

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.10.25	(73) Titular(es): UNIVERSAL BIOSENSORS, PTY. LTD. 1 CORPORATE AVENUE ROWVILLE, VIC 3178 AU
(30) Prioridade(s): 2007.10.26 US 983029 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.07.28	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.30 020/2016	(72) Inventor(es): ALASTAIR MCINDOE HODGES AU PETER MICHAEL NEWMAN AU
	(74) Mandatário: MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **APARELHO E PROCESSO DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO É DIRIGIDA A UM SENSOR COM ELÉCTRODOS OPOSTOS E TIRAS DE TESTE USANDO ESTE SENSOR. A INVENÇÃO PODE SER USADA PARA MEDIR COAGULAÇÃO DE SANGUE OU PLASMA EM ENSAIOS TAIS COMO O TEMPO DE PROTROMBINA (PT) E O POTENCIAL DE TROMBINA, POR EXEMPLO, NA MONITORIZAÇÃO DE PONTO DE CONTA, DE ANTICOAGULANTES.

DESCRIÇÃO

APARELHO E PROCESSO DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

Campo da Invenção

A presente invenção é dirigida a um sensor com eléctrodos opostos e tiras de teste usando este sensor. O invento pode ser usado para medir o sangue ou plasma de coagulação em ensaios tais como o tempo de protrombina (ET) e potencial de trombina, por exemplo, na monitorização ponto-de-conta, de anticoagulantes.

Antecedentes

Várias patentes discutem os dispositivos e métodos de detecção de substratos electroquímicos. Por exemplo, Jozefonvicz et al. (Patente US N ° 4.304.853) descreve o uso de substratos electroquímicos para detecção de proteases, incluindo os enzimas em um sistema de coagulação. Infelizmente, o seu método não é prático para dispositivos de ponto-de-cuidado. O ensinamento, tal como aqui utilizado, é útil para a conclusão de que é necessário o pré-condicionamento do(s) eléctrodo(s) para melhorar a reprodutibilidade porque as correntes medidas são muito baixas. O substrato requer DMSO para auxiliar a solubilidade em soluções aquosas. Ele também descreve um sistema de 3-eléctrodos com volumes de amostra e reagentes que são ordens de magnitude maior do que a necessária para testes de ponto-de-cuidados viáveis.

Ludin et al. (US 6.495.336) descreve substratos electroquímicos que podem ser utilizados para a detecção de trombina, normalmente, num ensaio de coagulação. O substrato provido por ele é uma melhoria em relação a de Jozefonvicz et al. porque parece que é solúvel em água.

Eles não divulgam como usar o substrato num dispositivo de ponto de cuidados.

Frenkel et al. (US 6.352.630) descreve a utilização de um substrato de trombina electroquímica, especificamente, como divulgado por Ludin et al. (2002), em que um dispositivo parece ser adequado para testes de ponto-de-cuidado. O ensinamento, tal como aqui utilizado, prevê que o substrato está a ser imobilizado sobre o eléctrodo de trabalho através da extremidade que é oposta ao grupo electroativo que é clivado. Esta exigência aumenta a complexidade e limita os materiais de eléctrodo, e processo de fabricação.

A imobilização do substrato sobre o eléctrodo de trabalho é importante e/ou essencial quando se utiliza os eléctrodos coplanares que são ensinados Frenkel et al. Isto é porque a distância relativamente grande entre os eléctrodos de trabalho e de balção proíbe qualquer difusão significativa de moléculas a partir de um eléctrodo para o outro.

Do mesmo modo, o ensinamento proporciona um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, que também pode ser um eléctrodo contador, e é desejado para configurações de eléctrodos coplanares porque o Ag/AgCl pode agir como uma fonte ou dreno de electrões. Um problema potencial deste dispositivo é que a quantidade relativamente pequena do produto electroactivo que é libertado, por exemplo, sob a forma reduzida, numa forma de realização, pode ser apenas detectada quando é oxidado. Isto pode resultar em correntes electroquímicas relativamente baixas.. Além disso, a preparação de um eléctrodo de Ag/AgCl aumenta o custo de fabrico de tais sensores.

Unkrig et al. (US 2003/0146113A1) também revelam a utilização de um substrato de trombina electroquímica que parece apropriado para dispositivos de ponto de cuidado. Tal como aqui utilizado, a referência descreve um sistema de 2-eléctrodo plano com um eléctrodo de trabalho de Pd e um eléctrodo de referência e o contador de Ag/AgCl combinada, a fim de para superar o sinal inerente baixo neste desenho de eléctrodo coplanares em certas formas de realização o ensinamento regenera o grupo electroactivo acoplando a sua detecção para a oxidação da glicose. Uma vantagem de certas formas de realização presentes é que os eléctrodos opostos podem regenerar as espécies detectadas automaticamente sem a necessidade para o acoplamento a uma outra reacção redox.

Opalsky et al. (EP 1.234.053 B1) também descrevem um sensor de coagulação que usa um substrato electroquímico. Em certas formas de realização, o ensinamento divulga um cartucho de complexo que tem, preferivelmente, uma bomba para mover a amostra no interior do cartucho para misturar a amostra mais reagente para além dos eléctrodos coplanares. Em contraste, em certas formas de realização aqui, os eléctrodos opostos permitem uma tira simples que não beneficiam de uma bomba como reagente pode passivamente difundir ao menor volume de amostra.

Eletrodos opostos aos biossensores são descritos por Hodges et al. (US 6.284.125 B1) para medir a concentração de uma espécie de oxirredução. Em particular, uma espécie de oxirredução gerados pela oxidação de glicose e a partir desta a concentração de glucose foi calculada. Um sensor de eléctrodo opostas pode consistir em:

(1) Eletrodos de trabalho e contra-eléctrodos (e, opcionalmente, um eléctrodo de referência em toda a

configuração), espaçados por uma distância predeterminada e;

(2) Os eletrodos de frente um para o outro enquanto estavam deitados em diferentes, mas aproximadamente planos paralelos e;

(3) Seleccionar o espaçamento entre o eléctrodo de trabalho e o contra-eléctrodo para que os produtos de reacção do contra-eléctrodo possam difundir-se para o eléctrodo de trabalho.

Eléctrodos opostos são revelados por Newman e Chatelier (PCT/IB2007/001990) para um sensor de coagulação, mas a descrição é limitada à utilização de (im)mobilidade da partícula magnética para detectar a coagulação e não faz qualquer ensinamento de substratos electroquímicos.

Ohara et al. (US 6.620.310 B1) descreve a detecção de uma alteração na viscosidade de uma amostra de coagulação através da detecção da diminuição da corrente de estado constante através de eléctrodos opostos. Mais uma vez a divulgação não se refere a um substrato eletroquímico, em vez disso a mudança na difusão de um par redox é detectado após a coagulação.

Hodges et al. (US 6.444.115) refere-se à medição do progresso de uma reacção química que gera um produto de reacção electroactivo que é subsequentemente detectado por um eléctrodo amperometricamente ou coulometricamente.

Nenhuma das técnicas anteriores descreve a utilização de eléctrodos opostos ao detectar um substrato electroquímico. Nem descrevem a descoberta inesperada de que quando se

utiliza eléctrodos opostos é preferível não para imobilizar o substrato electroquímico no eléctrodo de trabalho.

Sumário

Formas de realização da presente invenção estão dirigidas para um sensor oposto-eléctrodo com um eléctrodo activo, um contra-eléctrodo, um reagente seleccionado a partir de tromboplastina, e um substrato de trombina electroquímica, em que a tromboplastina é revestida sobre um dos eléctrodos e o substrato electroquímico de trombina é revestido sobre o outro eléctrodo, em que o sensor detecta a clivagem do substrato de trombina electroquímico. O substrato de trombina electroquímico pode ser revestido sobre o contra-eléctrodo. Estes sensores podem ser utilizados como parte de uma tira de teste para o teste de tempo de coagulação no sangue.

A invenção também se refere a uma tira de teste para a medição de sangue ou plasma do tempo de coagulação numa amostra, que compreende um sensor, tal como aqui definido.

A invenção também se refere a um método de medição do sangue ou de coagulação do plasma que compreende:

adição de uma amostra de sangue de um paciente para um sensor oposto-eléctrodo compreendendo um eléctrodo activo, um contra-eléctrodo, de tromboplastina, e um substrato de trombina electroquímica, caracterizada pelo facto de a tromboplastina é revestida sobre um dos eléctrodos e o substrato de trombina electroquímica é revestida sobre o outro eléctrodo, e que o sensor detecta a clivagem do substrato de trombina electroquímica; e

analisar a amostra usando o sensor para determinar o nível de clivagem para determinar pelo menos uma propriedade de coagulação de sangue ou plasma da amostra.

Outras formas de realização da invenção são dirigidas a métodos de utilização dos sensores e às tiras da presente invenção. Estes métodos podem ser praticados no ponto de atendimento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1 ilustra em vista explodida de uma tira electroquímica exemplificativa, de acordo com as presentes formas de realização, incluindo um eléctrodo de fundo (1), um separador isolante (2), um eléctrodo de topo (3), uma cobertura sobre um canal de enchimento (4), um preenchimento de canal (5) e uma câmara de reacção (6).

FIG. 2 ilustra um exemplo de uma tira electroquímico montada de acordo com as presentes formas de realização, incluindo um eléctrodo de fundo (1), um separador isolante (2), um eléctrodo de topo (3), uma cobertura sobre um canal de enchimento (4), um canal de enchimento (5) e uma câmara de reacção (6).

FIG. 3 ilustra um gráfico exemplificativo, de acordo com as presentes formas de realização; a figura demonstra uma melhor detecção de coágulos quando a trombina do substrato é revestida sobre o contra-eléctrodo; tempo, em segundos, é fornecido como abcissas, e a corrente é fornecida em microamperes como ordenada; o gráfico marcado "a" representa o substrato de trombina revestido em contra-eléctrodo (o cátodo, neste exemplo) e de tromboplastina revestidos de eléctrodo (o ânodo, neste exemplo) de trabalho; o gráfico marcado "b" representa o substrato

revestido em trombina eléctrodo (ânodo) e de tromboplastina revestidos de contra eléctrodo (cátodo) a trabalhar.

Descrição detalhada

Exemplos de aspectos da invenção são discutidos em detalhe abaixo. As referências a "um aspecto," "um aspecto," "aspecto exemplo," "vários aspectos," etc, podem indicar que o aspecto (s) do modo descrito na divulgação podem incluir uma característica particular, a estrutura, ou característica, mas não inclui necessariamente todos os aspectos do recurso especial, estrutura ou característica. Além disso, o uso repetido da frase "num aspecto," ou "em um aspecto exemplificativo," não se refere necessariamente ao mesmo aspecto, embora possam.

A presente invenção é dirigida a um sensor tendo eléctrodos opostos, isto é, um eletrodo de trabalho e um contra-eléctrodo, de tromboplastina, trombina e um substrato electroquímico. Em algumas formas de realização, o substrato electroquímico de trombina é um contra-eléctrodo. Como será descrito a seguir, estes sensores podem ser utilizados por adição de uma amostra ao sensor (opcionalmente numa tira de teste), onde uma protease cliva uma espécie de electroactivos fora do substrato. Esta espécie de electroactivos pode ser detectada por meio de reacções redox com os eléctrodos.

O sensor descrito pode ser utilizado numa ampla variedade de tecnologias de, por exemplo, em métodos de medição de coagulação do sangue ou plasma, utilizando ensaios tais como o tempo de protrombina (PT) e o potencial de trombina, particularmente no controlo de ponto-de-cuidado, de

anticoagulantes orais (por exemplo, coumadins como varfarina e femprocumona).

Tal como discutido mais abaixo, uma vantagem da presente invenção é que os eléctrodos opostos de certas formas de realização não é necessária a complexidade de um eléctrodo de verdadeira referência tal como um eléctrodo de Ag/AgCl. Em vez disso, nestes aspectos, a proximidade dos eléctrodos permite ciclos de uma espécie eletroativas. Isto é, uma molécula que tem sido reduzida no cátodo pode ser reoxidada no ânodo, o que resulta em uma maior corrente. Isso pode tornar possível usar dois eléctrodos semelhantes, tais como aqueles que são formados a partir de um material condutor inerte tal como carbono, Au, Pd, Pt-Ir, óxido de índio, índio misto/óxido de estanho, e/ou óxido de estanho, etc.

Os dispositivos e as tiras de teste da presente invenção tem um substrato de trombina electroquímica que pode ser seca sobre o contra-eléctrodo, em alguns aspectos. O substrato de trombina electroquímica pode ser clivada por uma enzima, por exemplo, uma protease. As proteases são uma classe de enzimas que clivam ligações peptídicas. Eles desempenham um papel essencial em muitos processos biológicos. Por exemplo, eles são envolvidos com a digestão dos alimentos, a replicação do HIV, a cascata de coagulação do sangue e da via do complemento.

Algumas proteases são específicas para uma sequência de péptido particular, enquanto outras são menos selectivas. Em ambos os casos, pode ser altamente desejável para detectar e/ou quantificar a actividade de protease como esta proporciona uma visão sobre o processo biológico. Como um especialista na técnica irá apreciar, qualquer protease

que ocorre naturalmente ou sinteticamente modificado ou outros enzima de clivagem podem ser detectadas ou de outra forma utilizados na presente invenção desde que o enzima seja capaz de reconhecer e clivar a ligação ou ligações desejadas sendo usadas no substrato da trombina electroquímica.

Um certo número de substratos peptídicos úteis estão comercialmente disponíveis para uma variedade de proteases. Tipicamente, uma protease cliva um corante fluorescente ou grupo destes substratos, resultando numa mudança de cor ou fluorescência. É também possível criar substratos com grupos electroactivos que podem ser detectados electroquimicamente após a clivagem. A sequência de aminoácidos de um substrato péptido determina a especificidade para uma protease. Assim, em alguns aspectos, a especificidade de um método de detecção da protease pode ser alterado através da selecção de um substrato específico para a protease de interesse.

Um sistema de detecção de protease exemplar que aspectos da presente divulgação podem detectar é a cascata de coagulação do sangue. A cascata de coagulação do sangue é composta por uma série de reacções de protease e serve como um sistema modelo, com aplicações práticas, para investigar a detecção de proteases. O tempo necessário para uma amostra de sangue ou de plasma para coagular pode ser indicativos de vários estados de doença e útil para monitorizar a terapia de anticoagulação. A especificidade de tais testes de coagulação geralmente não vem da forma como a coagulação é detectada, mas a partir da natureza do reagente utilizado (s) para iniciar a coagulação. Assim, os presentes aspectos são aplicáveis a uma ampla gama de ensaios de coagulação.

Por exemplo, uma área de utilização para a presente descrição é o método de monitorização de anticoagulação antagonistas da vitamina K orais tais como a varfarina e fenprocoumon no ponto de cuidado. Estes fenómenos geralmente são monitorados usando um teste de tempo de protrombina e os resultados são relatados como uma relação normalizada internacional (INR). Há uma tendência para a realização destes ensaios, utilizando dispositivos de ponto de cuidado que proporcionam um resultado dentro de um par de minutos, utilizando sangue derivado de uma simples punção digital. Esta abordagem é geralmente mais conveniente do que a tradicional punção e preparação de plasma venoso mas estes dispositivos requerem um método para a detecção de coagulação no sangue total. Os presentes aspectos melhoram as técnicas que abordam esta questão.

A coagulação do plasma pode ser detectada num certo número de maneiras. Por exemplo, a gelificação da amostra pode ser detectada por um aumento da resistência ao movimento de partículas (tipicamente magnético) através da amostra, ou através de uma alteração da fluidez da amostra. O ponto de gel pode também corresponder ao aumento da turbidez de plasma, que pode ser detectada opticamente. Métodos electroquímicos podem ser usados para detectar alterações na viscosidade de uma amostra medindo as alterações na impedância, por exemplo, como os encontrados nas Patentes US Nos 6.673.622; 6.066.504; e 6.060.323; 6.046.051.

A coagulação pode ser indirectamente detectada utilizando substratos peptídicos artificiais para trombina de acordo com os aspectos. Por exemplo, os substratos cromogénicos podem ser clivados pela trombina (ou outras enzimas de coagulação) e um grupo de corante pode ser libertado. Isto

produz uma mudança de cor detectável em solução. Outros substratos podem ser proporcionados onde o grupo clivado é electroquimicamente activo (pode ser oxidado e/ou reduzido a um eléctrodo) e pode ser detectado em um sensor electroquímico. Este tipo de substrato é referido como um substrato electroquímico e é aqui o objecto de determinados aspectos.

Para os fins da presente aspectos de um substrato electroquímico foi definido, como um composto químico que é clivado por uma enzima para libertar um grupo de saída electroactivo. O substrato intacto tem pouca, ou diferente, actividade electroquímica, sob as condições de detecção, em comparação com o grupo de saída livre, que é libertado por clivagem.

Uma espécie de electroactivos pode ser detectado amperometricamente em formas de realização da presente invenção, por exemplo, usando quer um sistema de dois ou três eléctrodos. Um sistema de três eléctrodos pode ter um trabalho, um contador e um eletrodo de referência. O eléctrodo de referência mede a tensão da solução perto da superfície do eléctrodo de trabalho. O potencial entre o eléctrodo de trabalho e do contador pode ser ajustado de modo a que a tensão entre o eléctrodo de trabalho e de referência seja ajustado para o valor desejado. A grandeza da corrente através do circuito de ligação do eléctrodo de trabalho e do contador é determinada pela taxa de redução ou oxidação na interface da solução do eléctrodo de trabalho. Assim, é o eléctrodo de trabalho em que a reacção tem lugar de interesse. O sistema está concebido de modo a que a reacção no eléctrodo de trabalho e o contra-eléctrodo não limita a corrente.

Em um aspecto, um sistema de dois eléctrodos não tem um eléctrodo de referência separado. Em vez disso, a tensão entre os condutores dos dois restantes eléctrodos pode ser ajustada. O eléctrodo de trabalho pode novamente ser definido como o eléctrodo em que a reacção tem lugar de interesse. Este será o eléctrodo em que a reacção de limitação de corrente ocorre.

Os inventores descobriram surpreendentemente que os sensores electroquímicos tendo eléctrodos opostos podem ter um número de vantagens sobre os que usam eléctrodos co-planares, incluindo, mas não se limitando ao seguinte:

(1) Pequenas espécies electroactivos podem facilmente difundir a partir de um eléctrodo para o outro oposto. Isto pode resultar em uma reciclagem das formas reduzida e oxidada, de forma eficaz a amplificar o sinal. Isto não é possível em eléctrodos co-planares como as distâncias são demasiado grandes para espécies para difundir a distância necessária para o eléctrodo de trabalho no tempo disponível.

(2) Tal como um perito na arte irá apreciar, qualquer reacção redox deve ter uma oxidação e um componente de redução. Em sensores de eléctrodos opostos as espécies electroactivas de interesse podem ser oxidados a um eléctrodo e reduzido na outra na reciclagem acima mencionado. Em sensores de eléctrodos co-planares, é necessário um esforço suplementar para garantir que a reacção no eléctrodo contador pode ocorrer. Por exemplo, o contra-eléctrodo pode ser de Ag/AgCl, ou uma grande tensão pode ser aplicada, ou uma espécie de electroactivos complementares pode não ser necessária.

(3) A proximidade dos eléctrodos opostos um ao outro significa que a maior parte da diferença de potencial entre os eléctrodos é contabilizada pela tensão entre as

interfaces de eléctrodos e não em todo o volume da solução. Em contraste, os eléctrodos co-planares podem ter uma considerável queda de tensão através da amostra IxR, particularmente se a solução entre os eléctrodos tem uma força iónica baixa numa forma de realização.

(4) Fabricação de eléctrodos opostos pode ser mais fácil do que a co-planar, porque para formar eléctrodos co-planares pode ser necessário qualquer depósito ou ablação do metal (ou outro material condutor) para criar eléctrodos distintos que estão electricamente isolados uns dos outros. Em contraste, pode ser vantajoso ter uma superfície condutora, cobrindo todo o material que forma cada eléctrodo oposto. Isto significa, por exemplo, que um processo simples, como revestimento por pulverização pode ser utilizada para revestir os eléctrodos e os padrões específicos no condutor não são necessários. A área de eléctrodo oposto que contacta a amostra pode ser definido pelo espaçador isolante que separa os eléctrodos.

(5) Usando eléctrodos opostos pode evitar o requisito em certas concretizações de Frenkel et al. (US 6.352.630; 2002) sendo necessária a imobilização de um substrato eletroquímico em uma orientação específica. Em sensores de eléctrodos opostos do substrato electroquímico pode ser livre para se dissolver na amostra e a sua orientação é irrelevante. Isso simplifica o processo de fabrico.

Um ou mais aspectos estão relacionados a um dispositivo, na configuração de uma faixa, que mede a actividade de protease. Por exemplo, para monitorizar a coagulação do sangue. A tira conecta eletricamente a um medidor que aplica uma tensão ou corrente pré-determinado à tira e mede a tensão atual ou resultante. Como um especialista na técnica irá apreciar, estes métodos são conhecidos, por exemplo, como amperornetria ou técnicas galvanostático

respectivamente. O medidor também pode regular termicamente a tira, calcular, gravar, exibir e/ou transmitir o resultado da reacção.

Uma tira exemplar, mostrada nas FIGS. 1 e 2, pode compreender dois eléctrodos, 1 e 3, em uma configuração oposta. Os eléctrodos podem ser electricamente isolados um do outro, por um separador de plástico, 2, ou o seu equivalente. Em alguns aspectos os eléctrodos podem ser inferiores a 0,5 mm de distância e, em certas formas de realização entre 0,05 e 0,15 milímetros de distância.

O separador, 2, pode ter uma abertura em que uma cavidade se forma entre os eléctrodos e define uma câmara de reacção, 6. As superfícies dos eléctrodos são electricamente condutores e em contacto eléctrico com o medidor.

Em certos aspectos, as superfícies são revestidas por pulverização catódica sobre um suporte de plástico. Os revestimentos adequados podem ser conhecidos dos peritos na arte e pode incluir platina, de índio, de carbono, índio misto/óxido de estanho, óxido de estanho e de preferência, mas paládio ou ouro.

As superfícies de cada um dos eléctrodos pode ser o mesmo ou diferente. As superfícies condutoras enfrentam-se um ao outro. Um canal de enchimento, 5, pode permitir que uma amostra seja introduzida na câmara de reacção enquanto a câmara de reacção pode ser mantida a uma temperatura dentro do conjunto medidor.

Em certos aspectos, o substrato de trombina electroquímica não é revestida sobre o eléctrodo de trabalho. Após a

adição da amostra (por exemplo, sangue), a clivagem do substrato de trombina liberta uma espécie de electroactivos e uma mudança detectável na actividade electroquímica ter lugar.

Em certos aspectos, a tira revelada consiste em dois eléctrodos que têm uma configuração oposta. Os eléctrodos de descarga eléctrica podem compreender paládio revestido sobre um suporte de plástico. Uma camada separadora isolante, 0,1 mm de espessura, pode definir a separação entre os eléctrodos. Uma ou mais aberturas no separador pode definir a câmara (s) de reacção. Um canal de enchimento pode permitir que a amostra seja conduzida para dentro da câmara (s) de reacção por acção capilar.

O reagente contém tromboplastina, necessária para um teste do tempo de protrombina.

O reagente contém tromboplastina diluda, necessária para um teste de produção de trombina a partir do qual os parâmetros como tempo de retardamento, o pico de trombina e potencial de trombina endógena podem ser derivados.

Em alguns aspectos é vantajoso para o revestimento de um ou mais eléctrodos com um composto electroactivo assegurar que o eléctrodo contador não limite a corrente. Por exemplo, se o cátodo é o eléctrodo contador, em seguida, revestindo-o com ferro (III) EDTA proporciona um composto redutível para apoiar a detecção (nesta forma de realização, por oxidação) das espécies de interesse. Isto pode ser particularmente vantajoso se a espécie de interesse não é completamente reversível electroquimicamente.

Verificou-se ser vantajoso secar a tromboplastina e o substrato de trombina electroquímica dos eléctrodos opostos a fim de evitar reacções adversas entre os dois reagentes. Numa forma de realização exemplar, o substrato de trombina electroquímica (Toluolsulfonyl-glicil-arginina-prolinil-4-amido-2-clorofenol) pode ser revestida sobre o contra-eléctrodo e de tromboplastina pode ser revestida sobre o eléctrodo de trabalho. Neste exemplo, o grupo de saída do substrato de trombina é clivado sob a forma reduzida. Aqui, é a espécie que está a ser detectado e limita a corrente. Uma vez que o grupo de saída está na forma reduzida que pode ser oxidado no ânodo para passar a corrente, e assim o ânodo é o eléctrodo de trabalho.

De um modo geral, seria de esperar que o revestimento do substrato de trombina sobre o eléctrodo de trabalho iria produzir uma detecção mais rápida de coágulos porque o grupo de saída é libertado no eléctrodo onde é detectado. No entanto, em algumas formas de realização, o oposto é verdadeiro. Por exemplo, a FIG. 3 mostra que a cinética da reacção foi mais rápida quando o substrato de trombina foi seco sobre o contra eléctrodo (cátodo), em vez de o eléctrodo de trabalho (ânodo). A taxa de reacção mais rápida destas formas de realização pode fazer a determinação do tempo de coagulação mais consistente.

Muitos ensaios biológicos (por exemplo, ensaios de geração de trombina) envolvem o cálculo das taxas de reacção. Em certas formas de realização, observa-se que ele pode ser mais fácil de medir a cinética da reacção de uma espécie de electroactivos quimicamente gerados quando a espécie for difundida para o eléctrodo de trabalho em vez de ser gerada no eléctrodo de trabalho. Ver, por exemplo, Patentes dos EUA Nos. 5.942.102 e 6.444.115. Esta é uma outra razão pela

qual, em certas formas de realização, pode ser preferível para revestir substratos de trombina electroquímicos de distância a partir do eléctrodo de trabalho.

Em outro aspecto, o substrato de trombina electroquímica e de tromboplastina são formuladas de modo a não interagir de forma adversa, o que pode permitir que todos os reagentes ou os componentes a sejam revestidos em conjunto com o contra-eléctrodo. Isto tem uma vantagem de deixar o eléctrodo de trabalho livre de qualquer reagente que pode suja-lo. A incrustação sobre o eléctrodo contador é uma preocupação menor porque o eléctrodo que não limita a corrente. Incrustações do eléctrodo de trabalho não podem ser imediatamente aparentes e frequentemente só se tornam visíveis após o armazenamento, onde pode ser uma causa de vida útil encurtada para um produto que concretiza o presente invento. Assim, o revestimento sobre o contra-eléctrodo pode evitar o risco de sujar o eléctrodo de trabalho.

As tiras de teste da presente invenção podem também incluir meios para verificar a tira e/ou a integridade da amostra. Num aspecto, a tira tem uma câmara de reacção contendo os reagentes que funcionam de modo a verificar a tira e/ou a integridade da amostra. Os reagentes podem incluir factores de coagulação que são de outro modo deficientes na amostra. Esta câmara de reacção pode produzir um tempo de coagulação que é aproximadamente normal, independentemente do grau de deficiência na amostra, e ser usado para demonstrar a integridade da tira quando o tempo de coagulação cai dentro dos limites predeterminados.

Em outros aspectos a integridade da tira pode ser verificada por inclusão de um composto electroactivo no

reagente. Um tal composto pode ser diferente do substrato de trombina electroquímico, que podem, talvez, apenas libertar um grupo de electroactivo na clivagem enzimática. O composto que monitoriza a integridade da tira pode alterar (aumentar ou diminuir) a actividade electroquímica sob as condições de armazenagem (por exemplo, temperatura ou humidade elevadas) que podem danificar os outros componentes da tira. Exemplos de tais compostos podem incluir 4-amino-2-clorofenol, ferricianeto, ferrocianeto, e os compostos N-óxido ou nitroso orgânicos revelados na Pedido de Patente US No. US 2005/0123441. A actividade electroquímica de tais compostos pode ser comparada a um limite pré-determinado para o lote de tiras. Se o valor estiver fora dos limites, então o contador pode dar uma mensagem de erro em vez de um resultado.

Os reagentes para monitorizar a integridade tira podem estar na mesma câmara de reacção que detecta clivagem do substrato ou podem estar em diferentes câmaras. No aspecto em que as câmaras estão separadas então as câmaras podem depois ser isoladas electricamente pela descontinuidade dos eléctrodos ou, num aspecto alternativo, as câmaras podem utilizar eléctrodos electricamente ligados entre si. Quando as câmaras de partilhar um eléctrodo contínuo, o sinal detectado pelo medidor pode ser uma combinação das câmaras. A interferência entre os sinais de reacção de clivagem e de integridade podem ser minimizados através da detecção da reacção de integridade antes ou após a reacção de clivagem e/ou através da redução da área de eléctrodo de reacção cruzada.

Alguns aspecto da presente são direccionados para um controlo interno adequadop para monitorizar a viabilidade das tiras biossensoras electroquímicos, tais como, mas não

se limitando às aqui divulgadas. Materiais de eléctrodo, e o revestimento em cima delas, são escolhidos de tal modo que uma diferença de potencial é estabelecida entre os eléctrodos. Esta tensão pode ser medida directamente ou a corrente que induz é medida. Em alguns aspectos, o sensor comporta brevemente como uma bateria, gerando custos adicionais. A diferença de potencial quebra depois de um tempo relativamente curto e não interfere com a reacção de ensaio subsequente.

Tais controlos são úteis em, por exemplo, testes de ponto de cuidados, com base em um medidor que mede uma reacção electroquímica em uma tira descartável, que está se tornando mais comum. Há uma necessidade de assegurar que os controlos de resultados dos testes são precisos de modo a garantir que a integridade da tira é a desejável. Para os utilizadores finais, como por exemplo, um paciente, o controlo mais conveniente é que a tira é "interna" e verifica a integridade da mesma faixa que está a ser testada. Exemplos de controlos de bordo podem ser encontrados na área de dispositivos de coagulação de ponto de atendimento já existentes no mercado (por exemplo, Coaguchek XS, INRatio). Além disso, US2005123441 A1 fornece uma introdução concisa para as vantagens de um controle interno.

Os biossensores eletroquímicos geralmente tornam-se mais complicados o mais isolado da reacção de controlo é a partir da reacção de teste. Por exemplo, a fim de aumentar a complexidade:

a. Uma faixa com uma câmara de reacção única que inclua tanto a reacção de controlo como a reacção teste é relativamente fácil de fabricar.

b. Uma faixa com câmaras de controlo e de teste que estão separadas, mas eletricamente conectadas é mais complicada, pois requer a deposição de vários reagentes em diferentes áreas.

c. Uma faixa com câmaras de controlo e de teste que não são apenas distintas, mas também isoladas eletricamente pode ser bastante desafiador para fabricar em escala de modo económico. Ele geralmente requer a deposição ou ablação de material de eletrodo em um padrão.

No entanto, a dificuldade em encontrar a da reacção química de controlo adequado é na ordem inversa à apresentada acima.

a. Uma faixa com as câmaras, de controle e teste separados e isolados eletricamente não terá quaisquer problemas com uma reacção (por exemplo, controlo) e interferir com o outro (por exemplo, teste).

b. Uma tira separada com, mas electricamente ligada, a câmaras de controlo e de teste pode sofrer de interferência eléctrica entre as câmaras de electrões como na reacção são indistinguíveis dos electrões a partir da outra, mas o controlo e o teste não irá interferir com o outro quimicamente.

c. Uma tira com uma câmara de reacção única requer componentes que não interfiram um com o outro quimicamente ou causem interferências de sinais eléctricos.

É ainda descrito um novo modo de avaliar uma reacção de controlo em um sensor electroquímico, assim como uma maneira de evitar que os sinais eléctricos a partir da reacção de controlo e de teste de reacção de interferir uns com os outros.

US200512344 A1 revela uma reacção de controle interno que utiliza compostos N-óxido nitroso ou que se tornam reduzidas após a exposição a condições que possam danificar o desempenho da tira. A mudança de controle interno pode ser detectado opticamente ou eletroquimicamente. O método de detecção electroquímica divulgado em US2005123441 A1 envolve aplicando -700mV, em relação a Ag/AgCl, através do eléctrodo de trabalho e, em seguida, aplicar -100mV.

A presente invenção pode ser vantajoso porque os controles da invenção requerem apenas 1-2 segundos em vez de 4.5 sec para alguns dispositivos anteriores. Nosso controle não arrisca tensão aplicada interferir com o teste.

Descreve-se um controlo a bordo para monitorar a viabilidade de sensores electroquímicos que detectam a coagulação do sangue. O reagente de reacção de controlo, que mede a viabilidade tira, está contida dentro da mesma câmara de reacção como os reagentes de teste, que medem o tempo de coagulação. O sinal a partir da reacção de controlo é diferenciada do que o teste de pelo tempo em que ocorrem. Especificamente, a reacção de controlo é avaliada nos primeiros poucos segundos após a adição da amostra e, em seguida, a reacção de teste é avaliada.

A reacção de controlo pode ser criada por revestimento, sobre um eléctrodo, o reagente que contém uma baixo (por exemplo, 0,5 mM) concentração de ferricianeto e por outro reagente eléctrodo sem ferricianeto. A diferença no eléctrodo química cria uma tensão através dos eléctrodos, quando a amostra é adicionada. Esta tensão pode ser medida directamente com um voltímetro ou a corrente através de um circuito externo pode ser gravado por um amperímetro.

A tensão electroquímica pode dissipar-se por, pelo menos, dois métodos: corrente que flui através de um circuito externo achata eficazmente a electroquímica da bateria e de difusão de ferricianeto de um eléctrodo para o outro diminui o gradiente de concentração e, portanto, o ferricianeto de tensão. Uma vez que o sinal de controlo a partir da reacção se dissipa, em seguida, a análise da reacção de teste pode começar. Isto pode, por exemplo, consistir em aplicar 0.3-0.4V através dos eléctrodos e medir a corrente resultante amperometricamente.

A concentração do ferricianeto é suficientemente baixo para que não interfira substancialmente com a detecção da reacção de teste. Como um especialista na técnica irá apreciar, contudo, a utilização de alternativas ao do ferricianeto podem ser produzidos. Por exemplo, o iodo, o ascorbato, o ferrocianeto, 4-amino-2-clorofenol podem produzir um efeito de bateria.

O efeito da bateria é medido por medição da corrente sem qualquer tensão externa a ser aplicada através dos eléctrodos do sensor. No entanto, é possível medir a corrente com uma pequena tensão aplicada, desde que a tensão não provocar interferência substancial com a reacção de ensaio.

Os sensores podem conter duas câmaras. Uma câmara pode conter os reagentes de teste de reacção e outros reagentes de controle de reacção. Esta abordagem é vantajosa se os componentes de uma reacção (por exemplo, a reacção de controlo) podem inibir quimicamente os outros (por exemplo, a reacção de ensaio). As câmaras não precisam ser eletricamente isoladas desde que a reacção de teste e

controle não interferam uns com os outros eletricamente. Este aspecto é particularmente vantajoso se um agente de neutralização estiver incluído na câmara de reacção de controlo (por exemplo, um eléctrodo oposto).

Em alternativa, as concentrações de reagente de controlo-de reacção que normalmente interfem com a reacção de ensaio podem ser utilizados. Neste aspecto, a câmara de controlo contém áreas separadas de reagente de controlo e um agente neutralizante. Quando a amostra é adicionada o reagente de controle produz um efeito de bateria ou algum outro sinal electroquímico, mas depois é rapidamente neutralizada por o agente de neutralização. O efeito de neutralização pode ser efectuado por uma reacção química (por exemplo, iodo e ascorbato e neutralizar o outro) ou mais de um efeito físico, tal como a precipitação (por exemplo, Co^{2+} ou Mn^{2+} precipitar iões ferricianeto). Precipitação de um composto eletroativo pode torná-lo incapaz de interagir com um eletrodo.

Em um aspecto que mede a coagulação de sangue ou plasma, um medidor pode manter o sensor a 37° C. O sinal eléctrico detectado pelo medidor pode ser interpretado para calcular o tempo de coagulação. Por exemplo, o tempo de coagulação pode ser definido como o ponto onde o sinal, ou a taxa de variação do mesmo, atinge um limiar. O tempo de coagulação pode ser relatado, exibido, ou de outro modo transmitido com as unidades de tempo, ou que podem ser convertidos em unidades diferentes, como INR usando dados de calibração atribuídas ao sensor e/ou o medidor.

Outros resultados também podem ser calculados e comunicados. Por exemplo, com os reagentes à direita, a área sob a curva pode indicar o potencial endógeno de

trombina, que pode igualmente ser relatado. O resultado do ensaio pode ser comunicado pelo que são visualizadas no ecrã do medidor mas também pode ser armazenada na memória e/ou transmitido a outro aparelho.

Também são divulgados conjuntos que têm uma faixa de sensor ou de teste aqui descrito. Tais conjuntos podem ser embalados de modo estéril. As tiras de teste ou de sensores pode vir em embalagens individuais, bem como embalagens múltiplas. Opcionalmente, os conjuntos incluem um medidor para interagir com as tiras de teste ou do sensor e/ou instruções para a utilização do conjunto, tira de teste, ou do sensor.

REIVINDICAÇÕES

1. Um sensor oposto-eléctrodo compreendendo um eléctrodo activo, um contra-eléctrodo, de tromboplastina, e um substrato de trombina electroquímica, em que a tromboplastina é revestida sobre um dos eléctrodos e o substrato de trombina electroquímica é revestida sobre o outro eléctrodo, em que o sensor detecta a clivagem de o substrato de trombina electroquímica.
2. O sensor de acordo com a reivindicação 1, em que o substrato de trombina electroquímica não é imobilizado sobre o eléctrodo de trabalho.
3. O sensor de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o substrato de trombina electroquímico compreender um péptido ligado a um grupo de saída, em que o grupo de saída torna-se uma vez electroactivo clivada pela trombina.
4. O sensor de qualquer uma das reivindicações 1-3, compreendendo ainda um medidor ligado ao sensor, em que o medidor de tempo de coagulação determina um para uma amostra.
5. O sensor de acordo com a reivindicação 4, em que no medidor é exibido um resultado ou resultados que compreende o tempo de coagulação ou um resultado ou valor dependente do tempo de coagulação.
6. O sensor de qualquer uma das reivindicações anteriores, que compreende ainda um medidor ligado ao sensor, em que o medidor é exibido ou produz um resultado que compreende um parâmetro de geração de trombina na amostra.

7. Uma tira de teste para a medição de sangue ou plasma do tempo de coagulação numa amostra, que compreende um sensor de qualquer uma das reivindicações 1-6.

8. A tira de teste de acordo com a reivindicação 7, que compreende ainda um meio para verificar a integridade da tira.

9. Um método de medição da coagulação do sangue ou de plasma compreendendo:

adição de uma amostra de sangue de um paciente para um sensor oposto-eléctrodo compreendendo um eléctrodo activo, um contra-eléctrodo, de tromboplastina, e um substrato de trombina electroquímica, caracterizada pelo facto de a tromboplastina ser revestida sobre um dos eléctrodos e o substrato de trombina electroquímica ser revestida sobre o outro eléctrodo, e que o sensor detecta a clivagem do substrato de trombina electroquímica; e

analisa a amostra usando o sensor para determinar o nível de clivagem para determinar pelo menos uma propriedade de sangue ou plasma de coagulação da amostra.

10. O método da reivindicação 9, em que o método é realizado no momento do tratamento.

11. O método da reivindicação 9 ou reivindicação 10, em que o método compreende ainda um medidor ligado ao sensor, em que o medidor é exibido ou produz um resultado que compreende um parâmetro de geração de trombina na amostra.

12. O método de qualquer uma das reivindicações 9-11, em que o paciente está a tomar um medicamento anticoagulante.

13. O método da reivindicação 12, em que o medicamento é um anticoagulante antagonista de vitamina K.

14. O método de qualquer uma das reivindicações 9-13, em que a amostra colhida a partir do paciente por uma picada no dedo do paciente.

RESUMO

APARELHO E PROCESSO DE DETEÇÃO ELETROQUÍMICA

A presente invenção é dirigida a um sensor com eléctrodos opostos e tiras de teste usando este sensor. A invenção pode ser usada para medir coagulação de sangue ou plasma em ensaios tais como o tempo de protrombina (PT) e o potencial de trombina, por exemplo, na monitorização de ponto de conta, de anticoagulantes.

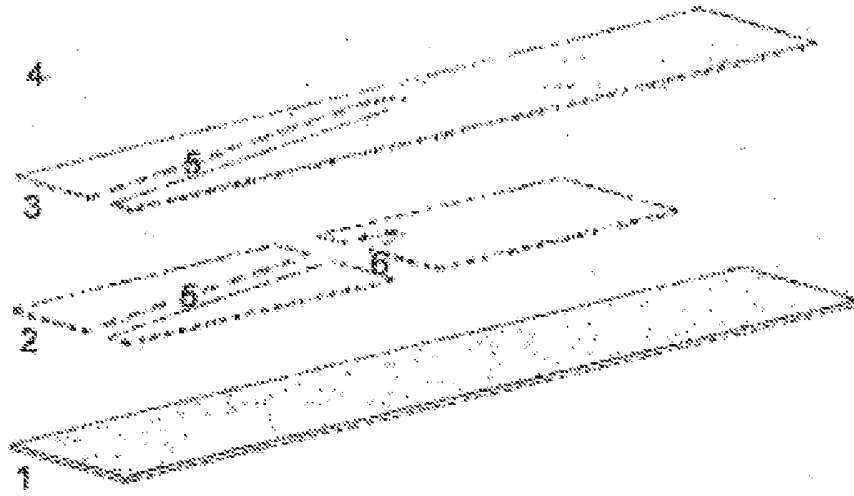


Figura 1

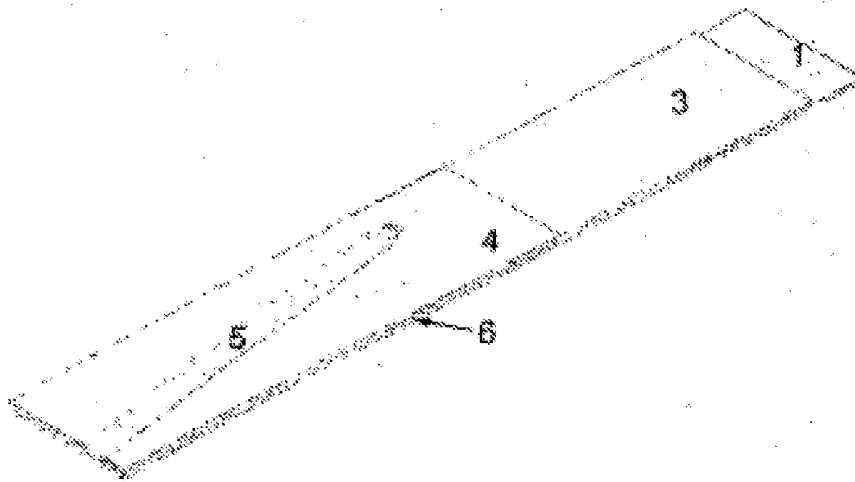


Figura 2

Revestimento de substrato de trombina sobre o eletrodo em funcionamento impede a detecção de trombina

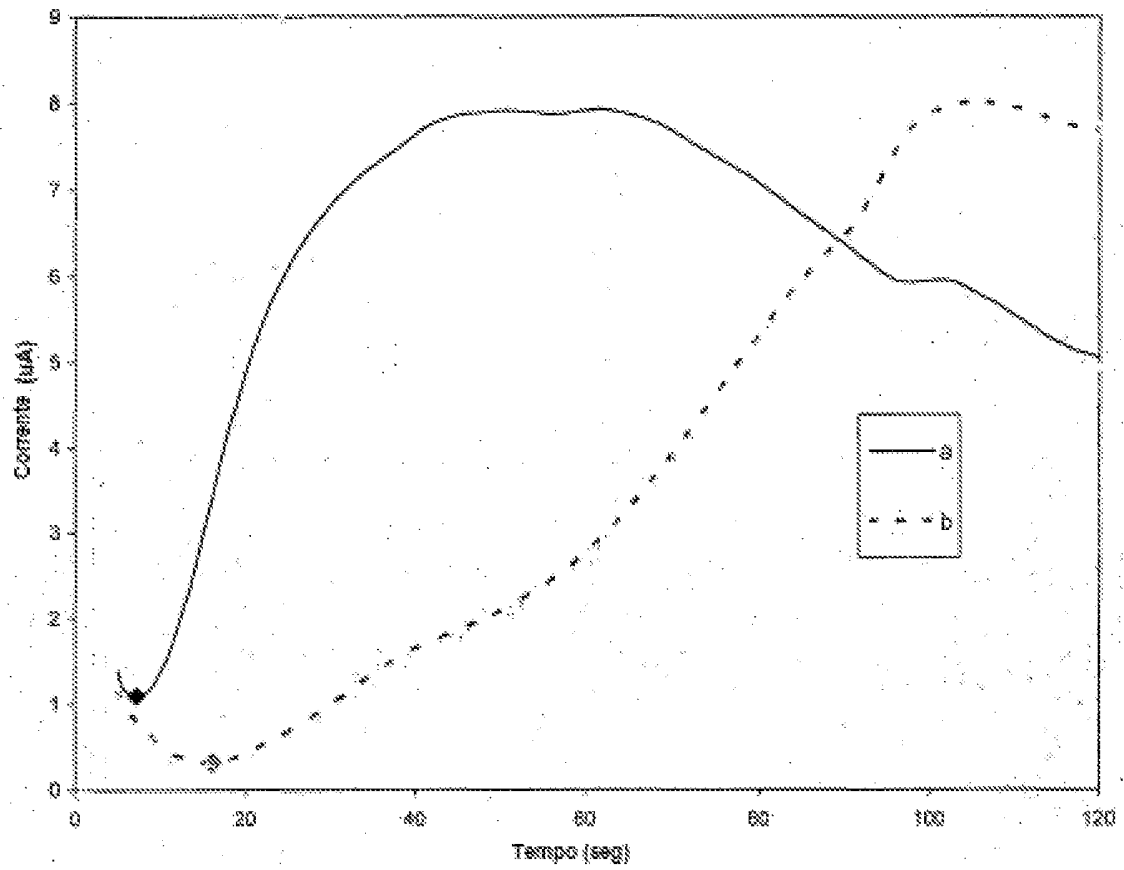


Figura 3