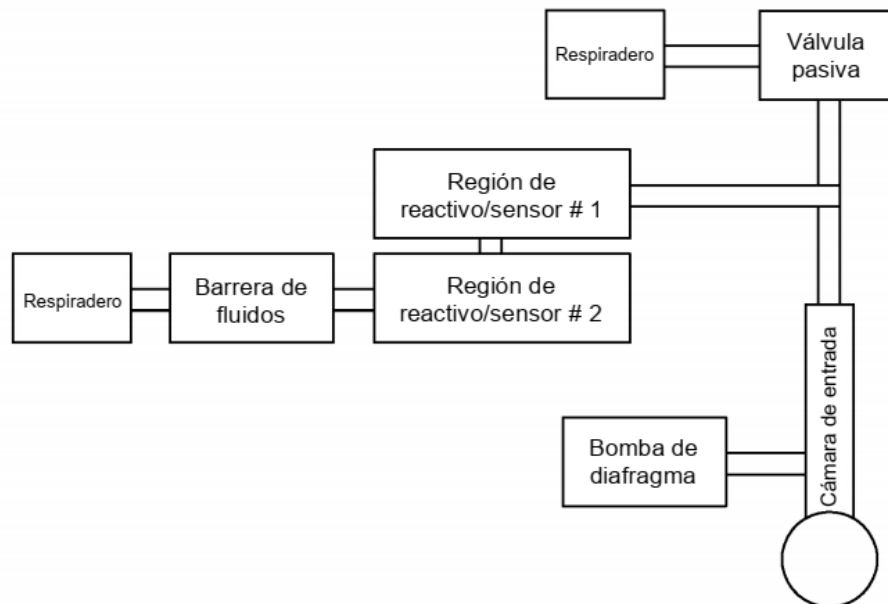


FIG. 37

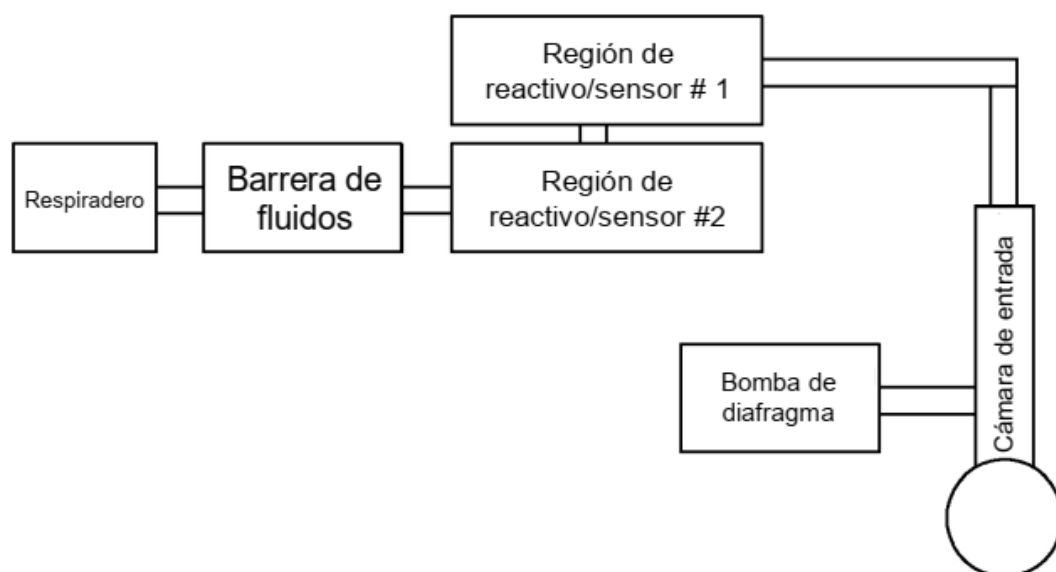


FIG. 38

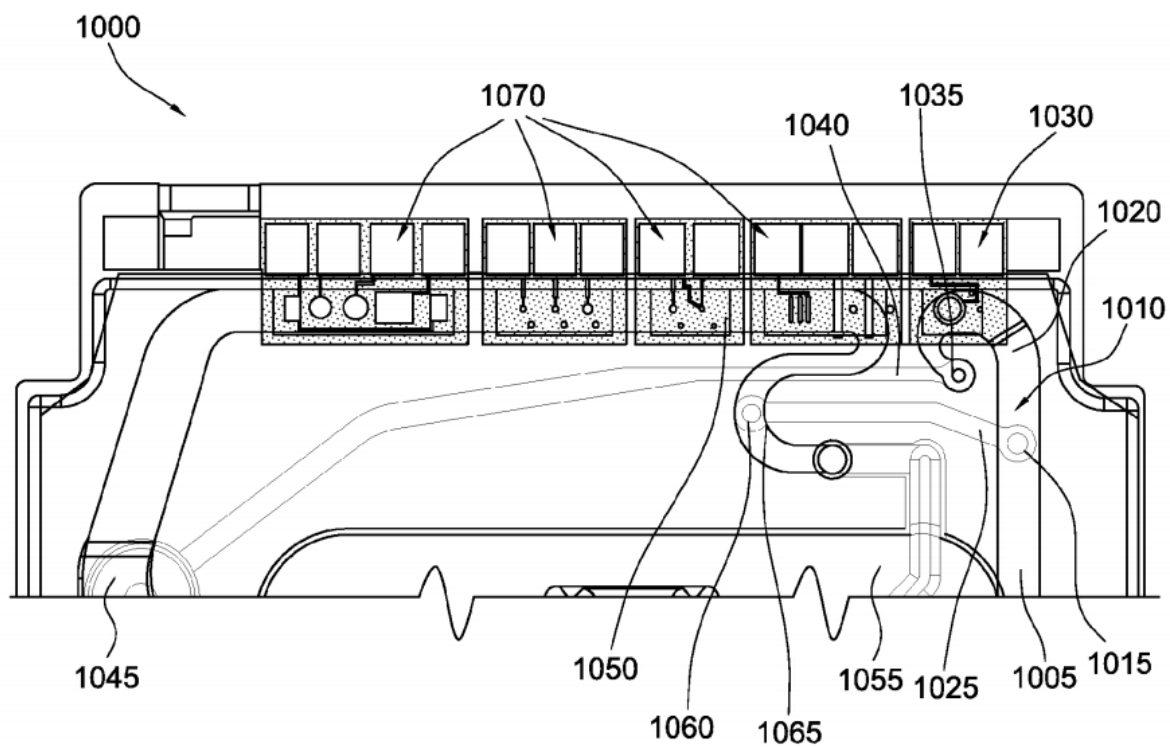


FIG. 39

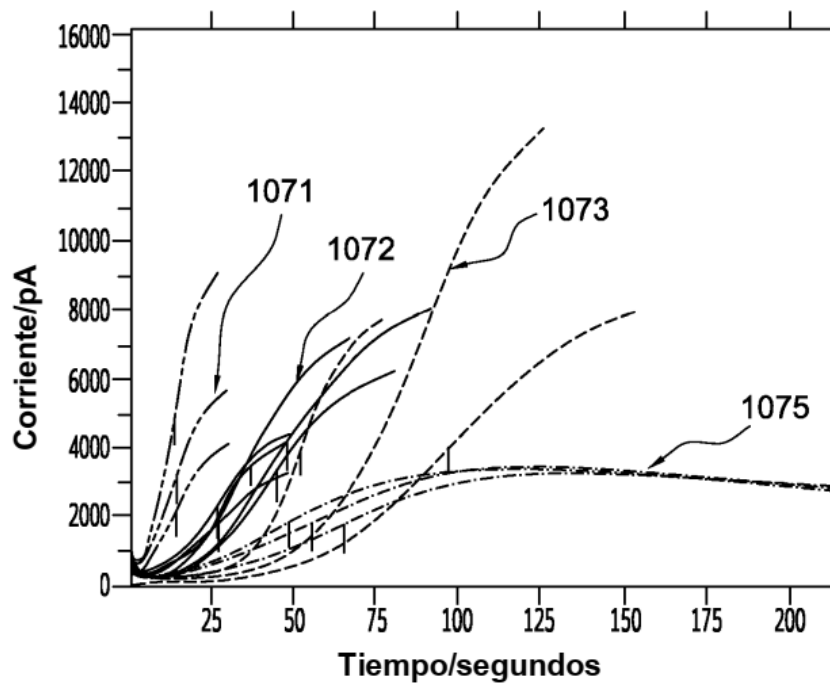


FIG. 40

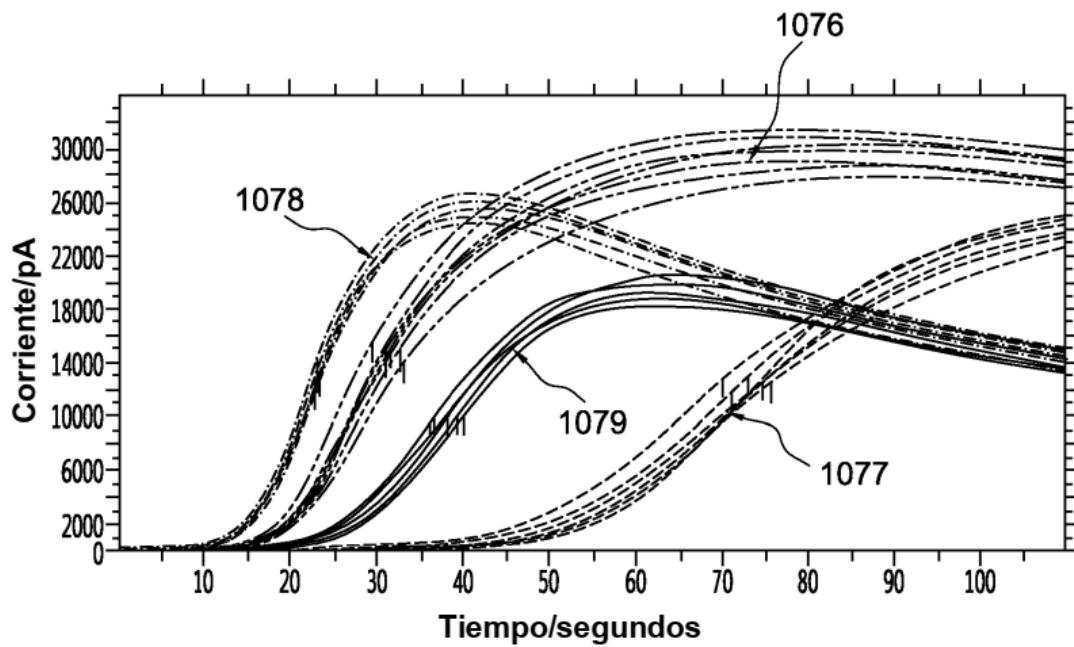


FIG. 41A

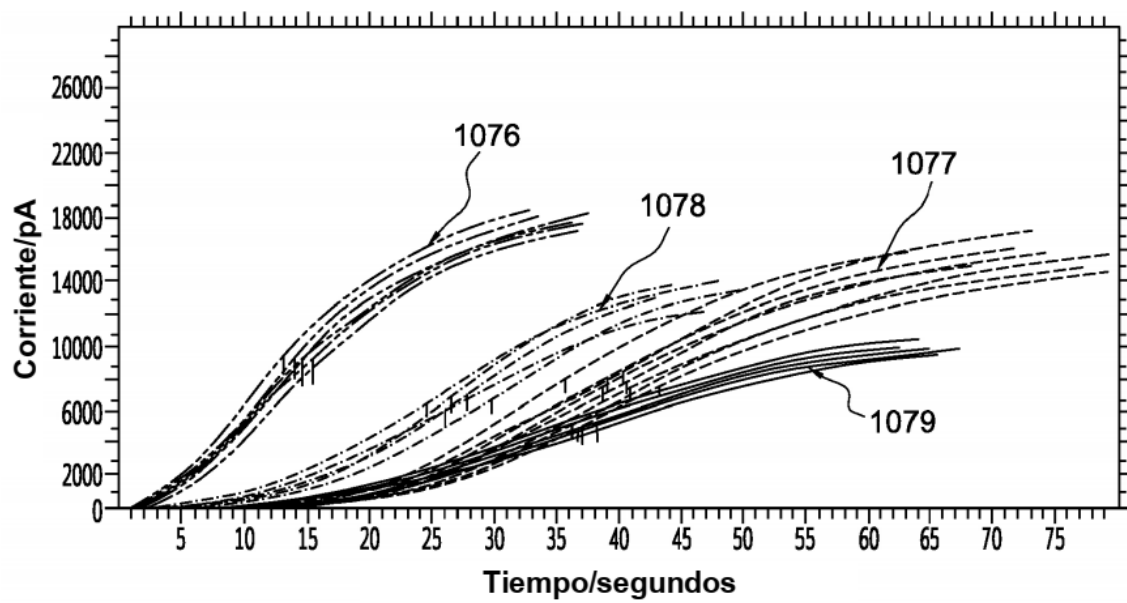


FIG. 41B

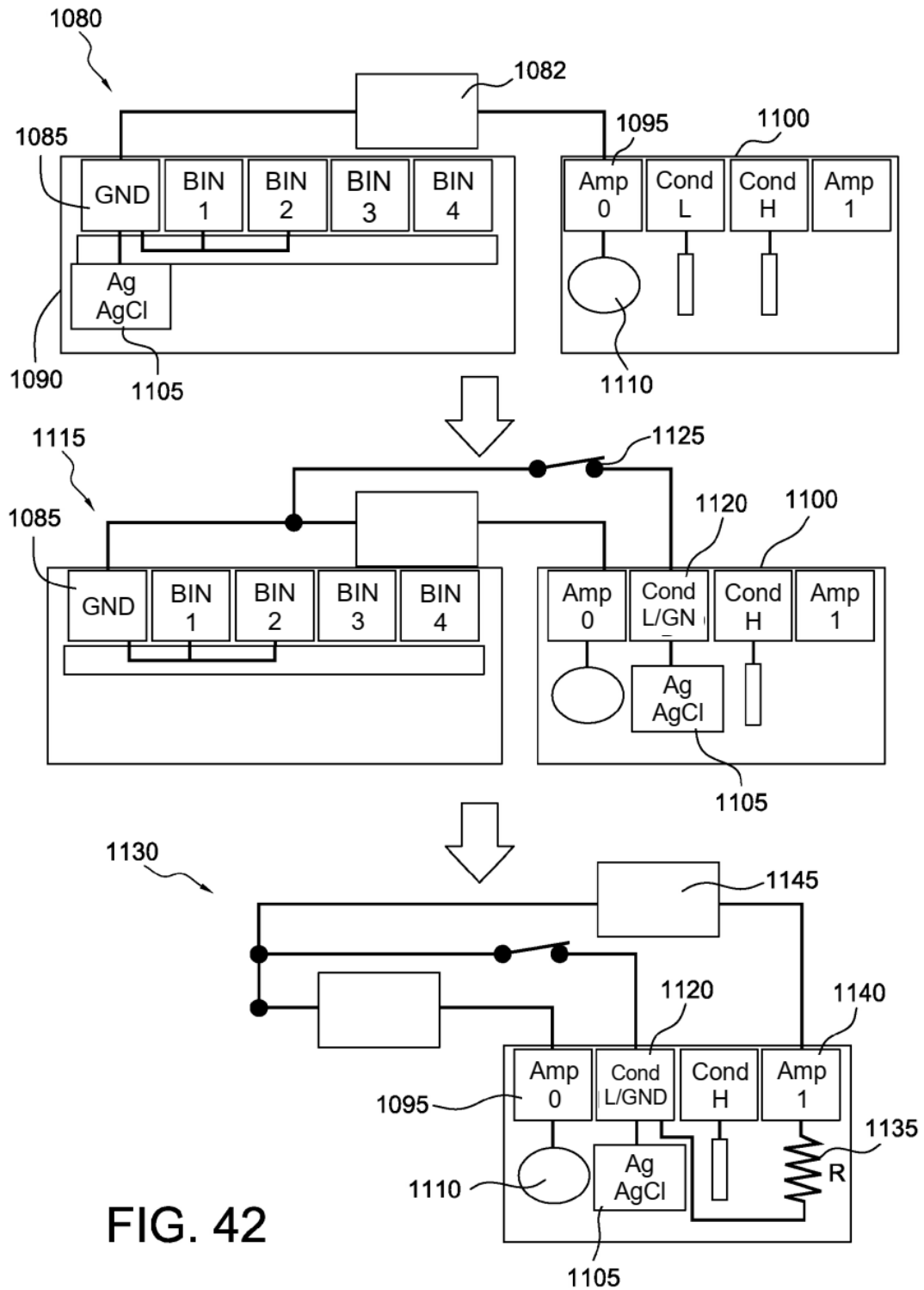


FIG. 42

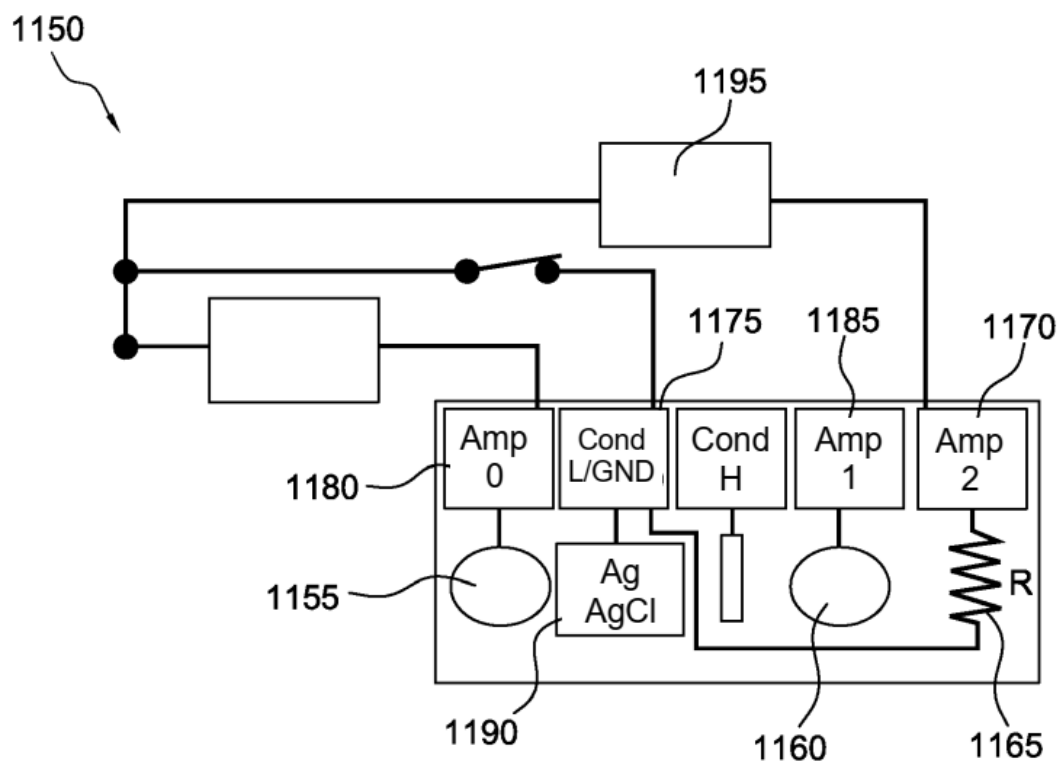


FIG. 43