

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 933**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2008** **E 08842920 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015** **EP 2210085**

54 Título: **Procedimiento y aparato para la detección electroquímica**

30 Prioridad:

26.10.2007 US 983029 P

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

29.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSAL BIOSENSORS, PTY. LTD. (100.0%)
1 CORPORATE AVENUE
ROWVILLE, VIC 3178, AU**

72 Inventor/es:

**NEWMAN, PETER MICHAEL y
HODGES, ALASTAIR M.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 557 933 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y aparato para la detección electroquímica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un detector con electrodos opuestos y tiras de ensayo que usan este detector. La invención puede ser usada para medir la coagulación de sangre o plasma en ensayos tales como el de tiempo de protrombina (TP) y el del potencial de trombina, por ejemplo, en la supervisión de anticoagulantes en un centro de atención.

Antecedentes

10 Varias patentes describen dispositivos y procedimientos para detectar sustratos electroquímicos. Por ejemplo, Jozefonvicz et al. (Patente US N° 4.304.853) describe el uso de sustratos electroquímicos para detectar proteasas, incluyendo las enzimas en un sistema de coagulación. Desafortunadamente, su procedimiento no es práctico para dispositivos usados en centros de atención. La enseñanza, tal como se usa en la presente memoria, es útil para descubrir que el pre-acondicionamiento del electrodo o los electrodos es necesario para mejorar la reproductividad debido a que las corrientes medidas son muy bajas. El sustrato requiere DMSO para ayudar a la solubilidad en soluciones acuosas.
15 Describe también un sistema de 3 electrodos con volúmenes de muestra y reactivos que son órdenes de magnitud mayores que los requeridos para ensayos viables en centros de atención.

Ludin et al. (US 6.495.336) describe sustratos electroquímicas que pueden ser usados para la detección de trombina, típicamente en un análisis de coagulación. El sustrato proporcionado en la misma es una mejora con respecto al del de Jozefonvicz et al., ya que aparentemente es soluble en agua. No se indica cómo usar el sustrato en un dispositivo para
20 centros de atención.

Frenkel et al. (US 6.352.630) describe el uso de un sustrato electroquímico de trombina, específicamente tal como se describe en Ludin et al. (2002), en un dispositivo que parece ser adecuado para ensayos en centros de atención. La enseñanza, tal como se usa en la presente memoria, indica que el sustrato debe ser inmovilizado sobre el electrodo de trabajo por el extremo que es opuesto al grupo electroactivo que es escindido. Este requerimiento añade complejidad y
25 limita los materiales del electrodo y el procedimiento de fabricación.

La inmovilización del sustrato sobre el electrodo de trabajo es importante y/o esencial cuando se usan los electrodos coplanares descritos por Frenkel et al. Esto es debido a que la distancia relativamente grande entre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos prohíbe cualquier difusión significativa de moléculas desde un electrodo al otro.

30 De manera similar, la enseñanza proporciona un electrodo de referencia de Ag/AgCl, que puede ser también un contraelectrodo, y es deseable para las configuraciones de electrodos coplanares debido a que el Ag/AgCl puede actuar como un sumidero o una fuente de electrones. Un problema potencial de este dispositivo es que la cantidad relativamente pequeña de producto electroactivo que es liberada, por ejemplo en forma reducida, en una realización, puede ser detectada solamente cuando es oxidada. Esto puede resultar en corrientes electroquímicas relativamente bajas. Además, la preparación de un electrodo de Ag/AgCl se suma al gasto de fabricación de dichos detectores.

35 Unkrig et al. (US 2003/0146113A1) describe también el uso de un sustrato electroquímico de trombina que parece adecuado para dispositivos para centros de atención. Tal como se usa en la presente memoria, la referencia describe un sistema plano de 2 electrodos con un electrodo de trabajo de Pd y un electrodo de referencia y contraelectrodo combinado de Ag/AgCl, con el fin de superar la baja señal inherente en este diseño de electrodo coplanar en ciertas realizaciones la enseñanza regenera el grupo electroactivo acoplando su detección a la oxidación de glucosa. Una ventaja de ciertas
40 realizaciones presentes es que los electrodos opuestos pueden regenerar automáticamente las especies detectadas sin necesidad de acoplamiento a otra reacción redox.

Opalsky et al. (EP 1.234.053 B1) describe también un detector de coagulación que usa un sustrato electroquímico. En ciertas realizaciones, la enseñanza describe un cartucho complejo que tiene preferiblemente una bomba para mover la muestra en el interior del cartucho para mezclar la muestra más el reactivo más allá de los electrodos coplanares. En
45 contraste, en ciertas realizaciones de la presente memoria, los electrodos opuestos permiten que una tira simple que no se beneficia de una bomba como reactivo pueda difundirse pasivamente en todo el volumen más pequeño de la muestra.

Hodges et al. (US 6.284.125 B1) describe biodetectores de electrodos opuestos para medir la concentración de una especie redox. En particular, se generó una especie redox mediante oxidación de glucosa y a partir de esta se calculó la concentración de glucosa. Un detector de electrodos opuestos puede consistir en:

50 (1) Electrodos de trabajo y contraelectrodos (y opcionalmente un electrodo de referencia en cualquier configuración) separados por una distancia predeterminada y

(2) Los electrodos enfrentados entre sí mientras se extienden en planos diferentes pero aproximadamente paralelos y

(3) La selección de la separación entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo de manera que los productos de reacción desde el contraelectrodo puedan difundirse al electrodo de trabajo.

5 Los electrodos opuestos son descritos por Newman y Chatelier (PCT/IB2007/001990) para un detector de coagulación pero la descripción se limita al uso de la (in)movilidad de las partículas magnéticas para detectar la coagulación y no proporciona enseñanzas de sustratos electroquímicos.

10 Ohara et al. (US 6.620.310 B1) describen la detección de un cambio de viscosidad de una muestra de coagulación mediante la detección de la disminución en la corriente en estado estacionario a través de los electrodos opuestos. Una vez más, la descripción no se refiere a un sustrato electroquímico, por el contrario, el cambio en la difusión de un par redox es detectado después de la coagulación.

Hodges et al. (US 6.444.115) se refiere a la medición del progreso de una reacción química que genera un producto de reacción electroactivo que es detectado subsiguientemente, amperiométrica o culombimétricamente, en un electrodo.

15 Ninguno de los documentos de la técnica anterior describe el uso de electrodos opuestos para detectar un sustrato electroquímico. Ninguno describe tampoco el descubrimiento inesperado de que cuando se usan electrodos opuestos es preferible no inmovilizar el sustrato electroquímico sobre el electrodo de trabajo.

Sumario

20 Las realizaciones de la presente invención se dirigen a un detector de electrodos opuestos con un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, un reactivo seleccionado de entre tromboplastina, y un sustrato electroquímico de trombina, en el que la tromboplastina es revestida sobre uno de los electrodos y el sustrato electroquímico de trombina es revestido sobre el otro electrodo, en el que el detector detecta la escisión del sustrato electroquímico de trombina. El sustrato electroquímico de trombina puede ser revestido sobre el contraelectrodo. Estos detectores pueden ser usados como parte de una tira de ensayo para ensayos de tiempos de coagulación en sangre.

25 La invención se refiere también a una tira de ensayo para medir el tiempo de coagulación de sangre o plasma en una muestra, que comprende un detector según se define en la presente memoria.

La invención se refiere también a un procedimiento de medición de la coagulación de sangre o plasma que comprende:

30 añadir una muestra de sangre de un paciente a un detector de electrodos opuestos que comprende un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, tromboplastina y un sustrato electroquímico de trombina, caracterizado por que la tromboplastina es revestida sobre uno de los electrodos y el sustrato electroquímico de trombina es revestido sobre el otro electrodo, y por que el detector detecta la escisión del sustrato electroquímico de trombina; y

analizar la muestra usando el detector para determinar el nivel de escisión para determinar al menos una propiedad de coagulación de sangre o plasma de la muestra.

Otras realizaciones de la invención se refieren a procedimientos de uso de los detectores y las tiras de la presente invención. Estos procedimientos pueden ser practicados en el centro de atención.

35 Breve descripción de las Figuras

La Fig. 1 ilustra una vista detallada de una tira electroquímica ejemplar según las presentes realizaciones, que incluye un electrodo (1) inferior, un separador (2) aislante, un electrodo (3) superior, una cubierta sobre un canal (4) de llenado, un canal (5) de llenado y una cámara (6) de reacción.

40 La Fig. 2 ilustra una tira electroquímica ensamblada ejemplar según la presente realización, que incluye un electrodo (1) inferior, un separador (2) aislante, un electrodo (3) superior, una cubierta sobre un canal (4) de llenado, un canal (5) de llenado y una cámara (6) de reacción.

45 La Fig. 3 ilustra una gráfica ejemplar según las presentes realizaciones; la figura demuestra una detección de coagulación mejorada cuando el sustrato de trombina es revestido sobre el contraelectrodo; el tiempo en segundos se proporciona como las abscisas y la corriente en microamperios se proporciona como las ordenadas; la gráfica etiquetada "a" representa el sustrato de trombina revestido sobre el contraelectrodo (el cátodo en este ejemplo) y la tromboplastina revestida sobre el electrodo de trabajo (el ánodo en este ejemplo); la gráfica etiquetada "b" representa el sustrato de trombina revestido sobre el electrodo de trabajo (ánodo) y la tromboplastina revestida sobre el contraelectrodo (cátodo).

Descripción detallada

5 A continuación se describen en detalle los aspectos ejemplares de la descripción. Las referencias a "un aspecto", "aspecto ejemplar", "diversos aspectos", etc., pueden indicar que el aspecto o aspectos de la descripción descrita de esta manera pueden incluir una función, una estructura o una característica particular, pero no todos los aspectos incluyen necesariamente la función, la estructura o la característica particular. Además, el uso repetido de la expresión "en un aspecto," o "en un aspecto ejemplar" no se refiere necesariamente al mismo aspecto, aunque es posible.

10 La presente invención se refiere a un detector que tiene electrodos opuestos, es decir, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, tromboplastina y un sustrato electroquímico de trombina. En algunas realizaciones, el sustrato electroquímico de trombina está sobre el contraelectrodo. Tal como se describirá a continuación, estos detectores pueden ser usados añadiendo una muestra al detector (opcionalmente sobre una tira de ensayo) en la que una proteasa escinde una especie electroactiva del sustrato. Esta especie electroactiva pueden ser detectada mediante reacciones redox en los electrodos.

15 El detector descrito puede ser usado en una amplia variedad de tecnologías, por ejemplo, en procedimientos de medición de coagulación de sangre o plasma usando ensayos tales como tiempo de protrombina (TP) y potencial de trombina, particularmente en la supervisión de anticoagulantes orales en centros de atención (por ejemplo coumadinas tales como warfarina y fenprocumona).

20 Tal como se describirá más adelante, una ventaja de la presente descripción es que los electrodos opuestos de ciertas realizaciones no necesitan de la complejidad de un verdadero electrodo de referencia, tal como un electrodo de Ag/AgCl. Por el contrario, en estos aspectos, la estrecha proximidad de los electrodos permite realizar ciclos de una especie electroactiva. Es decir, una molécula que ha sido reducida en el cátodo puede ser reoxidada en el ánodo, resultando en una corriente más alta. Esto puede posibilitar el uso de dos electrodos similares, tales como los formados a partir de un material conductor inerte, tal como carbono, Au, Pd, Pt Ir, óxido de indio, mezcla de indio/óxido de estaño, y/u óxido de estaño, etc.

25 Los dispositivos y tiras de ensayo de la presente invención tienen un sustrato electroquímico de trombina que puede ser secado sobre el contraelectrodo en algunos aspectos. El sustrato electroquímico de trombina puede ser escindido por una enzima, por ejemplo, una proteasa. Las proteasas son una clase de enzimas que escinden los enlaces de péptido. Desempeñan un papel esencial en muchos procedimientos biológicos. Por ejemplo, están implicadas en la digestión de alimentos, replicación de HIV, la cascada de coagulación de sangre y la ruta de complemento.

30 Algunas proteasas son específicas para una secuencia de péptidos particular, mientras que otras son menos selectivas. En cualquier caso, puede ser altamente deseable detectar y/o cuantificar la actividad de proteasa ya que esto proporciona una percepción del procedimiento biológico, Tal como apreciará una persona con conocimientos en la materia, cualquier proteasa natural o diseñada sintéticamente u otra enzima de escisión puede ser detectada o si no usada en la presente invención siempre que la enzima sea capaz de reconocer y escindir el enlace o enlaces deseados en el sustrato electroquímico de trombina usado.

35 Hay una serie de sustratos de péptido útiles disponibles comercialmente para una gama de proteasas. Típicamente, una proteasa escinde un tinte o grupo fluorescente desde estos sustratos, resultando en un cambio de color o fluorescencia. También es posible crear sustratos con grupos electroactivos que pueden ser detectados electroquímicamente después de la escisión. Las secuencias de aminoácidos de un sustrato de péptidos determina la especificidad para una proteasa. De esta manera, en algunos aspectos, la especificidad de un procedimiento de detección de proteasa puede ser cambiada mediante la selección de un sustrato específico para la proteasa de interés.

40 Un sistema de detección de proteasa ejemplar que los aspectos de la presente invención pueden detectar es la cascada de coagulación de sangre. La cascada de coagulación de sangre consiste en una serie de reacciones de proteasa y sirve como sistema modelo, con aplicaciones prácticas, para investigar la detección de proteasas. El tiempo necesario para que una muestra de sangre o plasma se coagule puede ser indicativo de diversos estados de enfermedad y puede ser útil para supervisar una terapia de anticoagulación. La especificidad de dichos ensayos de coagulación normalmente es debida, no a la manera en la que se detecta la coagulación, si no a la naturaleza del reactivo o reactivos usados para iniciar la coagulación. De esta manera, los presentes aspectos son aplicables a una amplia gama de ensayos de coagulación.

50 Por ejemplo, un área de uso para la presente descripción es en procedimientos de supervisión de anticoagulación mediante antagonistas de vitamina K orales, tales como warfarina y fenprocumón, en un centro de atención. Estos fármacos son supervisados en general usando un ensayo de tiempo de protrombina y los resultados se indican como una razón normalizada internacional (International Normalized Ratio, INR). Hay una tendencia hacia la realización de estos ensayos usando dispositivos para centros de atención que proporcionan un resultado en un par de minutos usando sangre derivada de una simple punción de dedo. Este enfoque es normalmente más conveniente que la venopunción y la preparación de plasma tradicional pero dichos dispositivos requieren un procedimiento para la detección de coagulación

55

en sangre entera. Los presentes aspectos mejoran las técnicas que tratan este problema.

5 La coagulación de plasma puede ser detectada en una diversidad de maneras. Por ejemplo, la gelificación de la muestra puede ser detectada por una mayor resistencia al movimiento de partículas (comúnmente magnéticas) a través de la muestra o por un cambio de fluidez de la muestra. El punto de formación de gel puede corresponder también a una mayor turbidez del plasma, que puede detectarse ópticamente. Pueden usarse procedimientos electroquímicos para detectar cambios en la viscosidad de una muestra midiendo cambios en la impedancia, por ejemplo, tal como en las patentes US N° 6.673.622, 6.066.504 y 6.046.051.

10 La coagulación puede ser detectada indirectamente usando sustratos de péptidos artificiales para trombina según los aspectos. Por ejemplo, los sustratos cromogénicos pueden ser escindidos por trombina (u otras enzimas de coagulación) y puede liberarse un grupo de tinte. Esto produce un cambio de color detectable en la solución. Pueden proporcionarse otros sustratos en los que el grupo escindido es electroquímicamente activo (puede ser oxidado y/o reducido en un electrodo) y puede ser detectado en un detector electroquímico. Este tipo de sustrato se denomina sustrato electroquímico y es la materia de ciertos aspectos de la presente memoria.

15 Para los propósitos de los presentes aspectos, se define un sustrato electroquímico como un compuesto químico que es escindido por una enzima para liberar un grupo saliente electroactivo. El sustrato intacto tiene poca o diferente actividad electroquímica bajo las condiciones de detección, en comparación con el grupo saliente libre que es liberado mediante escisión.

20 Una especie electroactiva puede ser detectada amperométricamente en realizaciones de la presente invención, por ejemplo, usando un sistema de dos o tres electrodos. Un sistema de tres electrodos puede tener un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. El electrodo de referencia mide el voltaje de la solución cerca de la superficie del electrodo de trabajo. El potencial entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo puede ser ajustado de manera que el voltaje entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia sea ajustado al valor deseado. La magnitud de la corriente a través del circuito que conecta el electrodo de trabajo y el contraelectrodo es determinada por la velocidad de reducción u oxidación en la interfaz de solución del electrodo de trabajo. De esta manera, es en el electrodo de trabajo donde tiene lugar la reacción de interés. El sistema está diseñado de manera que la reacción en el electrodo de trabajo, y no en el contraelectrodo, limite la corriente.

25 En un aspecto, un sistema de dos electrodos no tiene un electrodo de referencia separado. Por el contrario, puede ajustarse el voltaje entre los conductores de los dos electrodos restantes. El electrodo de trabajo puede definirse una vez más como el electrodo en el que se produce la reacción de interés. Este será el electrodo en el que se produce la reacción que limita la corriente.

30 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los detectores electroquímicos que tienen electrodos opuestos pueden tener una serie de ventajas en comparación con los que usan electrodos coplanares, incluyendo pero sin limitarse a las siguientes:

35 (1) Las especies electroactivas pequeñas pueden difundirse fácilmente desde un electrodo opuesto al otro. Esto puede resultar en el reciclado de las formas reducidas y oxidadas, amplificando efectivamente la señal. Esto no es posible en los electrodos coplanares ya que las distancias son demasiado grandes para que las especies se difundan la distancia requerida al electrodo de trabajo en el tiempo disponible.

40 (2) Tal como apreciará una persona con conocimientos en la materia, cualquier reacción redox debe tener un componente de oxidación y un componente de reducción. En los detectores de electrodos opuestos, la especie electroactiva de interés puede ser oxidada en un electrodo y reducida en el otro en el reciclado indicado anteriormente. En los detectores de electrodos coplanares se requiere un esfuerzo adicional para asegurar que pueda producirse la reacción en el contraelectrodo. Por ejemplo, el contraelectrodo puede ser de Ag/AgCl o puede aplicarse un voltaje alto o puede requerirse una especie electroactiva complementaria.

45 (3) La estrecha proximidad de los electrodos opuestos entre sí significa que la mayor parte de la diferencia de potencial entre los electrodos es debida al voltaje a través de las interfaces de electrodo y no a través del volumen de la solución. En contraste, los electrodos coplanares pueden tener una caída de voltaje $I \times R$ considerable a través de la muestra, particularmente si la solución entre los electrodos tiene una baja fuerza iónica en una realización.

50 (4) La fabricación de electrodos opuestos puede ser más sencilla que los coplanares ya que para formar electrodos coplanares puede ser necesario depositar o someter a ablación un metal (u otro material conductor) para crear electrodos distintos que están aislados eléctricamente entre sí. Por el contrario, puede ser ventajoso tener una superficie conductora que cubre todo el material que forma cada electrodo opuesto. Esto significa, por ejemplo, que puede usarse un procedimiento simple, tal como revestimiento por bombardeo iónico, para revestir los electrodos y no se requieren patrones específicos en el conductor. El área del electrodo opuesto que contacta con la muestra puede ser definida por el separador aislante que separa los electrodos.

(5) El uso de electrodos opuestos puede evitar el requisito en ciertas realizaciones de Frenkel et al. (US 6.352.630, 2002) que requiere la inmovilización de un sustrato electroquímico en una orientación específica. En detectores de electrodos opuestos, el sustrato electroquímico puede estar libre para disolverse en la muestra y su orientación es irrelevante. Esto simplifica el procedimiento de fabricación.

5 Uno o más aspectos se refieren a un dispositivo, en la configuración de una tira, que mide las actividades de proteasa. Por ejemplo, para supervisar la coagulación de sangre. La tira se conecta eléctricamente a un medidor que aplica un voltaje o una corriente predeterminados a la tira y mide la corriente o el voltaje resultantes. Tal como apreciará una persona con conocimientos en la materia, estos procedimientos son conocidos, por ejemplo, como técnicas de amperometría o electroquímicas galvanostáticas, respectivamente. El medidor también puede regular térmicamente la tira,
10 calcular, registrar, mostrar y/o transmitir el resultado de la reacción.

Una tira ejemplar, mostrada en las Figs. 1 y 2, puede comprender dos electrodos 1 y 3 en una configuración opuesta. Los electrodos pueden estar aislados eléctricamente entre sí por un separador 2 de plástico o su equivalente. En algunos aspectos, los electrodos pueden estar separados menos de 0,5 mm y en ciertas realizaciones pueden estar separados entre 0,05 y 0,15 mm.

15 El separador 2 puede tener un espacio en el mismo que forma una cavidad entre los electrodos y define una cámara 6 de reacción. Las superficies de electrodo son eléctricamente conductoras y están en contacto eléctrico con el medidor.

En ciertos aspectos, las superficies son revestidas por bombardeo iónico sobre un soporte de plástico. Los revestimientos adecuados pueden ser conocidos por las personas con conocimientos en la materia y pueden incluir platino, indio, carbono, mezcla de óxido de estaño/indio, y óxido de estaño, pero preferiblemente paladio u oro.

20 Las superficies sobre cada uno de los electrodos pueden ser las mismas o diferentes. Las superficies conductoras están enfrentadas entre sí. Un canal 5 de llenado puede permitir que una muestra sea introducida a la cámara de reacción mientras la cámara de reacción puede ser mantenida a una temperatura establecida dentro del medidor.

En ciertos aspectos, el sustrato electroquímico de trombina no es revestido sobre el electrodo de trabajo. Después de la adición de la muestra (por ejemplo, sangre), la escisión del sustrato de trombina libera una especie electroactiva y se produce un cambio detectable en la actividad electroquímica.
25

En ciertos aspectos, la tira descrita consiste en dos electrodos en una configuración opuesta. Los electrodos pueden comprender paladio aplicado mediante bombardeo iónico sobre un soporte de plástico. Una capa separadora aislante de 0,1 mm de espesor puede definir la separación de los electrodos. Uno o más huecos en el separador pueden definir la cámara o cámaras de reacción. Un canal de llenado puede permitir que la muestra sea conducida al interior de la cámara o cámaras de reacción por la acción capilar.
30

El reactivo contiene tromboplastina, necesaria para un ensayo de tiempo de protrombina.

El reactivo contiene tromboplastina diluida, necesaria para un ensayo de generación de trombina a partir del cual pueden derivarse parámetros tales como el tiempo de retardo, el pico de trombina y el potencial de trombina endógena.

35 En algunos aspectos, es ventajoso revestir uno o más electrodos con un compuesto electroactivo que asegura que el contraelectrodo no limite la corriente. Por ejemplo, si el cátodo es el contra-electrodo, entonces su revestimiento con hierro (III) EDTA proporciona un compuesto reducible para soportar la detección (en esta realización, por oxidación) de las especies de interés. Esto puede ser particularmente ventajoso si la especie de interés no es completamente reversible electroquímicamente.

40 Se ha encontrado que es ventajoso secar a tromboplastina y el sustrato electroquímico de trombina sobre los electrodos opuestos para prevenir reacciones adversas entre los dos reactivos. En una realización ejemplar, el sustrato electroquímico de trombina (toluolsulfonil-glicil-prolinil-arginin-4-amido-2-clorofenol) puede ser revestido sobre el contraelectrodo y la tromboplastina puede ser revestida sobre el electrodo de trabajo. En este ejemplo, el grupo saliente del sustrato de trombina es escindido en la forma reducida. Aquí, es la especie que está siendo detectada y limita la corriente. Debido a que el grupo saliente está en la forma reducida, puede ser oxidado sobre el ánodo para hacer pasar corriente y, de esta manera el ánodo es el electrodo de trabajo.
45

En general, se esperaría que el revestimiento de sustrato de trombina sobre el electrodo de trabajo produjera una detección de coagulación más rápida debido a que el grupo saliente es liberado en el electrodo en el que es detectado. Sin embargo, en algunas realizaciones, se cumple lo opuesto. Por ejemplo, la Fig. 3 muestra que la cinética de reacción fue más rápida cuando el sustrato de trombina fue secado sobre el contraelectrodo (cátodo) en lugar de sobre el electrodo de trabajo (ánodo). La velocidad de reacción más rápida de estas realizaciones puede hacer que la determinación del tiempo de coagulación sea más consistente.
50

Muchos análisis biológicos (por ejemplo, análisis de generación de trombina) implican el cálculo de las velocidades de

reacción. En ciertas realizaciones, se observa que puede ser más fácil medir la cinética de reacción de una especie electroactiva generada químicamente cuando la especie se está difundiendo al electrodo de trabajo en lugar de ser generada en el electrodo de trabajo. Véanse por ejemplo, las patentes US N° 5.942.102 y 6.444.115. Esta es otra razón por la que en ciertas realizaciones puede ser preferible revestir los sustratos electroquímicos de trombina lejos del electrodo de trabajo.

En otro aspecto, el sustrato electroquímico de trombina y la tromboplastina son formulados de manera que no interactúen adversamente, lo que puede permitir que todos los componentes o los componentes reactivos sean revestidos conjuntamente sobre el contraelectrodo. Esto tiene la ventaja de dejar el electrodo de trabajo libre de cualquier reactivo que podría ensuciarlo. El ensuciamiento sobre el contraelectrodo es una preocupación menor ya que el electrodo no limita la corriente. El ensuciamiento del electrodo de trabajo puede no ser evidente inmediatamente y frecuentemente solo se hace evidente después del almacenamiento, donde puede ser una causa de una vida útil reducida para un producto que materializa la presente invención. De esta manera, el revestimiento sobre el contraelectrodo puede evitar el riesgo de ensuciamiento del electrodo de trabajo.

Las tiras de ensayo de la presente descripción pueden incluir también medios para verificar la integridad de la tira y/o la muestra. En un aspecto, la tira tiene una cámara de reacción que contiene reactivos cuya función es verificar la integridad de la tira y/o la muestra. Los reactivos pueden incluir factores de coagulación que si no serían escasos en la muestra. Esta cámara de reacción puede producir un tiempo de coagulación que es aproximadamente normal, independientemente del grado de escasez en la muestra, y puede ser usada para demostrar la integridad de la tira cuando el tiempo de coagulación está comprendido entre límites predeterminados.

En otros aspectos, la integridad de la tira puede verificarse incluyendo un compuesto electroactivo en el reactivo. Dicho compuesto puede ser diferente del sustrato electroquímico de trombina, que es posible que libere solamente un grupo electroactivo en la escisión enzimática. El compuesto que supervisa la integridad de la tira puede cambiar (aumentar o disminuir) la actividad electroquímica bajo condiciones de almacenamiento (por ejemplo, temperatura o humedad elevadas) que pueden dañar otros componentes de la tira. Los ejemplos de dichos compuestos pueden incluir 4-amino-2-clorofenol, ferricianuro, ferrocianuro y los compuestos nitrosos o N-óxido orgánicos descritos en la solicitud de patente N° US 2005/0123441. La actividad electroquímica de dichos compuestos puede ser comparada con límites predeterminados para el baño de tiras. Si el valor no está comprendido entre los límites, entonces el medidor puede proporcionar un mensaje de error en lugar de un resultado.

Los reactivos para supervisar la integridad de la tira pueden estar en la misma cámara de reacción que detecta la escisión del sustrato o pueden estar en cámaras diferentes. En los aspectos en los que las cámaras están separadas, entonces las cámaras pueden estar aisladas eléctricamente por una discontinuidad de los electrodos o, en un aspecto alternativo, las cámaras pueden usar electrodos conectados eléctricamente. Cuando las cámaras comparten un electrodo continuo, la señal detectada por el medidor puede ser una combinación de las cámaras. La interferencia entre la integridad y las señales de reacción de escisión puede ser minimizada detectando la reacción de integridad antes o después de la reacción de escisión y/o reduciendo el área de reacción cruzada del electrodo.

Algunos aspectos de la presente memoria se refieren a un control incorporado adecuado para supervisar la viabilidad de las tiras biodetectoras electroquímicas, tales como, pero sin limitarse a, los descritos en la presente memoria. Los materiales de electrodo y el revestimiento sobre los mismos, son seleccionados de manera que se establezca una diferencia de potencial entre los electrodos. Este voltaje puede ser medido directamente o se mide la corriente que induce el mismo. En algunos aspectos, el detector se comporta brevemente como una batería, generando carga. La diferencia de potencial se interrumpe después de un tiempo relativamente corto y no interfiere con la reacción de ensayo subsiguiente.

Dichos controles son útiles, por ejemplo, en ensayos en centros de atención, basados en un medidor que mide una reacción electroquímica en una tira desechable, que se están haciendo cada vez más comunes. Existe una necesidad de garantizar que los resultados de ensayo sean exactos, por lo tanto son deseables controles para asegurarla la integridad de la tira. Para los usuarios finales, por ejemplo un paciente, el control más conveniente es uno que está "incorporado" en la tira y que verifica la integridad de la propia tira que está siendo ensayada. Los ejemplos de controles incorporados pueden encontrarse en el área de los dispositivos de coagulación para centros de atención ya en el mercado (por ejemplo, CoaguChek XS, INRatio). Además, el documento US2005123441A1 proporciona una introducción concisa a las ventajas de un control incorporado.

Típicamente, los biodetectores electroquímicos son más complicados cuanto más aislada está la reacción de control con relación a la reacción de ensayo. Por ejemplo, con el fin de aumentar la complejidad:

a. Una tira con una única cámara de reacción que incluye tanto la reacción de control como la reacción de ensayo es comparativamente fácil de fabricar.

b. Una tira con cámaras de control y de ensayo que están separadas pero conectadas eléctricamente es más complicada ya que requiere la deposición de múltiples reactivos en diferentes áreas.

c. La fabricación económica a escala de una tira con cámaras de control y de ensayo que no solamente están separadas si no también aisladas eléctricamente puede suponer un importante reto. Normalmente, requiere la deposición o ablación del material de electrodo en un patrón.

Sin embargo, la dificultad de encontrar una química de reacción de control adecuada está en orden inverso al anterior.

- 5 a. Una tira con cámaras de control y de ensayo separadas y aisladas eléctricamente, no tendrá ningún problema con que una reacción (por ejemplo, de control) interfiera con la otra (por ejemplo, de ensayo).
- b. Una tira con cámaras de control y ensayo separadas pero conectadas eléctricamente puede sufrir interferencia eléctrica entre las cámaras ya que los electrones de una reacción son indistinguibles de los electrones de la otra, pero el control y el ensayo no se interferirán entre sí químicamente.
- 10 c. Una tira con una única cámara de reacción requiere componentes que no se interferirán químicamente entre sí o que no causarán señales eléctricas interferentes.

Se describe además una nueva manera de determinar una reacción de control en un detector electroquímico, así como una manera para prevenir que las señales eléctricas de la reacción de control y la reacción de ensayo interfieran entre sí.

- 15 El documento US2005123441 A1 describe una reacción de control incorporada que utiliza compuestos nitrosos o N-óxido que son reducidos después de la exposición a condiciones que pueden dañar el rendimiento de la tira. El cambio en el control incorporado puede ser detectado óptica o electroquímicamente. El procedimiento de detección electroquímico descrito en el documento US2005123441 A1 implica la aplicación de -700 mV, con relación a Ag/AgCl, a través del electrodo de trabajo y, a continuación, aplicar -100 mV.

- 20 La presente descripción puede ser ventajosa debido a que los controles de la invención solamente requieren 1-2 segundos en lugar de 4,5 segundos para algunos dispositivos anteriores. El control de la presente invención no corre el riesgo de que el voltaje aplicado interfiera con el ensayo.

- 25 Se describe un control incorporado para supervisar la viabilidad de los detectores electroquímicos que detectan la coagulación de sangre. El reactivo de reacción de control, que mide la viabilidad de la tira, está contenido dentro de la misma cámara que los reactivos de reacción de ensayo que miden el tiempo de coagulación. La señal desde la reacción de control se diferencia de la del ensayo en el tiempo en el que ocurren. Específicamente, la reacción de control es determinada en los primeros pocos segundos después de añadir la muestra y a continuación se determina la reacción de ensayo.

- 30 La reacción de control puede ser creada mediante revestimiento, sobre un electrodo, de un reactivo que contiene una baja concentración (por ejemplo, 0,5 mM) de ferricianuro y, sobre el otro electrodo, un reactivo sin ferricianuro. La diferencia en la química de electrodo crea un voltaje a través de los electrodos cuando se añade la muestra. Este voltaje puede ser medido directamente con un voltímetro o la corriente a través de un circuito externo puede ser registrada por un amperímetro.

- 35 El voltaje electroquímico se puede disipar mediante al menos dos procedimientos: la corriente que fluye a través de un circuito externo aplana efectivamente la batería electroquímica y la difusión de ferricianuro desde un electrodo al otro disminuye el gradiente de concentración de ferricianuro y, de esta manera, el voltaje. Una vez que la señal desde la reacción de control se ha disipado, entonces puede comenzar el análisis de la reacción de ensayo. Esto puede consistir por ejemplo en la aplicación de 0,3-0,4V a través de los electrodos y medir la corriente amperométrica resultante.

- 40 La concentración de ferricianuro es suficientemente baja de manera que no interfiera sustancialmente con la detección de la reacción de ensayo. Sin embargo, tal como apreciará un experto en la materia, se puede producir el uso de alternativas al ferricianuro. Por ejemplo, yoduro, ascorbato, ferrocianuro, 4-amino-2-clorofenol pueden producir un efecto de batería.

El efecto de batería se mide midiendo la corriente sin ningún voltaje externo aplicado a través de los electrodos del detector. Sin embargo, es posible medir la corriente con un pequeño voltaje aplicado, siempre que el voltaje no cause interferencia sustancial con la reacción de ensayo.

- 45 Los detectores pueden contener dos cámaras. Una cámara puede contener los reactivos de la reacción de ensayo y la otra los reactivos de la reacción de control. Este enfoque es ventajoso si los componentes de una reacción (por ejemplo, la reacción de control) pueden inhibir químicamente la otra (por ejemplo, la reacción de ensayo). No es necesario que las cámaras estén aisladas eléctricamente, siempre que la reacción de ensayo y la reacción de control no interfieran entre sí eléctricamente. Este aspecto es particularmente ventajoso si se incluye un agente neutralizante en la cámara de reacción de control (por ejemplo, en un electrodo opuesto).

- 50 De manera alternativa, pueden usarse concentraciones de reactivos de reacción de control que normalmente interferirían con la reacción de ensayo. En este aspecto, la cámara de control contiene áreas separadas de reactivo de control y un

- 5 agente neutralizante. Cuando la muestra es añadida, el reactivo de control produce un efecto de batería o alguna otra señal electroquímica pero, a continuación, es neutralizada rápidamente por el agente neutralizante. El efecto neutralizante puede ser mediante una reacción electroquímica (por ejemplo, yodo y ascorbato se neutralizan entre sí) o más de un efecto físico, tal como precipitación (por ejemplo, los iones de Co^{2+} o Mn^{2+} precipitan ferricianuro). La precipitación de un compuesto electroactivo puede hacer que sea incapaz de interactuar con un electrodo.
- 10 En un aspecto que mide la coagulación de sangre o plasma, un medidor puede mantener el detector a 37°C. la señal eléctrica detectada por el medidor puede ser interpretada para calcular el tiempo de coagulación. Por ejemplo, el tiempo de coagulación puede definirse como el punto en el que la señal, o la proporción de cambio de la misma, alcanza un umbral. El tiempo de coagulación puede ser indicado, mostrado o sin no emitido con las unidades de tiempo o puede ser convertido a unidades diferentes, tales como INR, usando datos de calibración asignados al detector y/o al medidor.
- Pueden calcularse e indicarse también otros resultados. Por ejemplo, con los reactivos correctos, el área bajo la curva puede indicar el potencial de trombina endógeno, que puede ser indicado de manera similar. El resultado del análisis puede ser indicado mostrándolo sobre la pantalla del medidor pero también puede ser almacenado en memoria y/o transmitido a otro dispositivo.
- 15 También se describen en la presente memoria kits que tienen un detector o una tira de ensayo. Dichos kits pueden ser envasados de manera estéril. Las tiras de ensayo o detectores pueden incluirse en envases individuales así como en envases de tipo multi-envase. Opcionalmente, los kits incluyen un medidor para interactuar con las tiras de ensayo o detector y/o instrucciones para usar el kit, la tira de ensayo o el detector.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un detector de electrodos opuestos que comprende un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, tromboplastina y un sustrato electroquímico de trombina, en el que la tromboplastina está revestida sobre uno de los electrodos y el sustrato electroquímico de trombina está revestido sobre el otro electrodo, en el que el detector detecta la escisión del sustrato electroquímico de trombina.
2. Detector según la reivindicación 1, en el que el sustrato electroquímico de trombina no está inmovilizado sobre el electrodo de trabajo.
- 10 3. Detector según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que el sustrato electroquímico de trombina comprende un péptido unido a un grupo saliente, en el que el grupo saliente se convierte en electroactivo una vez escindido por la trombina.
4. Detector según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un medidor conectado al detector, en el que el medidor determina un tiempo de coagulación para una muestra.
5. Detector según la reivindicación 4, en el que el medidor muestra o emite un resultado que comprende el tiempo de coagulación o un resultado o valor que depende del tiempo de coagulación.
- 15 6. Detector según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un medidor conectado al detector, en el que el medidor muestra o emite un resultado que comprende un parámetro de generación de trombina en la muestra.
7. Una tira de ensayo para medir el tiempo de coagulación de sangre o plasma en una muestra, que comprende un detector según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 20 8. Tira de ensayo según la reivindicación 7, que comprende además unos medios para verificar la integridad de la tira.
9. Un procedimiento de medición de la coagulación de sangre o plasma que comprende:
- 25 añadir una muestra de sangre de un paciente a un detector de electrodos opuestos que comprende un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, tromboplastina y un sustrato electroquímico de trombina, caracterizado por que la tromboplastina está revestida sobre uno de los electrodos y el sustrato electroquímico de trombina está revestido sobre el otro electrodo, y que el detector detecta la escisión del sustrato electroquímico de trombina; y
- analizar la muestra usando el detector para determinar el nivel de escisión para determinar al menos una propiedad de coagulación de sangre o plasma de la muestra.
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el procedimiento se realiza en un centro de atención.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el procedimiento comprende además un medidor conectado al detector, en el que el medidor muestra o emite a un resultado que comprende un parámetro de generación de trombina en la muestra.
- 35 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el paciente está tomando una medicación anticoagulante.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la medicación anticoagulante es un antagonista de vitamina K.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que la muestra es tomada del paciente mediante un pinchazo en el dedo del paciente.
- 40

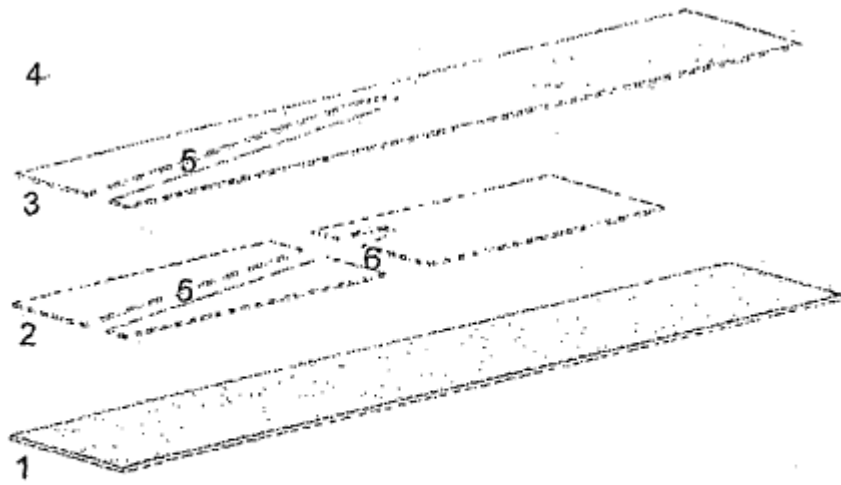


Figura 1

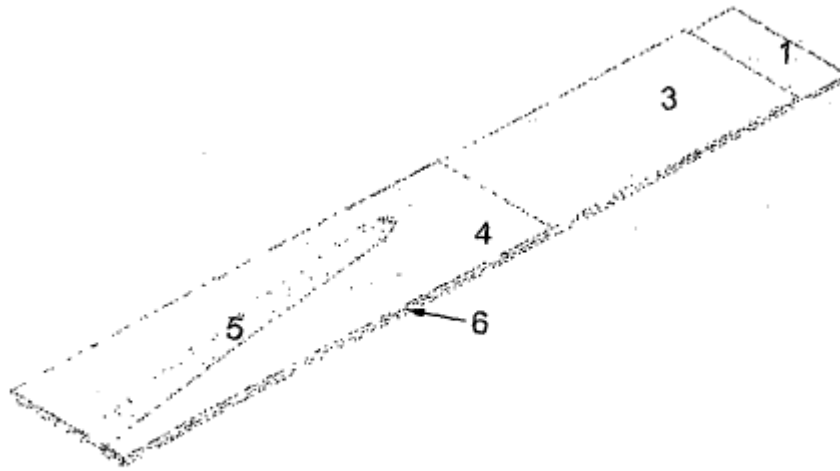


Figura 2

El revestimiento del sustrato de trombina sobre el electrodo de trabajo
inhibe la detección de trombina

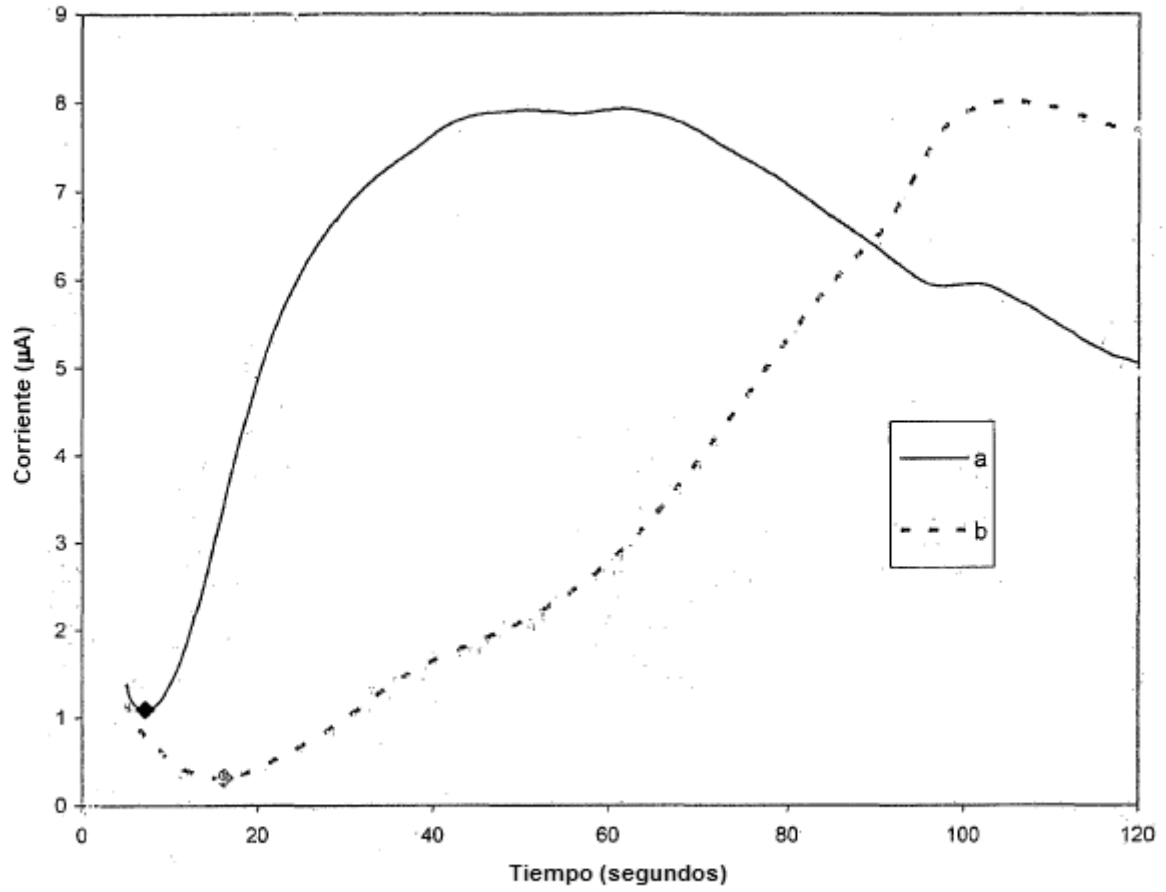


Figura 3