

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 210**

51 Int. Cl.:

A61B 5/055 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2011 PCT/US2011/036811**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11146486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11784092 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2571421**

54 Título: **Dispositivos de detección y métodos de uso relacionados**

30 Prioridad:

17.05.2010 US 345259 P

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**SENTILUS HOLDCO, LLC (100.0%)
3130 Gateway Drive
Norcross, GA 30091, US**

72 Inventor/es:

**CHILKOTI, ASHUTOSH y
HUCKNALL, ANGUS**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 645 210 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

Dispositivos de detección y métodos de uso relacionados

ANTECEDENTES

5 **[0001]** Las micromatrices basadas en tecnología de ácidos nucleicos son herramientas bien establecidas para aplicaciones tales como el diagnóstico y el análisis genético basado en los patrones de expresión génica. Otras tecnologías de plataforma de micromatriz tales como matrices de proteína (anticuerpo) y ensayos basados en análisis de muestras biológicas complejas (preparaciones celulares, sangre total, etc.) no están tan bien desarrolladas teniendo en cuenta las dificultades técnicas que no se encuentran necesariamente en las matrices de ácidos nucleicos. Dichas dificultades incluyen procesamiento de muestras complicado y/o multietapa, actividad de unión inconsistente o falta de estabilidad ensayos (por ejemplo, solubilidad, pH, etc.) y asociaciones de unión no específica (por ejemplo, biomoléculas a superficie de la micromatriz). Esta unión no específica puede dificultar la detección de señales puesto que genera una alta señal de fondo (ruido). Además, las tecnologías de micromatriz normalmente emplean etapas preparativas adicionales tales como etapas que implican el fraccionamiento o la purificación de muestras, y/o la unión o asociación de un grupo detectable con un analito antes o después de su unión a un agente de captura.

10 **[0002]** Por consiguiente, los dispositivos y los métodos que permiten la detección de uno o más analitos en una única muestra sin ninguna etapa de procesamiento previo o con un número mínimo de ellas, que presentan una baja propensión a la asociación no específica entre los componentes de la muestra y el sustrato, y que emplean una única etapa de ensayo o un número pequeño de ellas, pueden proporcionar ventajas con respecto a los dispositivos y los métodos de detección existentes.

SUMARIO

[0003] La presente invención es según se define en las reivindicaciones adjuntas 1-16.

25 **[0004]** En un aspecto, la exposición proporciona un dispositivo que comprende: un sustrato que comprende una superficie; una capa de polímero no incrustante en la superficie, al menos una región de captura en la capa de polímero, que comprende al menos un agente de captura; y al menos una región lábil en la capa de polímero, que comprende al menos un agente de detección y un excipiente, donde la región de captura y la región lábil se encuentran espacialmente separadas.

30 **[0005]** En otro aspecto, la exposición proporciona un método de fabricación de un dispositivo descrito en el presente documento, comprendiendo el método: proporcionar un sustrato que comprende una superficie; formar una capa de polímero no incrustante en la superficie; imprimir al menos un agente de captura sobre la capa de polímero; e imprimir al menos un agente de detección y al menos un excipiente en la capa de polímero; donde el agente de captura se imprime sobre la capa de polímero en una región que se encuentra espacialmente separada del agente de detección y el excipiente.

35 **[0006]** En otro aspecto, la exposición proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad o un trastorno en un sujeto que comprende: obtener una muestra de un sujeto; poner en contacto la muestra con un dispositivo descrito en el presente documento durante un tiempo suficiente para permitir que se solubilice el agente de detección en la región lábil; y detectar la presencia de la enfermedad o trastorno, donde una señal detectable en al menos una región de captura en el dispositivo indica la presencia de la enfermedad o el trastorno en el sujeto.

40 **[0007]** En otro aspecto, la exposición proporciona un ensayo diagnóstico para identificar una enfermedad, un trastorno o un estado biológico en un sujeto que comprende: obtener una muestra de un sujeto; poner en contacto la muestra con un dispositivo descrito en el presente documento durante un tiempo suficiente para permitir que se solubilice el agente de detección en la región lábil; detectar la presencia de la enfermedad, trastorno y/o estado biológico en el sujeto, donde una señal detectable en al menos una región de captura en el dispositivo indica la presencia de la enfermedad, trastorno y/o estado biológico en el sujeto.

45 **[0008]** La exposición se refiere a otros aspectos y modos de realización que resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009] La FIG. 1 representa un chip desechable de ejemplo que se ha recubierto con POEGMA, se ha estampado con una tinta hidrófoba y se ha impreso con "puntos de captura" y "puntos lábiles".

50 La FIG. 2 representa la síntesis de una capa de polímero de POEGMA en un portaobjetos.

La FIG. 3 representa una sección transversal de un dispositivo de ejemplo.

La FIG. 4 representa una sección transversal de un dispositivo de ejemplo.

La FIG. 5 representa un formato de matriz de ejemplo.

La FIG. 6 representa un método de ejemplo de utilización de un dispositivo de ejemplo para analizar una muestra de sangre de un sujeto.

La FIG. 7 representa la adsorción de proteínas en cepillos de POEGMA de diferentes grosores en óxido de silicio y óxido de silicio modificado con silano iniciador (control: 0) medida por elipsometría. Leyenda: Ly (lisozima), Fn (fibronectina), ASB (albúmina de suero bovino), SBF (suero bovino fetal).

La FIG. 8 representa: (A) Imagen de una micromatriz IL-6 interrogada de suero. (B) Curvas de respuesta a la dosis de OPG en tampón y suero en poli(OEGMA). (C) Curvas de respuesta a la dosis de IL-6 en suero en poli(OEGMA) y nitrocelulosa. (D) Curva de respuesta a la dosis para una micromatriz IL-6 interrogada de sangre total. En B-D, la ordenada muestra la intensidad media de la fluorescencia restando el fondo en los puntos y el eje X muestra la concentración de analitos en la solución. Las barras de error representan una desviación estándar.

La FIG. 9 representa: A) puntos de anticuerpo biotinilado (Ac-b) tras la exposición a una serie de dilución de estreptavidina-Cy5, imprimida de 1 mg/ml de Ac-b (izquierda) y 0,0001 mg/ml (derecha) de soluciones de Ac-b; B) Curvas de respuesta a la dosis de puntos con respecto a la serie de dilución de estreptavidina-Cy5.

La FIG. 10 representa imágenes de fluorescencia de un chip de ejemplo impreso con puntos de captura de Ac-b y puntos lábiles de estreptavidina-Cy5, antes y después de la adición de una gota de tampón.

La FIG. 11 representa una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de detección de BNP tras 1 día de almacenamiento a TA después de la impresión (triángulos grises) y 23 días de almacenamiento después de la impresión (círculos negros).

La FIG. 12 representa imágenes de un portaobjetos con cepillo de POEGMA estampado con rejilla o cera. (A) Imagen que ilustra una matriz de anticuerpos detectada en el centro de un único corral de cera. (B) Imagen de fluorescencia ampliada de matriz de anticuerpos 4x4 interior rodeada por puntos que contienen reactivos de detección fluorescentes solubles.

La FIG. 13 representa los resultados de un ensayo de ejemplo para IgG e IgM. A) Chip de ensayo impreso. B) Anticuerpos de detección coimpresos para IgG e IgM coimpresos como los puntos de detección lábiles. C) Control negativo en el que se incubó el chip con PBS. D) Ensayo en el que solo se imprimió agente de detección Cy5-anti-IgG en los puntos lábiles. E) Ensayo en el que solo se imprimió agente de detección Cy5-anti-IgM en los puntos lábiles. F) Control negativo en el que se incubó el chip con sangre de pollo.

La FIG. 14 representa la fluorescencia capturada de un ensayo en el que se imprimieron previamente pesos moleculares variables de PEG en la capa de polímero y/o se incluyeron con la solución de agente de captura.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0010] La exposición no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a la disposición de los componentes explicados en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. Los objetos descritos en la exposición son aptos para otros modos de realización y para ser puestos en práctica o llevarse a cabo de diferentes maneras. Además, la fraseología y la terminología utilizada en el presente documento tiene fines descriptivos y no debe considerarse como limitativa. El uso de «que incluye», «que comprende», «que presenta», «que contiene», «que implica», y variaciones de los mismos en el presente documento, pretende abarcar los elementos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales. Con fines de favorecer una comprensión de los principios de la exposición, se hace referencia a varios aspectos y modos de realización relacionados con lenguaje ilustrativo utilizado para describir los mismos.

[0011] Los artículos «un/uno» y «el/la/los/las» se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa al menos un elemento y puede incluir más de un elemento. De forma similar, la referencia a «una célula» incluye una pluralidad de células y, en algunos modos de realización, puede incluir un tejido y/o un órgano. De forma similar, debe entenderse que el término «y/o» según se utiliza en el presente documento incluye cualquier elemento individual citado dentro de la frase relevante, así como cualquier combinación de dos o más elementos, incluyendo todos los elementos.

[0012] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente exposición.

Definiciones

[0013] Aunque se cree que un experto en la materia entenderá bien los siguientes términos, se exponen las siguientes definiciones para facilitar la explicación del objeto dado a conocer. Aunque en la práctica o prueba del objeto dado a conocer se puede utilizar cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los

descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos, dispositivos y materiales representativos.

[0014] Como se utiliza en el presente documento, el término «muestra» o «muestra biológica» se refiere a cualquier material que se toma de su estado nativo o natural, para facilitar cualquier manipulación o procesamiento y/o modificación adicional deseable. Una muestra o una muestra biológica puede comprender una célula, un tejido, un fluido (por ejemplo, un fluido biológico), una proteína (por ejemplo, anticuerpo, enzima, proteína soluble, proteína insoluble), un polinucleótido (por ejemplo, ARN, ADN), una preparación de membrana, y similares, que pueden aislarse y/o purificarse adicionalmente de forma opcional a partir de su estado nativo o natural. Un «fluido biológico» se refiere a cualquier fluido que se origine de un organismo biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen, pero sin carácter limitativo, sangre, suero, plasma, líquido linfático, líquido biliar, orina, saliva, moco, esputo, lágrimas, líquido cefalorraquídeo (LCR), lavado broncoalveolar, lavado nasofaríngeo, lavado rectal, lavado vaginal, lavado colónico, lavado nasal, lavado de garganta, líquido sinovial, semen, líquido ascítico, pus, leche materna, líquido del oído, sudor y líquido amniótico. Un fluido biológico puede estar en su estado natural o en un estado modificado por la adición de componentes tales como reactivos, o la eliminación de uno o más componentes naturales (por ejemplo, plasma sanguíneo).

[0015] Como se utiliza en el presente documento, el término «biomarcador» se refiere a una sustancia que se asocia a un estado biológico o un proceso biológico, tal como un estado patológico o un indicador diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un indicador que identifica la probabilidad de la existencia o desarrollo posterior de una enfermedad o trastorno). La presencia o ausencia de un biomarcador, o el aumento o la disminución en la concentración de un biomarcador, puede asociarse a un estado o proceso particular o ser indicativo del mismo. Los biomarcadores pueden incluir, pero sin carácter limitativo, células o componentes celulares (por ejemplo, una célula viral, una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula cancerígena, etc.), moléculas pequeñas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, enzimas, antígenos y anticuerpos. Un biomarcador puede derivarse de un agente infeccioso, tal como una bacteria, hongo o virus, o puede ser una molécula endógena que se encuentre en mayor o menor abundancia en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en comparación con un individuo sano (p.ej.; un aumento o una disminución en la expresión de un gen o producto génico).

[0016] Como se utiliza en el presente documento, el término "fracción de detección" es cualquier fracción o compuesto que es detectable por métodos que incluyen, pero sin carácter limitativo, medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos, electroquímicos, radiactividad y otros medios físicos. Una fracción de detección puede ser detectable indirectamente; por ejemplo, la fracción de detección puede ser una fracción o compuesto que sea un miembro de un par de unión específica, donde el segundo miembro del par de unión incluye una fracción de detección que puede detectarse directamente. Un ejemplo no limitativo y conocido de una fracción de detección de este tipo es la biotina, que puede unirse a avidina o estreptavidina que comprende una fracción de detección tal como un fluoróforo. Las fracciones de detección de ejemplo incluyen, pero sin carácter limitativo, fluoróforos, cromóforos, radiomarcadores, polinucleótidos, moléculas pequeñas, enzimas, nanopartículas y convertidores elevadores.

[0017] Como se utiliza en el presente documento, el término «enfermedad infecciosa» (abreviado en el presente documento como EI) se refiere a aquellas enfermedades causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero sin carácter limitativo, microbios tales como, por ejemplo, virus, bacterias, arqueas, planarias, amebas y hongos.

[0018] El término «polímero», como se usa en el presente documento, tiene su significado corriente como se usa en la técnica, es decir, una estructura molecular que presenta una o más unidades de repetición (monómeros), conectadas mediante enlaces covalentes. Las unidades de repetición pueden ser todas idénticas o, en algunos casos, puede haber más de un tipo de unidad de repetición presente dentro del polímero. El término polímero pretende abarcar cualquier tipo de polímero, incluyendo homopolímeros, copolímeros (por ejemplo, copolímeros aleatorios, copolímeros en bloque, copolímeros de injerto, etc.), y mezclas, combinaciones y mezclas de los mismos. Los polímeros pueden ser lineales, ramificados, con forma de estrella, etc.

[0019] Como se utiliza en el presente documento, el término «región» se refiere a una zona definida en la superficie de un material. Una región puede identificarse y delimitarse mediante una interfaz distinta entre dos materiales que tienen diferentes composiciones.

[0020] «Par de unión específica», como se usa en el presente documento, se refiere a dos moléculas que exhiben unión específica entre sí, o unión aumentada entre sí en relación con otras moléculas. Un par de unión específica puede exhibir actividad de unión funcional tal como, por ejemplo, un receptor y un ligando (tal como un fármaco, proteína o carbohidrato), un anticuerpo y un antígeno, etc.; o actividad de unión estructural tal como, por ejemplo, proteína/péptido y proteína/péptido; proteína/péptido y ácido nucleico; y nucleótido y nucleótido, etc. Normalmente, un miembro del par de unión puede servir como agente de captura en los dispositivos descritos en el presente documento, y el agente de captura puede unirse al segundo miembro del par de unión, que puede estar presente como un analito en una muestra tal como un fluido biológico. «Analito», tal como se utiliza en el presente documento, puede ser cualquier segundo miembro de un par de unión específica, como se ha descrito

anteriormente. Normalmente, el analito es un componente de una muestra tal como un fluido biológico o se encuentra en la misma. El analito puede ser un biomarcador como se ha descrito anteriormente.

5 **[0021]** Como se utiliza en el presente documento, el término «sujeto» y «paciente» se utilizan indistintamente y se refieren tanto a animales humanos como no humanos. El término «animales no humanos» incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, incluidos, pero sin carácter limitativo, primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles y similares. En ciertos modos de realización, el sujeto es un paciente humano.

10 **[0022]** En un sentido general, la exposición se refiere a un dispositivo que comprende un sustrato que comprende una superficie; una capa de polímero no incrustante en la superficie, al menos una región de captura en la capa de polímero, que comprende al menos un agente de captura; y al menos una región lábil en la capa de polímero, que comprende al menos un agente de detección y un excipiente; donde la región de captura y la región lábil se encuentran espacialmente separadas. La exposición también contempla métodos, ensayos y kits que comprenden el dispositivo. La capa de polímero no incrustante puede proporcionar la reducción de la unión no específica entre los componentes de la muestra y el sustrato y/o la capa de polímero. La región lábil en la capa de polímero puede permitir métodos y ensayos simplificados reduciendo las etapas necesarias implicadas en un ensayo típico tal como, por ejemplo, simplemente poner en contacto la superficie del dispositivo con una muestra y posteriormente detectar cualquier señal de la región de captura, al tiempo que proporciona límites de detección muy sensibles. Los dispositivos y los métodos asociados son muy adaptables a un número de configuraciones, incluyendo los laboratorios clínicos y de investigación, así como ensayos de punto de atención (POC, por sus siglas en inglés) a gran escala.

Sustratos

[0023] Se puede utilizar una variedad de diferentes tipos de sustratos según la exposición.

25 **[0024]** En modos de realización, el sustrato comprende una superficie que permite la aplicación de una capa de polímero. En algunos modos de realización, el sustrato es un detector óptico o de masa sin marcador (por ejemplo, un detector de energía de resonancia de plasmón superficial, una guía de onda óptica, un detector de elipsometría, etc.) y la superficie del sustrato es una superficie de detección (por ejemplo, una parte de superficie que estaría en contacto con un fluido biológico). Los ejemplos de dispositivos de este tipo incluyen, pero sin carácter limitativo, los descritos en las patentes estadounidenses N.º 6,579,721; 6,573,107; 6,570,657; 6,423,055; 5,991,048; 5,822,073; 5,815,278; 5,625,455; 5,485,277; 5,415,842; 4,844,613 y 4,822,135.

30 **[0025]** En otros modos de realización, el sustrato es un biosensor, una placa de ensayo, o similar. Por ejemplo, el sustrato puede ser un biosensor óptico, tal como los descritos en las patentes estadounidenses N.º 5,313,264, 5,846,842, 5,496,701, etc. El sustrato también puede ser un biosensor potenciométrico o electroquímico, tal como se describe en la patente estadounidense N.º 5,413,690 o la solicitud PCT WO98/35232. El sustrato puede ser un biosensor de película de diamante, tal como se describe en la patente estadounidense N.º 5,777,372. Por consiguiente, el sustrato puede ser orgánico o inorgánico; puede ser metálico (por ejemplo, cobre o plata) o no metálico; puede ser un polímero o un no polímero; puede ser conductor, semiconductor o no conductor (aislante); puede ser reflectante o no reflectante; puede ser poroso o no poroso; etc. Por ejemplo, el sustrato puede comprender polietileno, politetrafluoroetileno, poliestireno, tereftalato de polietileno, policarbonato, oro, silicio, óxido de silicio, oxinitruro de silicio, indio, óxido de tántalo, óxido de niobio, titanio, óxido de titanio, platino, iridio, óxido de indio y estaño, película de diamante o tipo diamante, etc.

[0026] El sustrato puede ser un sustrato adecuado para técnicas de química combinatoria "a base de chips" y "a base de agujas". Todos pueden prepararse según las técnicas conocidas. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5,445,934, 5,288,514 y 5,624,711.

45 **[0027]** Los sustratos como se describe anteriormente pueden formarse de cualquier material adecuado, incluyendo, pero sin carácter limitativo, un material seleccionado de entre el grupo consistente en metales, óxidos metálicos, aleaciones, semiconductores, polímeros (tales como polímeros orgánicos en cualquier forma adecuada incluyendo tejidos, no tejidos, moldeados, extruidos, fundidos, etc.), silicio, óxido de silicio, cerámica, vidrio y compuestos de los mismos.

50 **[0028]** Los polímeros utilizados para formar sustratos como se describe en el presente documento pueden ser cualquier polímero adecuado, incluyendo, pero sin carácter limitativo: polietileno (PE), polipropileno (PP), isómeros cis y trans de polibutadieno (PB), isómeros cis y trans de poliisopreno, tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), policarbonato (PC), poli(épsilon-caprolactona) (PECL o PCL), polimetilmetacrilato (PMMA) y sus homólogos, polimetilacrilato y sus homólogos, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico, poliortoésteres, polianhídridos, nailon, poliimidas, polidimetilsiloxano (PDMS), polibutadieno (PB), alcohol polivinílico (PVA), poliacrilamida y sus homólogos tales como poli(N-isopropil acrilamida), poliacrilato fluorado (PFOA), poli etileno-butileno (PEB), poli (estireno-acrilonitrilo) (SAN), politetrafluoroetileno (PTFE) y sus derivados, plastómeros de poliolefina, y combinaciones y copolímeros de los mismos, etc.

[0029] El sustrato puede tener opcionalmente una capa adicional tal como una capa de oro o de óxido formada sobre la superficie del sustrato, por ejemplo, para facilitar la deposición de una capa de polímero o una capa de enlace, como se analiza más adelante.

Capa de enlace

5 **[0030]** Dependiendo de la elección del sustrato y el polímero, se puede incluir opcionalmente una capa de enlace entre el sustrato y la capa de polímero. Por ejemplo, puede formarse una capa de enlace a partir de un compuesto que comprende un grupo de anclaje acoplado (por ejemplo, acoplado de forma covalente) a un iniciador (por ejemplo, acoplado directamente o acoplado a través de un grupo de enlace intermedio). La elección del grupo de anclaje dependerá del sustrato sobre el que se forme la capa de enlace, y la elección del iniciador
10 dependerá de la reacción particular utilizada para formar el polímero no incrustado como se analiza con mayor detalle a continuación.

[0031] El grupo de anclaje puede acoplar de forma covalente o no covalente el compuesto o la capa de enlace a la superficie del sustrato. El acoplamiento no covalente puede ser mediante cualquier interacción secundaria adecuada, incluyendo, pero sin carácter limitativo, interacciones hidrófobas, enlace de hidrógeno, fuerzas de van
15 der Waals, enlaces iónicos, interacciones de ligando metálico, etc.

[0032] Ejemplos de materiales de sustrato y grupos de anclaje correspondientes incluyen, por ejemplo, oro, plata, cobre, cadmio, zinc, paladio, platino, mercurio, plomo, hierro, cromo, manganeso, tungsteno y cualquier aleación de los mismos con grupos funcionales que contienen azufre tales como tioles, sulfuros, disulfuros (por ejemplo, -SR o -SSR donde R es H, alquilo tal como alquilo inferior o arilo), y similares; silicio impurificado o sin
20 impurificar con silanos y clorosilanos (por ejemplo, -SiR₂Cl donde R es H, alquilo tal como alquilo inferior o arilo); óxidos metálicos tales como sílice, alúmina, cuarzo, vidrio y similares con ácidos carboxílicos como grupos de anclaje; platino y paladio con nitritos e isonitritos; y cobre con ácidos hidroxámicos. Los grupos funcionales adecuados adicionales adecuados como grupo de anclaje incluyen benzofenonas, cloruros ácidos, anhídridos, epóxidos, grupos sulfonilo, grupos fosforilo, grupos hidroxilo, fosfonatos, ácidos fosfónicos, grupos de
25 aminoácidos, amidas y similares. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6,413,587.

[0033] Puede incorporarse cualquier iniciador adecuado al grupo de anclaje mediante la introducción de un enlace covalente en una ubicación no crítica para la actividad del iniciador. Ejemplos de tales iniciadores incluyen, pero sin carácter limitativo, bromoisobutirato, polimetilmetacrilato-Cl, poliestireno-Cl, AIBN, 2-bromoisobutirato, clorobenceno, hexabromometilbenceno, hexaclorometilbenceno, dibromoxileno, metilbromopropionato. Ejemplos adicionales de iniciadores incluyen aquellos iniciadores descritos en la patente
30 estadounidense N.º 6,413,587 (por ejemplo, en las columnas 10-11 de la misma) y aquellos iniciadores descritos en la patente estadounidense N.º 6,541,580.

[0034] Como se ha señalado anteriormente, se puede insertar un grupo de enlace o "espaciador" entre el grupo de anclaje y el iniciador. El enlazador puede ser polar, no polar, cargado positivamente, cargado negativamente o no cargado, y puede ser, por ejemplo, alquileno, heteroalquileno, aralquileno, alcarileno u otro hidrocarbilenos saturado o insaturado, lineal o ramificado, tal como hidrocarbilenos halogenado, en particular hidrocarbilenos fluorado. Los enlazadores adecuados son grupos alquileno saturados de 3 a 20 átomos de carbono, es decir, -
35 (CH₂)_n-, donde n es un número entero de 3 a 20 inclusive. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6,413,587. Otro modo de realización adecuado del enlazador es un oligoetilenglicol de 3 a 20 unidades, es decir, -(CH₂CH₂O)_n- donde n es un número entero de 3 a 20 inclusive.
40

[0035] La capa de anclaje puede depositarse mediante cualquier técnica adecuada. Puede depositarse como una monocapa autoensamblada. Puede crearse mediante la modificación del sustrato por reacción química (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6,444,254) o mediante grabado por plasma reactivo o tratamiento de descarga en corona. Puede depositarse mediante un proceso de deposición de plasma. Puede depositarse mediante recubrimiento por rotación o recubrimiento por inmersión. Puede depositarse mediante pintura en aerosol. También puede depositarse mediante deposición, impresión, estampado, etc. Puede depositarse como una capa continua o como una capa discontinua (por ejemplo, modelada).
45

[0036] En algunos modos de realización, el sustrato puede ser vidrio, óxido de silicio u otro material inorgánico o semiconductor (por ejemplo, óxido de silicio, nitruro de silicio) o semiconductores compuestos (por ejemplo, arseniuro de galio y arseniuro de indio y galio) comúnmente utilizados para la producción de micromatrices. En algunos modos de realización, el sustrato puede ser una placa de microtitulación (micropocillos).
50

[0037] En algunos modos de realización, el grupo de anclaje puede ser un silano o clorosilano (por ejemplo, -SiR₂Cl donde R es H, alquilo, tal como alquilo inferior, o arilo).

[0038] En algunos modos de realización, la capa de enlace se forma sobre el sustrato en dos etapas independientes. Por ejemplo, en una primera etapa, se puede depositar una capa de anclaje de alquilsilano o alcanotiol sobre una superficie tal como dióxido de silicio o vidrio u oro, y presenta un grupo funcional reactivo terminal (por ejemplo, amina). Posteriormente, una molécula bifuncional, que comprende un primer grupo funcional reactivo hacia el grupo terminal presentado por la primera capa de enlace, se puede hacer reaccionar
55

con la primera capa de enlace depositada en la primera etapa. El segundo grupo funcional de la molécula bifuncional contiene un grupo de fracción que actúa como un iniciador para la polimerización de la capa de polímero, tal como un iniciador ATRP.

Capa de polímero

5 **[0039]** Las capas de polímero de los dispositivos descritos en el presente documento exhiben propiedades no incrustantes. No incrustante, como se utiliza en el presente documento con respecto a la capa de polímero, se refiere a la inhibición (por ejemplo, reducción o prevención) del crecimiento de un organismo así como a interacciones de unión no específica o adventicia entre el polímero y un organismo o biomolécula (por ejemplo, célula, proteína, nucleótido, etc.). La propiedad no incrustante del polímero puede introducirse mediante
10 cualquier método adecuado tal como, por ejemplo, la incorporación de un agente no incrustante (o, de forma alternativa, antiincrustante) o por la estructura/arquitectura del polímero en sí. Los agentes no incrustantes se conocen en la técnica y pueden ser seleccionados por un experto dependiendo del uso particular del dispositivo, o de la disponibilidad del agente no incrustante. Los ejemplos no limitantes incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos que presentan actividad biocida, así como compuestos, que se pueden incorporar con la capa de
15 polímero o unirse a la misma, que reducen o inhiben la interacción de unión no específica de una biomolécula (por ejemplo, célula, proteína, nucleótido, carbohidrato/lípido) con el polímero al entrar en contacto.

[0040] Algunos modos de realización proporcionan una capa de polímero que presenta una estructura o arquitectura que proporciona una propiedad no incrustante. En algunos modos de realización, el polímero puede incluir adecuadamente polímeros cepillo, que, en general, se forman mediante la polimerización de grupos de
20 núcleo monomérico que presentan uno o más grupos que funcionan para inhibir la unión de una biomolécula (por ejemplo, célula, proteína, nucleótido, carbohidrato/lípido) acoplada al mismo. De forma adecuada, el grupo de núcleo monomérico se puede acoplar a un grupo de cabeza resistente a proteínas.

[0041] Las capas de polímero se pueden formar de forma adecuada utilizando técnicas de polimerización por radicales, tales como polimerización por transferencia de cadena catalítica, polimerización mediada por iniferter
25 (por ejemplo, polimerización mediada por fotoiniferter), polimerización por radicales libres, polimerización mediada por radicales libres estables (SFRP, por sus siglas en inglés), polimerización por radicales por transferencia de átomos (ATRP, por sus siglas en inglés) y polimerización por adición-fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT, por sus siglas en inglés).

[0042] Por ejemplo, la polimerización por radicales libres de monómeros para formar polímeros cepillo puede llevarse a cabo según técnicas conocidas, tal como se describe en las patentes estadounidenses N.º 6,423,465,
30 6,413,587 y 6,649,138, la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0108879 y variaciones de las mismas que resultarán evidentes para los expertos en la materia.

[0043] La polimerización por radicales por transferencia de átomos de monómeros para formar polímeros cepillo también puede llevarse a cabo según técnicas conocidas, tal como se describe en las patentes estadounidenses
35 N.º 6,541,580 y 6,512,060, la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0185741 y variaciones de las mismas que resultarán evidentes para los expertos en la materia.

[0044] Se puede usar cualquier monómero de vinilo de núcleo adecuado polimerizable mediante los procesos analizados anteriormente, incluidos, pero sin carácter limitativo, estirenos, acrilonitrilos, acetatos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, alcoholes vinílicos, ácidos vinílicos y combinaciones de los mismos.

40 **[0045]** En algunos modos de realización, la capa de polímero se forma mediante ATRP iniciada superficialmente (SI-ATRP, por sus siglas en inglés) de oligo(etilenglicol)metil metacrilato (OEGMA) para formar una película de poli(OEGMA) (POEGMA). En un modo de realización, la capa de polímero es una película de POEGMA funcionalizada preparada mediante copolimerización de un metacrilato y OEGMA con grupos terminales metoxílicos. De forma adecuada, el polímero de POEGMA se puede formar en una única etapa.

45 **[0046]** En general, las moléculas cepillo formadas por los procesos descritos en el presente documento (u otros procesos conocidos en la técnica o que resultarán evidentes para los expertos en la materia), pueden tener una longitud desde 2 o 5 hasta 100 o 200 nanómetros, o más, y pueden depositarse en la parte de la superficie a una densidad desde 10, 20 o 40 hasta 100, 200 o 500 miligramos por metro, o más.

50 **[0047]** Los grupos resistentes a proteínas pueden ser grupos de cabeza hidrófilos o cosmótopos. Los ejemplos incluyen, pero sin carácter limitativo, oligosacáridos, tri(propil sulfóxido), hidroxilo, glicerol, fosforilcolina, tri(sarcosina) (Sarc), N-acetilpiperazina, betaína, carboxibetaína, sulfobetaína, sorbitol permetilado, hexametilfosforamida, un zwitterión intramolecular (por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) (ZW) y manitol.

[0048] Ejemplos adicionales de grupos de cabeza resistentes a proteínas de cosmótopo incluyen, pero sin carácter limitativo:

55 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$;
 $-\text{O}(\text{Manitol})$;
 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2(\text{CH}(\text{OCH}_3))_4\text{CH}_2\text{OCH}_3$;

- $N(CH_3)_3^+ Cl^- - SO_3^- Na^+$ (1:1);
 $-N(CH_3)_2^+ CH_2CH_2SO_3^-$;
 $-C(O)Pip(NAc)$ (Pip = piperazinil)
 $-N(CH_3)_2^+ CH_2CO_2^-$;
 5 $-O([Glc-\alpha(1,4)-Glc-\beta(1)])$;
 $-C(O)(N(CH_3)CH_2C(O))_3N(CH_3)_2$;
 $-N(CH_3)_2^+ CH_2CH_2CH_2SO_3^-$;
 $-C(O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)P(O)(N(CH_3)_2)_2^-$; y
 $-(S(O)CH_2CH_2CH_2)_3S(O)CH_3$.

10 **[0049]** Véase, por ejemplo, R. Kane *et al.*, Langmuir 19, 2388-91 (2003) (por ejemplo, Tabla 1).

[0050] En algunos modos de realización, un grupo de cabeza resistente a proteínas adecuado comprende polietilenglicol (PEG), por ejemplo PEG de 3 a 20 unidades monoméricas.

15 **[0051]** Antes de la deposición de componentes adicionales sobre la capa de polímero, el sustrato con la capa de enlace opcional y la capa de polímero puede estar seco o al menos macroscópicamente seco (es decir, seco al tacto o seco a inspección visual, pero retener agua ligada o agua de hidratación en la capa de polímero). Por ejemplo, para mejorar la inmovilización de un agente de captura, la capa de polímero puede retener de forma adecuada agua ligada o agua de hidratación, pero no el agua superficial masiva. Si el sustrato con la capa de enlace y la capa de polímero se ha almacenado en forma desecada, se puede reintroducir agua ligada o agua de hidratación exponiendo rápidamente la capa de polímero al agua (por ejemplo, sumergiéndola en agua) y
 20 posteriormente secando la superficie (por ejemplo, con un chorro de nitrógeno o de argón). De forma alternativa, el agua ligada o el agua de hidratación puede reintroducirse exponiendo la capa de polímero al aire ambiente durante un tiempo suficiente para que el agua atmosférica se una a la capa de polímero.

Región de captura

25 **[0052]** El dispositivo comprende al menos una región de captura que comprende al menos un agente de captura, que puede estar unido de forma no covalente a la capa de polímero. El número de regiones de captura puede variar ampliamente y puede depender de varios factores, incluyendo el tamaño y la forma del sustrato, el uso previsto del dispositivo (por ejemplo, un diagnóstico de punto de atención, una matriz de panel (por ejemplo, micromatrices para examinar el ADN, MMChips (microARN), proteínas, tejidos, celulares, compuestos químicos, anticuerpos, carbohidratos, etc.) y similares. El agente de captura que comprende una región de captura es
 30 generalmente un miembro de un par de unión específica. Los ejemplos de agentes de captura adecuados incluyen, pero sin carácter limitativo, antígenos, anticuerpos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, aptámeros de péptidos o de ácidos nucleicos, ligandos, receptores y similares. Los modos de realización se refieren a un dispositivo que comprende una pluralidad de regiones de captura que pueden comprender una pluralidad de agentes de captura diferentes tales como, por ejemplo, una matriz de panel de diagnóstico.

35 **[0053]** En los modos de realización, el agente de captura puede comprender un biomarcador asociado a cualquier enfermedad, trastorno o estado biológico de interés. Por consiguiente, la selección del agente de captura puede estar motivada por la aplicación o el uso previsto del dispositivo y los métodos descritos en el presente documento y puede incluir cualquier molécula que se sepa que está asociada a una enfermedad, trastorno o estado biológico de interés, o cualquier molécula que se sospeche que está asociada a una
 40 enfermedad, trastorno o estado biológico de interés. Por lo tanto, la selección de un agente de captura se encuentra dentro de la capacidad de un experto en la materia, en función del conocimiento disponible en la técnica.

45 **[0054]** En algunos modos de realización, el agente de captura puede comprender un biomarcador asociado a cualquier infección microbiana de interés, ejemplos de los cuales incluyen, pero sin carácter limitativo: ántrax, gripe aviar, botulismo, Buffalopox, Chikungunya, cólera, coccidioidomycosis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, dengue, fiebre hemorrágica del dengue, difteria, fiebre hemorrágica del Ébola, Ehec (E. Coli 0157), encefalitis, Saint-Louis, infección por escherichia coli enterohemorrágica, enterovirus, enfermedad de transmisión alimentaria, fiebre hemorrágica con síndrome renal, síndrome pulmonar por hantavirus, hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), gripe, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa,
 50 legionelosis, leishmaniasis, leptospirosis, listeriosis, tífus Louseborne, malaria, fiebre hemorrágica de Marburgo, sarampión, enfermedad meningocócica, viruela de los monos, miocarditis, virus de Nipah, fiebre de O'Nyong-Nyong, tos ferina, peste, poliomiélitis, rabia, fiebre recurrente, fiebre del Valle del Rift, síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), shigelosis, exposición accidental a la vacuna de la viruela, intoxicación por alimentos estafilocócicos, sífilis, tularemia, fiebre tifoidea, virus del Nilo occidental, fiebre amarilla, etc.

55 **[0055]** El agente de captura puede depositarse sobre la capa de polímero mediante cualquier técnica adecuada, como microimpresión o microestampación, incluyendo impresión piezoeléctrica u otras formas de impresión sin contacto y de impresión de manguito de contacto directo. Cuando el agente de captura se imprime en la capa de polímero, puede absorberse adecuadamente en la capa de polímero de manera que permanezca unido cuando el dispositivo se exponga a un fluido, tal como un fluido biológico. El polímero cepillo también puede proporcionar
 60 un entorno protector, de manera que el agente de captura permanezca estable cuando se almacene el

dispositivo. Por ejemplo, en modos de realización en los que el agente de captura es un péptido o proteína, tal como una proteína antigénica o un anticuerpo, una capa de polímero cepillo puede proteger el agente de captura contra la degradación, permitiendo que el dispositivo se almacene en condiciones ambientales.

5 **[0056]** Cuando se forma una matriz mediante la deposición de múltiples agentes de captura en ubicaciones separadas sobre la capa de polímero, se pueden realizar densidades de sonda de 1, 3, 5, 10, 100 o hasta 1000
 10 ubicaciones de sonda por cm^2 . En la etapa de deposición se pueden utilizar *arrayers* sin contacto modernos para producir matrices con hasta 1 000 000 de ubicaciones de sonda por cm^2 . Por ejemplo, usando nanolitografía dip-
 pen, pueden prepararse matrices con hasta mil millones de ubicaciones de sonda separadas por cm^2 . Se entenderá que las especies moleculares específicas en cada punto de captura pueden ser diferentes, o algunas
 15 pueden ser las mismas (por ejemplo, para proporcionar cierta redundancia o control), dependiendo de la aplicación particular, tal como se describe en el presente documento.

[0057] El agente de captura se puede imprimir sobre la capa de polímero para formar la región de captura. La región o las regiones de captura pueden disponerse de cualquier manera particular y pueden comprender cualquier forma o patrón deseable tal como, por ejemplo, puntos (por ejemplo, de cualquier forma geométrica
 15 general), líneas u otros patrones adecuados que permitan la identificación de la región de captura en la superficie del polímero y el sustrato. En los modos de realización, una pluralidad de agentes de captura pueden disponerse en un patrón predeterminado de manera que la identidad del agente de captura se asocie a una ubicación específica en el sustrato.

Región lábil

20 **[0058]** El dispositivo comprende de forma adicional al menos una región lábil que comprende al menos un agente de detección y un excipiente. En algunos modos de realización, un agente de captura puede permanecer unido de forma no covalente a la capa de polímero (por ejemplo, cepillo de polímero) al entrar en contacto con un fluido tal como un fluido biológico, tampón o disolvente acuoso, mientras que el excipiente presente en la región lábil puede absorberse en el cepillo de polímero y bloquear la absorción del agente de detección. Por
 25 consiguiente, cuando se expone a un fluido acuoso tal como, por ejemplo, una muestra que comprende un fluido biológico, el agente de detección puede solubilizarse y liberarse en el fluido, y puede unirse a un analito de interés. El excipiente también puede estabilizar de forma adicional el agente de detección durante el almacenamiento.

[0059] En algunos modos de realización, el agente de detección puede comprender un compuesto capaz de unirse a un segundo miembro de un par de unión específica. Cuando se solubiliza y se libera en la muestra (por ejemplo, un fluido biológico), si el segundo miembro del par de unión específica está presente en el fluido, puede unirse al agente de detección. El segundo miembro puede unirse entonces al agente de captura en la región de captura del dispositivo. De forma alternativa, el agente de detección puede encontrarse con el segundo miembro de un par de unión específica cuando ya está unido al agente de captura. Por ejemplo, si el agente de captura es
 30 una proteína antigénica y el analito es un anticuerpo generado por un paciente que puede unirse específicamente a la proteína antigénica, el agente de detección puede comprender un anticuerpo antihumano.

[0060] En algunos modos de realización, la región lábil puede comprender dos agentes diferentes para formar un ensayo de tipo "sándwich". En modos de realización de este tipo, un primer agente puede unirse al analito mientras que el otro agente se une al primer agente para formar un "sándwich" que después puede unirse al agente de captura. Por ejemplo, el agente de detección puede comprender biotina, que puede unirse a avidina o estreptavidina que está funcionalizada con una fracción de detección.
 40

[0061] El agente de detección comprende además una fracción detectable que, directa o indirectamente, proporciona una señal detectable. Las fracciones de detección de ejemplo incluyen, pero sin carácter limitativo, fluoróforos, cromóforos, radiomarcadores, polinucleótidos, moléculas pequeñas, enzimas, nanopartículas y convertidores elevadores. En algunos modos de realización, la fracción de detección puede ser un fluoróforo tal como una cianina (por ejemplo, CyDyes tal como Cy3 o Cy5), una fluoresceína, una rodamina, una cumarina, una proteína fluorescente o un fragmento funcional de la misma, o puede comprender una molécula pequeña tal como biotina, o puede comprender partículas de oro, plata o látex.
 45

[0062] En algunos modos de realización, el excipiente es una molécula o una combinación de moléculas que se selecciona para permitir una asociación estable, pero no permanente, entre el agente de detección y el polímero. En modos de realización, el excipiente puede ser parcialmente soluble, sustancialmente soluble o soluble en una solución acuosa (por ejemplo, tampón, agua, muestra, fluido biológico, etc.). En modos de realización de este tipo, el excipiente puede seleccionarse de entre los ejemplos no limitantes de sales, carbohidratos (por ejemplo, azúcares, tales como glucosa, fucosa, fructosa, maltosa y trehalosa), polioles (por ejemplo, manitol, glicerol, etilenglicol), emulsionantes, polímeros solubles en agua y cualquier combinación de los mismos. Dichos excipientes se conocen bien en la técnica y pueden seleccionarse en función de la interacción entre el excipiente y el agente de detección, el excipiente y el polímero, la solubilidad del excipiente en un medio particular y cualquier combinación de estos factores. En algunos modos de realización, el excipiente comprende PEG.
 50
 55

5 **[0063]** El agente de detección y el excipiente pueden depositarse sobre la capa de polímero mediante cualquier técnica adecuada, como microimpresión o microestampación, incluyendo impresión piezoeléctrica u otras formas de impresión sin contacto y de impresión de manguito de contacto directo. Puede depositarse simultáneamente una mezcla del agente de detección y el excipiente, o puede depositarse el excipiente antes que el agente de detección.

10 **[0064]** Cuando se forma una matriz mediante la deposición de múltiples agentes de detección en ubicaciones separadas sobre la capa de polímero, se pueden realizar densidades de sonda de 1, 3, 5, 10, 100 o hasta 1000 ubicaciones de sonda por cm². En la etapa de deposición se pueden utilizar *arrayers* sin contacto modernos para producir matrices con hasta 1 000 000 de ubicaciones de sonda por cm². Por ejemplo, utilizando nanolitografía dip-pen, pueden prepararse matrices con hasta mil millones de ubicaciones de sonda separadas por cm². Se entenderá que las especies moleculares específicas en cada punto de captura pueden ser diferentes, o algunas pueden ser las mismas (por ejemplo, para proporcionar cierta redundancia o control), dependiendo de la aplicación particular.

Otros elementos

15 **[0065]** En algunos modos de realización, el dispositivo puede comprender además un agente para delimitar una región con patrón en la capa de polímero, de manera que un fluido (por ejemplo, un fluido biológico) permanezca confinado en una región específica en la capa de polímero de manera que entre en contacto con la región de captura y la región lábil. Dicho agente puede ser, por ejemplo, una tinta hidrófoba impresa en la capa de polímero antes de la deposición del agente de captura y los componentes de la región lábil. De forma alternativa, el agente puede ser una cera. En otros modos de realización, la muestra puede estar contenida o dirigida en el dispositivo mediante la selección de una geometría y/o arquitectura adecuada para el sustrato, por ejemplo, una geometría que permita que la muestra se esparza por las regiones que comprenden el agente de captura y los componentes del punto lábil. En algunos modos de realización, el sustrato puede comprender un pocillo o una serie de pocillos interconectados.

20 **[0066]** En algunos modos de realización, por ejemplo cuando el fluido biológico es una muestra de sangre, la región lábil puede comprender un anticoagulante para evitar que la sangre coagule. Los anticoagulantes de ejemplo incluyen, pero sin carácter limitativo, antagonistas de la vitamina K tales como coumadin, heparinas y heparinas de bajo peso molecular.

25 **[0067]** En algunos modos de realización, el dispositivo puede comprender además regiones impresas con agentes de control. Por ejemplo, cuando el agente de detección comprende un anticuerpo antihumano, las regiones de captura de control de IgG humana se pueden imprimir junto a las regiones de captura para verificar la actividad del anticuerpo de detección antihumano y para normalizar la señal de la fracción de detección, tal como intensidades de fluorescencia

Almacenamiento del dispositivo

30 **[0068]** Después de la deposición del agente de captura, el agente de detección, el excipiente y otros componentes opcionales, el dispositivo se seca opcionalmente, por ejemplo, mediante desecación suave, secado por soplado, liofilización o exposición al aire ambiente a temperatura ambiente, durante un tiempo suficiente para que el artículo esté seco o al menos macroscópicamente seco como se describe anteriormente. Una vez que el dispositivo está seco o al menos macroscópicamente seco, puede sellarse en un recipiente (por ejemplo, tal como un recipiente polimérico impermeable o semipermeable) en el que puede almacenarse y enviarse a un usuario. Una vez sellado en un recipiente, el dispositivo puede tener, en algunos modos de realización, una vida útil de almacenamiento de al menos 2 a 4 meses, o hasta 6 meses o más, cuando se almacena a una temperatura de 25° C (por ejemplo, sin pérdida de más de 20, 30 o 50 por ciento de la actividad de unión).

Detección

35 **[0069]** Después de la exposición de un dispositivo descrito en el presente documento a una muestra biológica (por ejemplo, un fluido biológico), puede detectarse una señal del agente de detección utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los métodos de ejemplo incluyen, pero sin carácter limitativo, detección visual, detección por fluorescencia (por ejemplo, microscopía de fluorescencia), recuento de centelleo, resonancia de plasmón superficial, elipsometría, microscopía de fuerza atómica, detección de dispositivo de ondas acústicas de superficie, autorradiografía y quimioluminiscencia. Como entenderá un experto en la materia, la elección del método de detección dependerá del agente de detección específico empleado.

Kits

40 **[0070]** En algunos modos de realización, la exposición también proporciona un kit para su uso en un método descrito en el presente documento. Un kit puede incluir un dispositivo como se describe en el presente documento, y opcionalmente componentes adicionales tales como tampones, reactivos e instrucciones para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento. La elección de tampones y reactivos dependerá de la aplicación particular, por ejemplo, configuración del ensayo (punto de atención, investigación, clínica),

analito(s) que se han de analizar, la fracción de detección utilizada, etc. Por ejemplo, si el agente de captura es un polinucleótido y el analito de interés es un polinucleótido complementario, el kit puede incluir un tampón de lisis para agregar a la muestra de fluido biológico, para hacer que el polinucleótido de la muestra esté disponible para la unión.

5 **[0071]** El kit también puede incluir material informativo, que puede ser descriptivo, instructivo, de marketing u otro material que esté relacionado con los métodos descritos en el presente documento y/o el uso de los dispositivos para los métodos descritos en el presente documento. En modos de realización, el material informativo puede incluir información sobre la producción del dispositivo, las propiedades físicas del dispositivo, la fecha de caducidad, la información del lote o del lugar de producción, etcétera.

10 Diseño de ensayo de ejemplo

[0072] Los siguientes párrafos describen un modo de realización no limitativo de la exposición con más detalle.

15 **[0073]** En algunos modos de realización, la exposición proporciona un chip desechable que permite ensayos miniaturizados multiplexados que pueden analizar un fluido biológico para una o más enfermedades infecciosas de interés. En algunos modos de realización, los ensayos pueden llevarse a cabo en una sola etapa. En determinados modos de realización, los ensayos pueden llevarse a cabo sin necesidad de procesamiento previo o microfluidos. Además de los puntos de captura estables para unir los biomarcadores de interés, los dispositivos también incluyen micropuntos lábiles que permiten imprimir agentes de detección secundarios junto a los agentes de captura. Tras la puesta en contacto con una gota de un fluido biológico, estos reactivos secundarios en los puntos lábiles pueden disolverse en la solución y marcar un blanco presente en la muestra.

20 **[0074]** En un modo de realización de esta tecnología, y como se muestra en la FIG. 1, un ensayo según la descripción comprende, consta de, o consta esencialmente de un chip desechable que ha sido recubierto con POEGMA y después impreso con una tinta hidrófoba que delimita una región estampada de POEGMA. En la FIG. 2 se resume el procedimiento utilizado para sintetizar los cepillos de POEGMA sobre un sustrato de vidrio. La región de patrón contiene puntos de agentes de captura individuales. La naturaleza hidrófila del cepillo de
25 POEGMA permite que una gota de sangre se esparza por toda la superficie de POEGMA mientras que la tinta hidrófoba crea un "corral" que puede confinar la gota de sangre en la región de análisis. La región estampada de POEGMA también contiene "puntos lábiles" que incluyen anticuerpos de detección marcados de forma fluorescente y polietilenglicol soluble.

30 **[0075]** En algunos modos de realización, los agentes de captura en los puntos de captura pueden ser antígenos que son diagnósticos para una EI de interés. Cuando se aplica una muestra de fluido (por ejemplo, sangre) de un paciente al chip, los anticuerpos generados por el paciente en la muestra pueden unirse al antígeno. En modos de realización de este tipo, los puntos lábiles pueden incluir anticuerpos antihumanos marcados de forma fluorescente que se pueden unir a los anticuerpos inmovilizados generados por el paciente. En la FIG. 3 se ilustra tal modo de realización del ensayo.

35 **[0076]** En otros modos de realización, los agentes de captura en los puntos de captura pueden ser anticuerpos a antígenos que son diagnósticos para una EI de interés. Cuando se aplica una muestra de fluido (por ejemplo, sangre) de un paciente al chip, los antígenos generados por el paciente en la muestra pueden unirse al anticuerpo. En modos de realización de este tipo, los puntos lábiles pueden incluir anticuerpos marcados de forma fluorescente que son específicos para un epítipo diferente en el mismo antígeno, que pueden unirse al
40 antígeno inmovilizado generado por el paciente. En la FIG. 4 se ilustra tal modo de realización del ensayo.

[0077] En determinados modos de realización, las proteínas antigénicas o anticuerpos que se han de usar como agentes de captura se detectan en la superficie de POEGMA como una fila de puntos individuales de cada antígeno, con el fin de proporcionar réplicas independientes y mejorar de ese modo la solidez del ensayo. Por ejemplo, una micromatriz que contiene micropuntos de densidad de anticuerpos de captura variable puede permitir que un rango mucho más amplio de concentraciones de analito esté comprendida en el rango dinámico de un detector dado y, por lo tanto, puede eliminar la serie de dilución de pruebas generalmente realizadas de una única muestra. Las concentraciones bajas de analito pueden detectarse en regiones de alta densidad de anticuerpos de captura, mientras que las altas concentraciones de analito pueden detectarse en regiones de baja densidad de anticuerpos de captura.

50 **[0078]** Como se representa en la FIG. 5, las matrices pueden formatearse de manera que se garantice que los puntos de anticuerpo de detección se disuelven al entrar en contacto con una muestra de sangre. En la figura, se imprimen como puntos doce regiones de captura separadas, cada una con cuatro puntos de tres agentes de captura diferentes. Alrededor de los puntos de captura se imprimen regiones lábiles que incluyen anticuerpos antihumanos marcados con Cy5 como agentes de detección.

55 **[0079]** El PEG soluble también está incluido en los puntos lábiles. El PEG soluble puede absorberse preferiblemente en el cepillo de POEGMA y bloquear la adsorción del anticuerpo de detección en el cepillo. Por consiguiente, los anticuerpos de detección, aunque confinados en puntos debido a la impresión de inyección piezoeléctrica y al proceso de secado macroscópico, están de hecho en un estado "lábil" en el que pueden

disolverse fácilmente y liberarse en la gota de sangre al entrar en contacto con una solución acuosa. La adición de exceso de PEG soluble también puede estabilizar el anticuerpo de detección marcado de forma fluorescente durante el almacenamiento y puede servir como un excipiente que ayuda a resolubilizar el anticuerpo de detección cuando se introduce la gota de sangre de prueba.

5 **[0080]** Al entrar en contacto con una gota de sangre, los anticuerpos de detección marcados se disolverán en la solución. En algunos modos de realización, el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo antihumano que se puede unir a todos los anticuerpos humanos presentes en la muestra de sangre y marcarlos de esta manera. Simultáneamente, los analitos presentes en la sangre, si están presentes (es decir, anticuerpos generados por el paciente contra los antígenos) pueden unirse a puntos de antígeno impresos de forma estable. En otros modos
10 de realización, el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo específico para un antígeno de interés. Al entrar en contacto con la muestra de sangre, si el antígeno está presente en la muestra, el anticuerpo de detección puede unirse al antígeno, que a su vez puede unirse al anticuerpo del agente de captura.

[0081] Como controles positivos, pueden imprimirse puntos de IgG humana junto con los puntos de antígeno. Estas servirán para verificar la actividad del anticuerpo de detección antihumano y también pueden utilizarse
15 para normalizar las intensidades de fluorescencia a través de ensayos para reducir la variabilidad entre ensayos.

[0082] Con el fin de evitar la coagulación de la sangre, también puede imprimirse la enzima heparina sobre el cepillo de POEGMA en los puntos lábiles. La heparina puede mezclarse con PEG antes de la impresión, o puede imprimirse en sí en una etapa separada.

[0083] En un modo de realización, y como se muestra a continuación en la FIG. 6, se puede administrar una
20 punción capilar al paciente y aplicar la gota de sangre resultante en la superficie del chip. La tinta hidrófoba impresa sobre la superficie del chip provoca que la gota de sangre se extienda solo a través de la región de detección blanco(s), donde se disuelve en agentes de detección solubles y heparina (para evitar la coagulación de la sangre) impresa dentro de la región de detección.

[0084] A medida que los anticuerpos de detección solubilizados marcados de forma fluorescente se disuelven a
25 partir de sus puntos impresos por la gota de sangre, deben ocurrir tres acontecimientos en serie para generar una señal positiva. Estos acontecimientos incluyen lo siguiente: (1) la unión de los analitos presentes en la sangre a los puntos inmovilizados y no fluorescentes de los agentes de captura individuales crea la primera mitad del sándwich; (2) la difusión de la sangre lateralmente a través del cepillo de polímero da como resultado el movimiento de anticuerpos de detección solubles desde sus puntos impresos; (3) al introducir un complejo de
30 agente de captura y analito (primera mitad del sándwich), los anticuerpos de detección marcados de forma fluorescente se unen a sus respectivos puntos de analito-agente de captura, completando el sándwich y dando como resultado la formación de un punto fluorescente en la posición donde se había impreso el agente sin marcar.

[0085] En este modo de realización, el ensayo se basa en información respaldada de que los anticuerpos de
35 detección marcados de forma fluorescente que se imprimen como «puntos lábiles» se transportan por el flujo del torrente a filas adyacentes de agentes de captura impresos y establemente inmovilizados por difusión de la solución que contiene el analito. Por lo tanto, la visualización de la aparición de fluorescencia de los puntos impresos con los diferentes agentes de captura proporciona una identificación inequívoca de diferentes analitos (positivos). La cuantificación de la concentración de los diferentes analitos se lleva a cabo de forma idéntica a un
40 inmunoensayo de fluorescencia convencional calibrando previamente el dispositivo utilizando una serie de dilución de los analitos incorporados a la sangre total.

[0086] El ensayo según el presente modo de realización aborda cada una de las necesidades esenciales en las
45 pruebas POC de la siguiente manera: (1) el coste de las pruebas de EI se reducirá mediante la miniaturización, la multiplexación, el procesamiento *in situ* en una sola etapa, y al realizar pruebas directamente en la sangre total sin diluir obtenida de una punción capilar sin procesamiento previo ni microfluidos; (2) con el fin de simplificar el proceso de detección de EI, la difusión en dos dimensiones de reactivos espacialmente localizados para crear un ensayo funcional y eliminando de esta manera la necesidad de etapas de transferencia de líquidos, la manipulación microfluidica de muestras o reactivos y las etapas de lavado; (3) esta plataforma multiplexada es capaz de detectar un panel de marcadores de EI con una sola gota de sangre sin procesamiento previo de la
50 muestra; (4) el ensayo será rápido, lo que mitigará las dificultades a menudo asociadas a la comunicación del resultado de la prueba de EI; y (5) el esquema de detección real del diseño dado a conocer es un inmunoensayo fluorescente tipo sándwich, que ofrece la sensibilidad más alta actualmente disponible en el campo.

[0087] Una mejora en la detección de EI de esta magnitud podría afectar sustancialmente a la salud de toda la
55 población humana. Para controlar las enfermedades infecciosas, una parte del proceso es la detección regular para identificar los diversos patógenos transmitidos a través del aire, la comida, el agua o el contacto físico, y se cree que desarrollar la plataforma de detección propuesta hará que la detección de EI regular y exhaustiva sea mucho más accesible a un porcentaje mucho más grande de la población. Finalmente, el diseño altamente adaptable y modular resulta útil también en la utilización como diagnóstico para muchas otras áreas de necesidad, incluyendo la monitorización de biomarcadores en ensayos clínicos, detección de pandemias,
60 biodefensa y verificación a gran escala de biomarcadores recientemente descubiertos.

Métodos de detección de EI

[0088] Las siguientes secciones describen varios obstáculos de los métodos actuales de detección de EI y cómo se resuelve cada uno mediante, por ejemplo, el modo de realización descrito anteriormente.

Coste

5 **[0089]** La prueba más precisa basada en inmunoensayos para un único marcador de enfermedad infecciosa se conoce como el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por su siglas en inglés) que cuesta aproximadamente 16 USD y requiere un promedio de 6 horas de tiempo del técnico por marcador probado. Las recientes mejoras que permiten la multiplexación ahora son capaces de probar una matriz de cuatro agentes infecciosos a un coste de aproximadamente 14 USD y requiere un promedio de aproximadamente 4,5 horas de tiempo del técnico. Sin embargo, estas pruebas requieren el uso de aproximadamente 110 000 USD - 160 000 USD en equipo de laboratorio. Además, cada prueba requirió el uso de aproximadamente 200 µl de suero o plasma, que deben separarse de una muestra de sangre total extraída de un paciente mediante extracción de sangre venosa. Esta extracción de sangre se realiza generalmente en el punto de atención y después debe transportarse a un laboratorio centralizado para la prueba real.

10 **[0090]** El dispositivo el presente modo de realización reduce significativamente los costes al simplificar los aspectos clave de la recogida, el procesamiento y el análisis de muestras de la siguiente manera: (1) eliminación de todo procesamiento previo analizando directamente sangre total no diluida obtenida de una punción capilar; (2) miniaturización de pruebas para disminuir la cantidad de reactivos: los antígenos proteicos que se detectan como agentes de captura y los anticuerpos de detección; y (3) procesamiento *in situ* en una única etapa. Además, la prueba puede multiplexarse y puede dirigirse a un panel de EI sin aumentar significativamente el coste sobre el de una prueba para una única EI. Esto puede lograrse sin el uso de procesamiento previo de la muestra o el uso de microfluidos para separar células de las soluciones de analito debido a un cepillo único de polímero resistente a proteínas y células que permite realizar fluoroinmunoensayos con límite de detección femtomolar de sangre total, que se describe con más detalle en el presente documento.

15 **[0091]** Los modos de realización que proporcionan una prueba multiplexada crean ventajas adicionales. Se han centrado mucho en las EI que reciben la mayor atención de los medios, como el VIH, dando lugar a una falta general de deseo o urgencia de que se realicen pruebas a la población general en busca de otras EI. Una solución adecuada para este problema es proporcionar una prueba para un panel completo de EI siempre que se solicite una prueba para una única EI, lo que puede provocar solo un coste incremental en relación con una prueba dirigida a una única EI. La miniaturización de los dispositivos descritos en el presente documento ayuda a contener los costes debido a las cantidades en picolitro muy pequeñas de los reactivos de captura y los anticuerpos de detección que se imprimirán en los dispositivos descritos en el presente documento. La multiplexación también podría ayudar con la incomodidad que algunas personas experimentan al solicitar una prueba específica para una enfermedad estigmatizada como el VIH, ya que sería una de las varias EI encontradas en el chip. Tener una prueba multiplexada que cubra muchas EI, incluidas las EI transmitidas por los alimentos y por el aire, permitiría que las personas se sintieran menos aprensivas a solicitar pruebas. Además, la aplicación novedosa de superficies funcionales diseñadas (desarrolladas por los inventores) permite la miniaturización del dispositivo para reducir las cantidades de agente de captura necesarias, eliminando de forma efectiva uno de los costes más significativos en las pruebas de detección de EI de laboratorio estándar, como los ELISA basados en placas. Además, al emplear técnicas recientemente desarrolladas de transferencia de inyección de tinta, se pueden fabricar chips de sensor multiplexados desechables a un coste del orden de varios centavos por chip.

20 **[0092]** Los modos de realización que reducen el coste del ensayo ofrecen varias ventajas, como la capacidad de hacer pruebas a más personas por menos dinero. Pero las reducciones de coste logradas al reducir la dependencia requerida de una infraestructura de atención sanitaria muy desarrollada también son importantes. Por ejemplo, las clínicas itinerantes en países en desarrollo tienen tiempo y personal limitados, y una prueba multiplexada con procesamiento *in situ* de una única etapa aumenta significativamente el flujo de pacientes y el número de infecciones detectadas. Además, la creación de un ensayo miniaturizado y multiplexado elimina grandes cantidades de materiales y reduce significativamente la carga de transporte y almacenamiento. En particular, la propiedad de estabilización de proteínas de la presente exposición permite el transporte y el almacenamiento de los chips a temperatura ambiente, evitando la necesidad de un almacenamiento y un transporte costosos controlados por el clima.

Simplicidad del ensayo y tiempo de lectura

25 **[0093]** Las personas que han experimentado una prueba de EI señalan el ansioso período de espera (a menudo días o semanas) previo a la notificación de los resultados como incómodo y una razón para evitar futuras pruebas. Más del 50% de los pacientes no regresa si se requiere una segunda visita para recibir los resultados de la prueba. Los estudios también han demostrado que hasta el 50 % de los pacientes se irá antes de recibir los resultados de la prueba si el tiempo de espera es de 100 minutos, y aproximadamente el 20 % de los pacientes se irá si el tiempo de espera es de 50 minutos. Los dispositivos y métodos de la presente exposición eliminan este problema al permitir obtener los resultados en un período de 5 minutos. Esto ayuda a asegurar que tanto la

prueba como el resultado se proporcionen durante una visita única, y eliminará la necesidad de que los pacientes proporcionen información de contacto para la notificación de resultados (proporcionar esta información puede ocasionar problemas de privacidad del paciente, otra razón para evitar la prueba).

- 5 **[0094]** Las pruebas que requieren muestras de sangre total extraídas por venopunción requieren un esfuerzo considerable, tiempo y la disponibilidad de trabajadores altamente cualificados. Además de la extracción real de la muestra de sangre, muchos diagnósticos requieren separar la sangre en células y plasma. Esto requeriría experiencia y equipo adicional, un mayor coste de análisis y tiempo de lectura, y limita la capacidad de proporcionar un diagnóstico en el punto de atención. Además, el proceso de venopunción en sí mismo puede provocar complicaciones médicas en los pacientes, y la fuerte aversión que sienten muchas personas a las agujas y la venopunción. Se pueden reducir todas estas inquietudes creando una prueba que sea capaz de detectar un panel de EI en solo unos pocos microlitros de sangre, que se pueden obtener fácilmente con una punción capilar. Además, al crear una prueba con la capacidad de detectar múltiples blancos en solo unos pocos microlitros de sangre, es posible un mayor acceso para realizar pruebas en recién nacidos, donde extraer grandes cantidades de sangre es problemático y a menudo requiere una transfusión de sangre en el momento de la extracción de sangre debido a la cantidad de sangre requerida. Los dispositivos y métodos descritos en el presente documento también podrían tener un impacto significativo en la detección de EI en recién nacidos, que a menudo se requiere cuando la historia clínica de la madre no está disponible (por ejemplo, en zonas de guerra, hambruna y conflictos) o cuando se debe investigar la posible transmisión de una EI conocida de la madre al recién nacido.
- 10
- 15
- 20 **[0095]** Por último, al basarse en la difusión para unir dos conjuntos de reactivos espacialmente separados con el fin de generar una señal, los dispositivos y métodos descritos en el presente documento eliminan la necesidad de etapas de lavado o de transferencia de líquidos. Esto elimina la necesidad de microfluidos costosos o complejos, lo que reduce el coste previo al chip y elimina una causa importante de fallo tan común en la mayoría de los diseños contemporáneos de "laboratorio en un chip" cuando en realidad se analizan *in situ* con muestras clínicas.
- 25 **[0096]** Se puede lograr un mayor rendimiento de las pruebas de EI reduciendo los materiales requeridos (por ejemplo, la eliminación de agujas y viales de extracción de sangre, así como la preocupación de su eliminación adecuada). Además, el único artículo desechable creado en los dispositivos y métodos de la presente exposición, además de la lanceta para la punción capilar, es una pequeña pieza de vidrio o plástico que sirve como superficie de contacto de la sangre del ensayo. Se podrían desinfectar miles de estos con un solo litro de solución de lejía y la eliminación de estas superficies podría realizarse en la basura normal. Además, las pruebas en entornos de bajos recursos a menudo se producen en regiones aisladas. Si bien acercar las pruebas a estas zonas aumenta el acceso, a menudo ocurre que no existe ningún tipo de seguimiento o se produce solo después de largos periodos de tiempo. Además, la comunicación cara a cara suele ser la única opción, ya que otros métodos, como el correo, el teléfono o el correo electrónico, no están disponibles o no son fiables. Por estas razones, los resultados rápidos son esenciales. Como se ha mencionado anteriormente, las opciones tales como las pruebas basadas en tiras de flujo lateral están disponibles para estas situaciones, pero su sensibilidad es limitada y el potencial para las pruebas multiplexadas en este formato también es limitado.
- 30
- 35

Sensibilidad

- 40 **[0097]** Los dispositivos descritos en algunos de los modos de realización proporcionan la sensibilidad encontrada en las pruebas estándar de laboratorio, tales como ensayos ELISA basados en placas, con las ventajas de ensayos de tira de flujo lateral de resultado económico, portátil y rápido. Esto se logra utilizando materiales novedosos en el diseño del dispositivo (que se analizan con más detalle en el presente documento). Mediante el uso de un revestimiento de superficie de bajo coste capaz de eliminar la adsorción no específica de biomoléculas y células. Por lo tanto, los dispositivos y métodos descritos en el presente documento contemplan modos de realización que pueden alcanzar niveles de sensibilidad antes inalcanzables debido a la eliminación de la mayor fuente de ruido de fondo en los bioensayos que surge de la adsorción adventicia de proteínas.
- 45

- 50 **[0098]** Normalmente, los ensayos más sensibles requieren el apoyo de una infraestructura de atención sanitaria tecnológicamente sofisticada y que requiere mucho capital. Con los métodos actuales, las muestras de los pacientes tomadas en el punto de atención deben transportarse a un laboratorio que mantiene el equipo y el personal necesarios para realizar la prueba real. Los entornos de recursos bajos sencillamente no tienen acceso a estas instalaciones, lo que impide que estas zonas tengan acceso a los diagnósticos más sensibles. El dispositivo según algunos modos de realización ofrece un análisis *in situ*, lo que permite utilizar el diagnóstico altamente sensible en entornos donde la infraestructura de atención sanitaria está menos desarrollada.

- 55 **[0099]** Un experto en la materia entenderá fácilmente que el modo de realización de ejemplo dado a conocer anteriormente está bien adaptado para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionados, así como los inherentes a los mismos. Los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en el presente modo de realización son meramente representativos de una aplicación contemplada de la tecnología más general, y no deben considerarse como limitativos de los aspectos y modos de realización dados a conocer de forma más general anteriormente.

[0100] Los siguientes ejemplos no limitativos pretenden ser puramente ilustrativos y muestran experimentos específicos que se llevaron a cabo según la exposición.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de cepillos de POEGMA en portaobjetos.

5 **[0101]** Los cepillos de POEGMA se fabricaron sobre vidrio de la siguiente manera (FIG. 2, todos los productos químicos comprados a Sigma): primero, se limpiaron los portaobjetos (VWR) en una solución de 3:1 H₂SO₄:H₂O₂ durante 30 minutos. Después de enjuagarlos con H₂O desionizada y secarlos, los portaobjetos limpiados se sumergieron en aminopropiltrióxido (APTES) al 10 % en etanol durante 30 minutos y después se enjuagaron con etanol y se secaron a 120 °C durante 3 h (etapa 1). Los portaobjetos se sumergieron entonces
10 en una solución de bromuro de bromoisobutirilo al 1% y trietilamina al 1% en diclorometano durante 30 minutos, se enjuagaron con diclorometano y etanol y se secaron con N₂ (etapa 2). Los portaobjetos se sumergieron a continuación durante 12 h en una solución de polimerización desgasificada de 5 mg/ml de Cu(I)Br, 12 mg/ml de biperidina y 300 mg/ml de oligo(etilenglicol) metacrilato en una atmósfera de argón (etapa 3). Finalmente, los portaobjetos se enjuagaron con H₂O desionizada y se secaron con N₂.

15 **Ejemplo 2. Resistencia a proteínas de los cepillos de POEGMA**

[0102] Se analizó la resistencia a proteínas de los cepillos de POEGMA cultivados en obleas de silicio para adsorción de fibronectina (Fn), albúmina de suero bovino (ASB), lisozima (Ly) (todas las proteínas a 1 mg/ml en PBS, pH = 7,4) y suero fetal bovino (SFB) sin diluir. Se midió mediante elipsometría el grosor de las capas de proteína en función del grosor de la película de POEGMA, y se muestra en la FIG. 7. El grosor de la proteína adsorbida en el control negativo, una superficie con iniciador ATRP inmovilizado, varió dependiendo de la proteína, y osciló entre ~ 10 Å (Ly) y ~ 25 Å para las otras proteínas y SFB. Por el contrario, un cepillo de POEGMA fino (~ 14 Å de grosor) mostró una adsorción de proteína significativamente menor de todas las proteínas y del suero. Aumentar el grosor del cepillo de POEGMA a ~ 95 Å o más eliminó la adsorción de todas las proteínas y, más en particular, la de las proteínas séricas, por debajo del límite de detección de elipsometría de 1 Å.
20
25

Ejemplo 3. Impresión de micromatrices de anticuerpos

[0103] Se utilizó una matriz piezoeléctrica sin contacto PerkinElmer para imprimir micromatrices de anticuerpos (Ac) sobre sustratos de POEGMA a temperatura y a humedad ambiente. Los anticuerpos para IL-6 y osteoprotegerina (OPG) (R&D Systems) se imprimieron a partir de soluciones de 50 µg/ml y se dejaron absorber de forma no covalente en el cepillo de polímero de 100 nm de grosor: (1) un cepillo de POEGMA de 100 nm de grosor cultivado mediante SI-ATRP sobre vidrio, y (2) sobre sustratos de nitrocelulosa no modificados (Whatman, control positivo). Después de la impresión, se facilitó el secado de los puntos colocando los portaobjetos impresos al vacío.
30

[0104] Las matrices se incubaron primero con una serie de dilución de 100 ml de suero o PBS enriquecido en analito durante 2 h con agitación, seguido de 100 ml de anticuerpo secundario biotinilado 1 mg/ml en PBS con ASB al 1% (p/v) durante 1 h. Finalmente, las matrices se desarrollaron mediante incubación en 100 ml de estreptavidina-Cy5 1 µg/ml durante 30 min y a continuación se escanearon con un escáner de micromatriz de fluorescencia Axon Genepix 4200. Después de cada etapa de incubación, las matrices se lavaron dos veces durante 30 s con ASB al 1 % (p/v) y Tween-20 al 0,1 % (p/v) en PBS.
35

[0105] Una imagen de fluorescencia de puntos de micromatriz para un ensayo de IL-6 detectada sobre POEGMA sobre vidrio, que se muestra en la FIG. 8A, muestra el aumento en la intensidad de fluorescencia con el aumento de la concentración de analitos. Los puntos se pudieron distinguir visualmente del fondo incluso a una concentración de IL-6 de 0,1 pg/ml (5 fM). La FIG. 8A también muestra que la matriz de POEGMA retuvo su capacidad de resistir la adsorción de proteínas no específica durante la fabricación de la matriz y el posterior ensayo de inmunofluorescencia de sándwich, ya que la intensidad de fluorescencia en las zonas de fondo que rodeaban los puntos medidos antes del ensayo no mostró ningún aumento en la intensidad al finalizar el procedimiento. Esta señal de fondo en POEGMA se traduce en límites de detección (LOD, por sus siglas en inglés) femtomolares en suero, y un rango dinámico que abarca cinco órdenes de magnitud de concentración de analitos (Fig. 8B a 8D). Además, a pesar de las etapas de incubación y enjuague, no hubo corrimiento de los puntos (FIG. 8A), lo que confirmó la inmovilización estable del anticuerpo de captura.
40
45
50

[0106] Las curvas de respuesta a la dosis de OPG en tampón y suero para anticuerpos específicos de OPG detectados en POEGMA (FIG. 8B) ilustran otra consecuencia importante del uso de un sustrato resistente a proteínas, ya que muestran que los LOD son prácticamente idénticos en tampón y suero. Estos resultados contrastan con la mayoría de los otros inmunoensayos de fluorescencia, donde el LOD presenta, por lo general, órdenes de magnitud mayores en soluciones fisiológicas complejas que contienen altas concentraciones de proteínas externas en comparación con el LOD para el mismo ensayo en el tampón. Aunque la señal absoluta de las matrices detectadas en POEGMA fue menor que la obtenida de las matrices detectadas en nitrocelulosa (datos brutos no mostrados), la señal de fondo obtenida del cepillo de POEGMA (que se acercó a los niveles de
55

autofluorescencia del sustrato de vidrio) fue significativamente menor que la de la nitrocelulosa. En la FIG. 8C se muestra la respuesta de fluorescencia de una matriz de anticuerpos específicos de IL-6 detectada sobre nitrocelulosa y POEGMA en función de la concentración de IL-6 en suero. Los datos muestran que la señal de fluorescencia de los puntos de Ac de captura impresos en nitrocelulosa solo es visible a una concentración de 10 pg/ml, mientras que la señal en POEGMA es claramente visible hasta una concentración de 100 fg/ml. A pesar de la señal absoluta más baja de las matrices de anticuerpos detectadas en el cepillo de POEGMA frente a la nitrocelulosa, la fluorescencia de fondo significativamente más baja en el cepillo de POEGMA compensó con creces la señal absoluta más baja de los puntos. De forma adicional, los anticuerpos contra IL-6 detectados en un cepillo de POEGMA sobre vidrio podrían detectar IL-6 directamente de sangre total sin diluir con un LOD de ~15 fM (Figura 8D).

Ejemplo 4. Respuesta a la dosis de micromatrices de anticuerpos impresas

[0107] Se usaron dos concentraciones diferentes de anticuerpo biotinilado (Ac-b) para crear una micromatriz en superficies de cepillo de POEGMA, que se expusieron después a una serie de dilución de estreptavidina-Cy5 (FIG. 9A). La concentración de las soluciones impresas varió en 4 órdenes de magnitud (1 mg/ml de Ac-b y 0,0001 mg/ml de Ac-b). La respuesta a la dosis de estas micromatrices a estreptavidina se obtuvo exponiendo las matrices a concentraciones conocidas de estreptavidina marcada con Cy5 (FIG. 9B). Los puntos con una alta concentración de Ac-b exhibieron un rango dinámico de seis órdenes de magnitud, desde 4 fM hasta 4 nM. Los puntos con una baja concentración de Ac-b también presentaron un rango dinámico de seis órdenes de magnitud, desde 1 pM hasta 1 µM, y demostraron ser útiles para cuantificar las concentraciones más altas de estreptavidina Cy-5 que generaban una señal de saturación del detector en los puntos de alta concentración de Ac-b. Al combinar la respuesta de ambas concentraciones de puntos, se obtuvo una respuesta de 9 órdenes de magnitud.

Ejemplo 5. Impresión de puntos de captura de Ac-b estables y puntos lábiles de estreptavidina-Cy5

[0108] Se imprimió una matriz de cinco puntos de Ac-biotinilado sobre una superficie de POEGMA para formar los puntos inmóviles "estables" del agente de captura. Además, se detectó una solución de estreptavidina-Cy5 y PEG soluble sobre puntos previamente impresos de PEG soluble para crear una matriz de 8x2 de puntos "lábiles" de reactivos de detección. El dispositivo se muestra en la FIG. 10A, donde los puntos estables no se pueden ver en la parte superior del panel izquierdo porque no son fluorescentes. Después de una semana de almacenamiento, se pipetearon 50 µl de PBS en la superficie de la matriz para analizar la capacidad de los puntos de estreptavidina-Cy5 de disolverse en la solución y unirse a los puntos de captura de Ac biotinilado. Como se muestra en la FIG. 10B, se disolvió una cantidad suficiente de estreptavidina-Cy5 activa en la solución y se capturó por los puntos de Ac biotinilado para crear una señal detectable.

Ejemplo 6. Respuesta a la dosis de un ensayo de BNP

[0109] Se midió la respuesta a la dosis de un ensayo impreso en POEGMA para la detección de péptido natriurético cerebral (BNP, por sus siglas en inglés), un biomarcador para lesiones cardíacas, después de 1 día de almacenamiento a temperatura ambiente (TA) y después de 23 días de almacenamiento. Este ensayo se realizó para determinar: (1) la cuantificación posible con los ensayos y (2) su estabilidad después del almacenamiento. Se incubó el analito durante 20 minutos para simular las condiciones de la prueba del POC. Se ajustaron los datos con un ajuste logístico de 5 parámetros, y produjeron un LOD de 8 pg/ml como se muestra en la FIG. 11; la prueba i-Stat (Abbott) tiene un LOD de 14 pg/ml en comparación. Es importante destacar que no hay diferencia en el LOD o DR del ensayo, incluso después del almacenamiento durante 3 semanas. Estos resultados también son coherentes con las observaciones previas de otros investigadores de que el PEG puede estabilizar proteínas en condiciones ambientales. La vida útil larga en condiciones ambientales es un atributo importante para los dispositivos de punto de atención debido a que estos dispositivos de diagnóstico impresos no necesitarán almacenarse en un tampón a 4 °C, de manera que los chips impresos pueden transportarse, almacenarse y usarse a temperatura ambiente, atributos que son importantes para su uso en entornos de bajos recursos donde la refrigeración puede no estar fácilmente disponible.

Ejemplo 7. Ensayo para detectar IgG e IgM humanas

[0110] En este ejemplo, se preparó un ensayo para detectar IgG e IgM humanas a partir de sangre. Se eligieron estos analitos porque se puede utilizar sangre de donantes sanos para este fin. La Figura 12 muestra la fabricación del ensayo. En primer lugar, se cultivó un cepillo de POEGMA de ~100 nm de grosor en un portaobjetos mediante SI-ATRP. A continuación, el portaobjetos se estampó con un patrón de rejilla de cera utilizando una impresora de portaobjetos para confinar la muestra a la zona activa de este chip. Después se imprimió con inyección de tinta una matriz de anticuerpos en el centro de un único corral de cera; cada punto presenta un diámetro de ~ 150 nm. La matriz 4x4 interior son Ac de puntos de captura (Ac_c) para formar los puntos de captura "estables"; las filas 1 y 4 son un Ac_c antimurino (control positivo); fila 2: Ac_c de IgG antihumano; fila 3: Ac_c de IgM antihumano. A continuación, la mezcla de detecciones se imprimió como 3 filas exteriores de puntos "lábiles" (Figura 23B). Estos puntos contienen una mezcla de Cy-5-IgG antihumana y/o Cy-5-IgM antihumana murina (Ac de detección con un epitopo diferente contra IgG e IgM humanas que los Ac_c), heparina y exceso de PEG5000 10X molar. La matriz de anticuerpos 4x4 interior no tiene fluorescencia intrínseca

y apenas es visible en la Figura 12B debido a la dispersión de luz de los Ac impresos. Los puntos exteriores son visibles porque contienen Ac_d marcados con Cy5 a una concentración lo suficientemente alta que saturan el detector de fluorescencia y, por lo tanto, aparecen de color blanco.

5 [0111] Se aplicó una gota de sangre de una punción capilar (~20 µL) a la superficie del ensayo dentro del corral hidrófobo, y se incubó durante 5 min. La superficie se enjuagó rápidamente con ~1 ml de tampón de una botella comprimible, que debería desplazar las células sanguíneas y las proteínas débilmente unidas. La sangre fluyó hacia los márgenes y se unió a los corrales hidrófobos, manifestándose como un color rojo alrededor de los márgenes (no se muestra). La Figura 13 ilustra los resultados del ensayo. En la Figura 13B, se imprimieron conjuntamente Ac_d para IgG e IgM humanas como los puntos de detección lábiles (con PEG + heparina), de manera que se crea un sándwich completo tras la incubación en sangre, dando lugar a la aparición de puntos fluorescentes en las filas 2 y 3. Las señales del margen en la figura 13B-F se deben a la dispersión de la sangre unida al corral hidrófobo después del desplazamiento desde el cepillo de POEGMA por la etapa de lavado. En la sangre total, la concentración de IgG es aproximadamente 5 mg/ml (33 µM) y la de IgM 1,5 mg/ml (1,6 µM), sugiriendo que estos analitos de proteína deben detectarse a partir de sangre no diluida en este nivel incluso en este experimento inicial. Las figuras 13C y 13F muestran experimentos de control negativo en los que se incubó el chip con PBS (C) o sangre de pollo (F), de manera que solo los controles positivos: las filas 1 y 4 se iluminan, mientras que las filas 2 y 3 no muestran fluorescencia. Las figuras 13D y 13E son otros dos controles; en la figura 13D, solo se imprimió el Ac_d-Cy5-antiIgG en los puntos lábiles, de manera que la fila 2 se ilumina pero la fila 3 no, mientras que en el panel 13E, solo se imprimió el Ac_d-Cy5-antiIgM en los puntos lábiles, de manera que la fila 3 se ilumina, mientras que la fila 2 no se ilumina. Cabe destacar que los Ac_d-Cy5 se imprimieron a altas concentraciones en la circunferencia exterior de los puntos lábiles, y solo se disuelven parcialmente al entrar en contacto con la sangre, de manera que su fluorescencia residual todavía satura el detector.

Ejemplo 8. Evaluación del modo de impresión de excipientes

25 [0112] Se evaluaron dos enfoques por su efecto en la disolución de anticuerpos de agente de captura impresos (Ac_d): (1) PEG soluble añadido a la solución de impresión del Ac_d, y (2) PEG soluble que se imprime previamente de forma directa en el cepillo de POEGMA antes de la impresión del Ac_d.

30 [0113] Se evaluaron tres pesos moleculares de PEG: 1000, 11 000 y 66 000 Da. Se añadió cada uno de estos PEG a la solución de impresión de un anticuerpo de troponina I cardíaca (cTnl) marcado con Cy-5 a una concentración de 1 mg/ml. También se imprimió PEG soluble a una concentración de 1 mg/ml en el cepillo POEGMA antes de imprimir el agente de detección sobre estos puntos de PEG. Después de imprimir micropuntos de PEG soluble, se imprimieron micropuntos de Ac_d directamente sobre el PEG previamente impreso. Para determinar la efectividad de la adición de PEG a la solución de impresión, se imprimieron puntos de Ac_d alrededor de una matriz de puntos de Ac_d de cTnl. Se añadieron 20 µl de tampón que contenía cTnl a la matriz, lo que permitió que los puntos del anticuerpo Cy-5 anti-cTnl se disolvieran en la solución y se marcara la cTnl.

35 [0114] Tras el escaneo, se determinó la señal generada por los puntos de Ac_d estables después de la captura de la cTnl marcada. El PEG de 10 000 o 66 000 MW añadido a la solución de anticuerpos de detección impresa mejoró la disponibilidad de los anticuerpos de detección. La impresión previa de PEG no pareció afectar en gran medida a la disponibilidad de los anticuerpos de detección.

40 Ejemplo 9. Ensayos de sándwich multiplexados y de analito único para VHB y VIH

[0115] Se preparará una micromatriz que comprende un chip desechable revestido con POEGMA, cuyos límites se imprimirán entonces con una tinta de hidrocarburo hidrófoba con una impresora de portaobjetos de micromatrices (ArrayIt Corp.). La tinta hidrófoba creará un "corral" que confinará la gota de sangre a la región activa del chip. Para el ensayo de analito único, esta región activa se imprimirá con puntos "estables" de Ac_c individual que son específicos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg, por sus siglas en inglés). Se imprimirá una fila de HBsAg para que sirva como control positivo. Para el ensayo D4 multiplexado, también se imprimirán p24 y gp41 (para VIH-1), y gp36 (para VIH-2) en filas separadas, y los puntos de los antígenos de VIH se imprimirán junto con los puntos de anticuerpos de captura como un control positivo. El Ac_d se detectará en la superficie de POEGMA como una fila de puntos individuales con el fin de proporcionar réplicas independientes y mejorar de este modo las estadísticas de detección y la solidez del ensayo. La arquitectura y la naturaleza hidrófila del cepillo de POEGMA permitirán que una gota de sangre se difunda a través de la región de POEGMA activa del chip.

55 [0116] Además de los puntos "estables" de los Ac de captura, también se imprimirán puntos "lábiles" solubles de anticuerpos de detección (Ac_d) marcados de forma fluorescente. Las matrices se formatearán de una manera similar a la que se muestra en la Figura 5. Para garantizar que los puntos lábiles de los Ac_d impresos se disuelvan al entrar en contacto con la sangre, se agregará PEG soluble a las soluciones de impresión. Este PEG soluble se adsorberá preferiblemente en el cepillo de POEGMA y bloqueará la adsorción del Ac_d en el cepillo. Aunque están confinados en puntos simplemente debido a la impresión de inyección de tinta y al proceso de secado macroscópico, estos Ac_d se encuentran de hecho en un estado "lábil" y pueden disolverse y liberarse fácilmente al entrar en contacto con una solución acuosa. La adición del exceso de PEG soluble al Ac de

detección servirá para estabilizar los agentes de detección durante el almacenamiento y sirve de manera importante como un excipiente que ayuda a resolubilizar el Ac de detección cuando se introduce la gota de sangre de prueba. Tras entrar en contacto con una gota de sangre, estos anticuerpos marcados se disolverán en solución y se unirán a todos los blancos presentes en la muestra de sangre y, por tanto, los marcarán. Como control positivo, se imprimirán puntos de los antígenos de VHB y VIH junto con los puntos de anticuerpos de captura. Estos servirán para verificar la actividad de los agentes de detección y también pueden utilizarse para normalizar las intensidades de fluorescencia a través de ensayos para reducir la variabilidad entre ensayos. Con el fin de evitar la coagulación, también se imprimirán en el cepillo puntos de heparina lábiles, mezclados de manera similar con exceso de PEG.

10 **Ejemplo 10. Ensayo autónomo capaz de detectar múltiples marcadores infecciosos directamente en la sangre total**

[0117] En este ejemplo, se desarrollará un ensayo cuantitativo de analito único para VHB y un ensayo cualitativo de D4 de analito múltiple para VHB y VIH utilizando agentes de detección impresos como "puntos lábiles" para un inmunoensayo de POC.

15 **[0118]** Las respuestas de anticuerpos útiles en la detección de la infección por VIH están generalmente en contra de tres clases de proteínas antigénicas: antígenos de envoltura (ENV), productos génicos de polimerasa (POL) y antígeno de grupo específico (GAG). En general, un único antígeno del VIH no es adecuadamente sensible o específico para el serodiagnóstico, por lo que una combinación de antígenos es más útil para el serodiagnóstico. El antígeno de envoltura primario será gp41, con gp120 y gp160 como auxiliares. Un *antígeno primario para la evaluación de las proteínas del núcleo es p24* (GAG), incluyendo otros antígenos p55 (una proteína GAG que es el precursor de p24) y p53 (POL). La identificación de la infección por VIH-2 también es importante. El antígeno candidato principal para el VIH-2 es gp36 (ENV), el análogo al gp41 del VIH-1.

20 **[0119]** El diagnóstico del VHB es sencillo ya que la presencia de HBsAg en la muestra indica infección. Los anticuerpos monoclonales y policlonales disponibles comercialmente para HBsAg se evaluarán en esta plataforma para determinar los más adecuados para la plataforma.

25 **[0120]** Ensayo cuantitativo de analito único. Las superficies de POEGMA optimizadas y las condiciones de impresión del agente de detección, tales como las descritas en el presente documento, se utilizarán para imprimir una matriz de micropuntos de anti-HBsAg (en un formato análogo a la matriz que se muestra en la Figura 5). Cinco puntos replicados de Ac de anti-HBsAg comprenderán una sola fila en la matriz, y también se imprimirá una fila de HBsAg para servir como control positivo. Se imprimirán micropuntos de un anticuerpo de detección de anti-HBsAg marcado con Cy5 en la región que rodea el anticuerpo de captura y las filas de control positivo. Se imprimirán veinticuatro matrices en un portaobjetos y se ensamblarán cuatro portaobjetos en un formato de placa de 96 pocillos. Las curvas de dosis-respuesta que cubren concentraciones de 0 g/ml a 100 ng/ml se generarán utilizando un tampón enriquecido en blanco, seguido de curvas dosis-respuesta de sangre humana negativa al VHB enriquecida con el analito de 1 fM a 1 µM. Los datos de dosis-respuesta se ajustarán a un ajuste logístico de cinco parámetros (5-PL). La estimación de parámetros se realizará mediante un algoritmo de Newton reflexivo de región de confianza a gran escala utilizando MATLAB (Versión 6.5). El ensayo se evaluará en cuanto a su LOD, DR y COV. Para los ensayos con sangre total heparinizada (heparinizada por disolución de la mezcla de detecciones), es necesaria la eliminación de sangre de la superficie para obtener imágenes de la fluorescencia. Por lo tanto, se explorarán diferentes protocolos de "desplazamiento" para eliminar la sangre de la superficie: (1) lavado gota a gota de la superficie utilizando una botella de Visine; (2) inserción del chip en una botella llena de tampón con vías que guían la inserción e inmersión del chip y su extracción de la botella. Primero utilizaremos un equilibrio de placa de Wilhelmy para insertar y extraer el chip en el tampón a diferentes velocidades y durante diferentes tiempos totales de incubación para optimizar este protocolo. Se determinará el impacto de ambos métodos de "desplazamiento" sanguíneo en el LOD, DR y COV del ensayo y se utilizará el mejor protocolo para todos los ensayos de sangre.

30 **[0121]** Ensayo cualitativo de analito múltiple. Las superficies de POEGMA optimizadas y las condiciones de impresión del agente de detección, tales como las descritas en el presente documento, se utilizarán para imprimir una matriz de micropuntos de Ac de captura anti-HBsAg, anti-p24, anti-gp41 y anti-gp36 (en un formato análogo a la matriz que se muestra en la Figura 5). Cinco puntos replicados de cada anticuerpo de captura comprenderán una única fila en la matriz y también habrá una fila de control positivo de cada antígeno. Se imprimirán micropuntos compuestos por una mezcla de los anticuerpos de detección marcados con Cy5 necesarios en la región que rodea el anticuerpo de captura y las filas de control positivo. Las curvas de dosis-respuesta se generarán utilizando tampón enriquecido con analito, seguido de sangre humana enriquecida con analito (VIH/VHB negativo) y se ajustarán los datos como se ha descrito previamente para el ensayo de analito único. La curva de dosis-respuesta del HBsAg de analito único se comparará con la obtenida del ensayo D4 de 4 analitos, para examinar el efecto de la exposición simultánea a múltiples analitos y de la impresión de 4 Ac de detección diferentes en el mismo chip en el rendimiento del ensayo D4 en cuanto a posible reactividad cruzada. Además, observamos que aunque estos ensayos de analito múltiple se caracterizarán cuantitativamente en este analito único (SA, por sus siglas en inglés), solo se utilizarán en un formato si/no cualitativo en SA4 para establecer la

ES 2 645 210 T3

presencia o ausencia de un analito, cuando la señal excede el umbral de 3σ de LOD, donde el LOD se establece mediante la curva de dosis-respuesta en sangre.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo que comprende:
- a. un sustrato que comprende una superficie;
 - 5 b. una capa de polímero no incrustante en la superficie, donde la capa de polímero no incrustante comprende una pluralidad de moléculas cepillo;
 - c. al menos una región de captura en la capa de polímero, que comprende al menos un agente de captura unido de forma no covalente a la capa de polímero, donde el al menos un agente de captura se une a un analito y permanece unido a la capa de polímero cuando se expone a una muestra de fluido; y
 - 10 d. al menos una región lábil en la capa de polímero, que comprende al menos un agente de detección y un excipiente, donde el al menos un agente de detección se solubiliza al entrar en contacto con la muestra de fluido y se une a un analito en la muestra de fluido;
- donde la región de captura y la región lábil se encuentran espacialmente separadas.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, donde al menos una de la pluralidad de moléculas cepillo comprende un grupo de núcleo de monómero,
- 15 preferiblemente donde el grupo de núcleo de monómero se selecciona de entre estirenos, acrilonitrilos, acetatos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, alcoholes vinílicos, ácidos vinílicos, y combinaciones de los mismos.
3. Dispositivo según la reivindicación 1, donde al menos una de la pluralidad de moléculas cepillo comprende un grupo de cabeza resistente a proteínas
- 20 preferiblemente donde el grupo de cabeza resistente a proteínas comprende un grupo de cabeza hidrófilo comprende un grupo de cabeza hidrófilo o un cosmótopo, más preferiblemente donde el grupo de cabeza resistente a proteínas comprende un sacárido, un oligosacárido, tri(propil sulfóxido), hidroxilo, glicerol, fosforilcolina, tri(sarcosina), N-acetilpiperazina, betaína, carboxibetaína, sulfobetaina, sorbitol permetilado, $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, -hexametilfosforamida, o polietilenglicol.
- 25 4. Dispositivo según la reivindicación 1, donde la capa de polímero no incrustante comprende poli(oligo(etilenglicol)metil metacrilato).
5. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una pluralidad de regiones de captura, comprendiendo cada región de captura al menos un agente de captura.
- 30 6. Dispositivo según la reivindicación 5, donde la pluralidad de regiones de captura conjuntamente comprenden al menos dos agentes de captura diferentes.
7. Dispositivo según la reivindicación 5, donde cada una de la pluralidad de regiones de captura comprende un agente de captura diferente.
8. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende una pluralidad de regiones lábiles, comprendiendo cada región lábil al menos un agente de detección.
- 35 9. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la al menos una región lábil comprende además un anticoagulante cuando la muestra de fluido es una muestra de sangre.
10. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el sustrato comprende vidrio, silicio, un óxido metálico o un polímero.
- 40 11. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además una capa de enlace entre el sustrato y la capa de polímero.
12. Método de fabricación de un dispositivo según la reivindicación 1, comprendiendo el método:
- a. proporcionar un sustrato que comprende una superficie;
 - b. formar una capa de polímero no incrustante que comprende una pluralidad de moléculas cepillo en la superficie;
 - 45 c. imprimir al menos un agente de captura sobre la capa de polímero de manera que se absorbe en la capa de polímero y permanece unido a la capa de polímero cuando se expone a una muestra de fluido; y

d. imprimir al menos una región lábil que comprende al menos un agente de detección y al menos un excipiente sobre la capa de polímero, donde el al menos un agente de detección se solubiliza al entrar en contacto con la muestra de fluido;

5 donde el agente de captura se imprime sobre la capa de polímero en una región que se encuentra espacialmente separada de la región lábil.

13. Método de diagnóstico de una enfermedad o un trastorno en un sujeto que comprende:

a. poner en contacto una muestra biológica con el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 durante un tiempo suficiente para permitir que se solubilice el agente de detección en la región lábil; y

10 b. detectar la presencia de la enfermedad o trastorno, donde una señal detectable en al menos una región de captura en el dispositivo indica la presencia de la enfermedad o el trastorno en el sujeto.

14. Prueba diagnóstica para determinar una enfermedad, un trastorno o un estado biológico en un sujeto que comprende:

a. poner en contacto una muestra biológica con el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 durante un tiempo suficiente para permitir que se solubilice el agente de detección en la región lábil; y

15 b. detectar la presencia de la enfermedad, un trastorno, o estado biológico, donde una señal detectable en al menos una región de captura en el dispositivo indica la presencia de la enfermedad, trastorno o estado biológico en el sujeto.

15. Ensayo diagnóstico de la reivindicación 14, donde el ensayo es un ensayo de punto de atención.

20 **16.** Kit que comprende el dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, un conjunto de tampones y/o reactivos e instrucciones de uso.

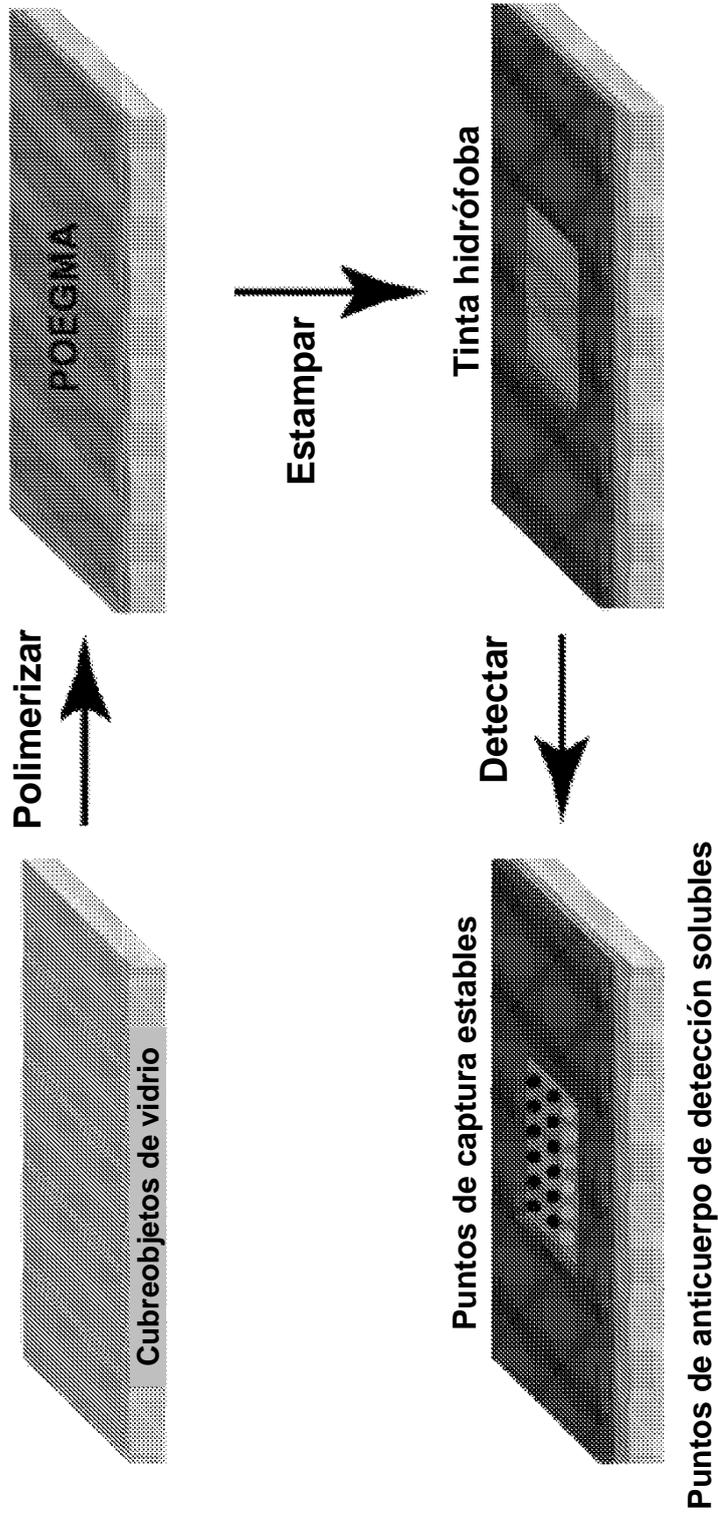


FIGURA 1

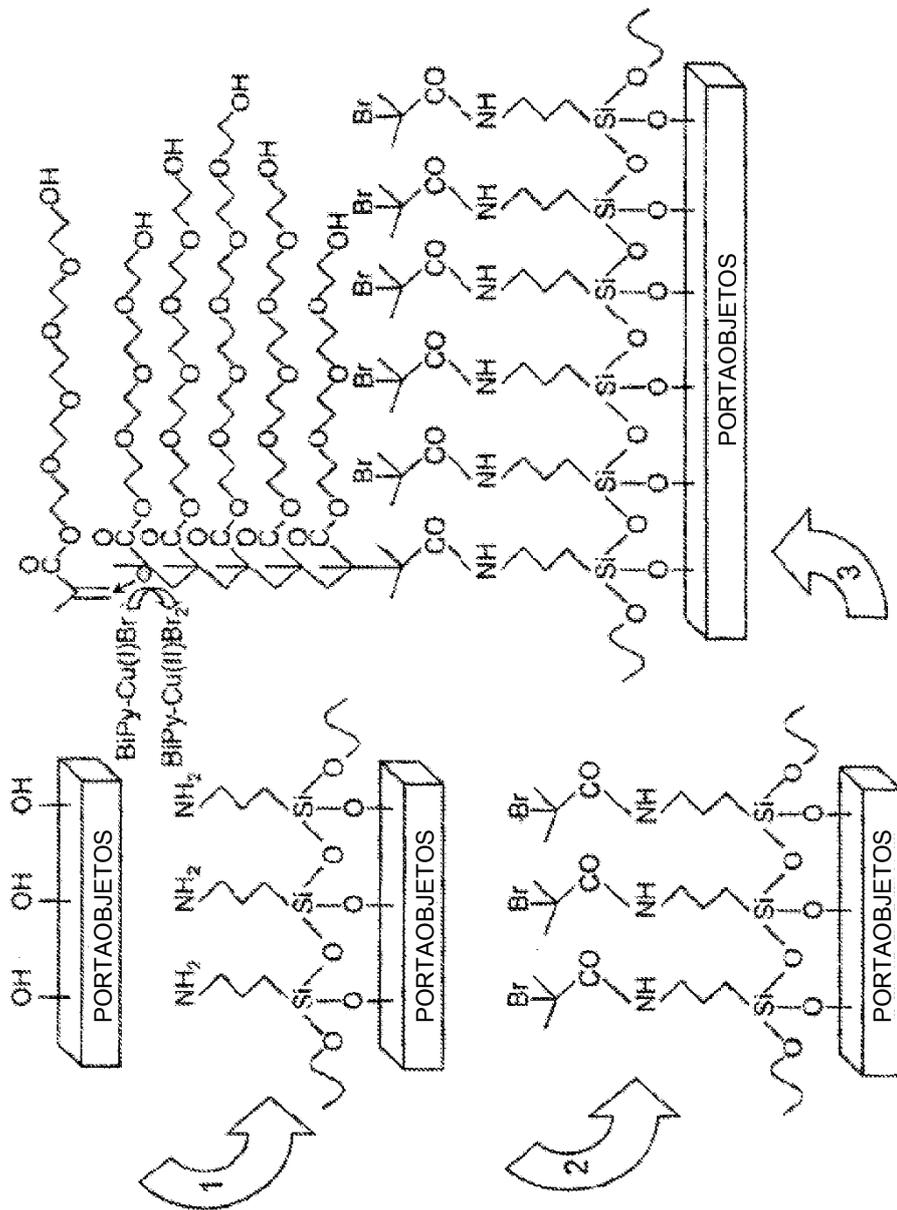


FIGURA 2

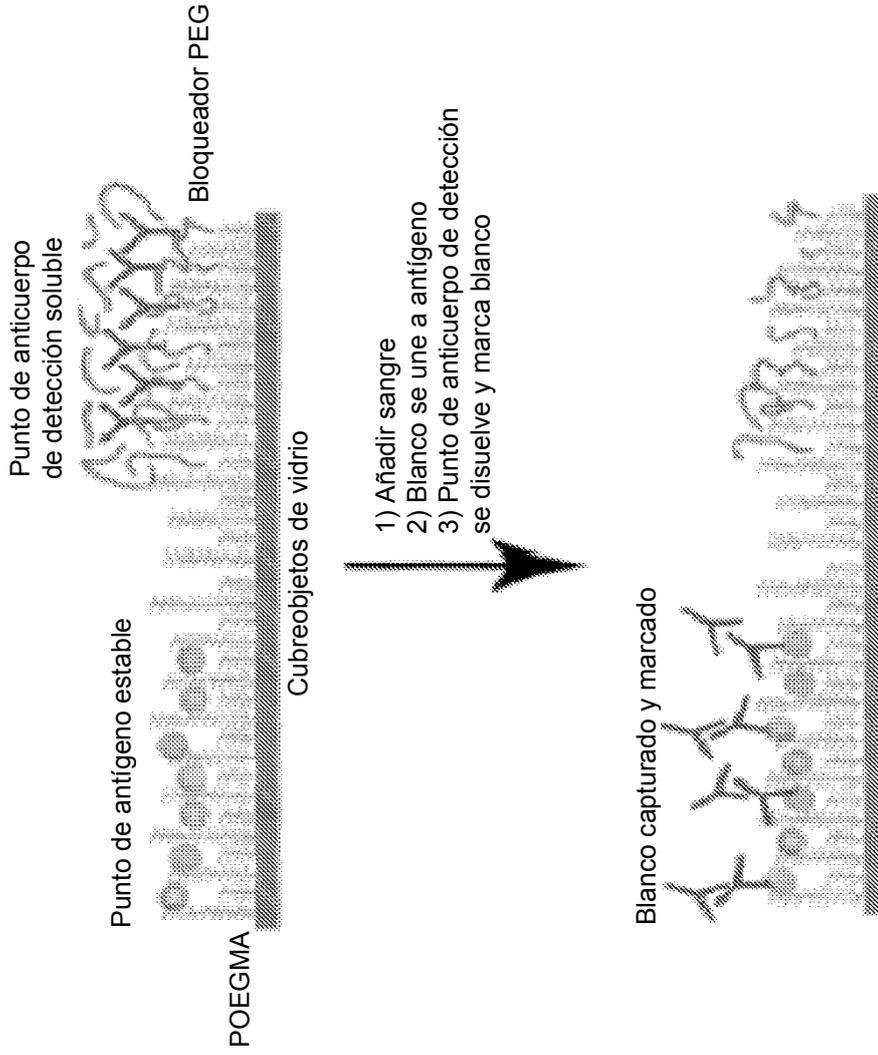


FIGURA 3

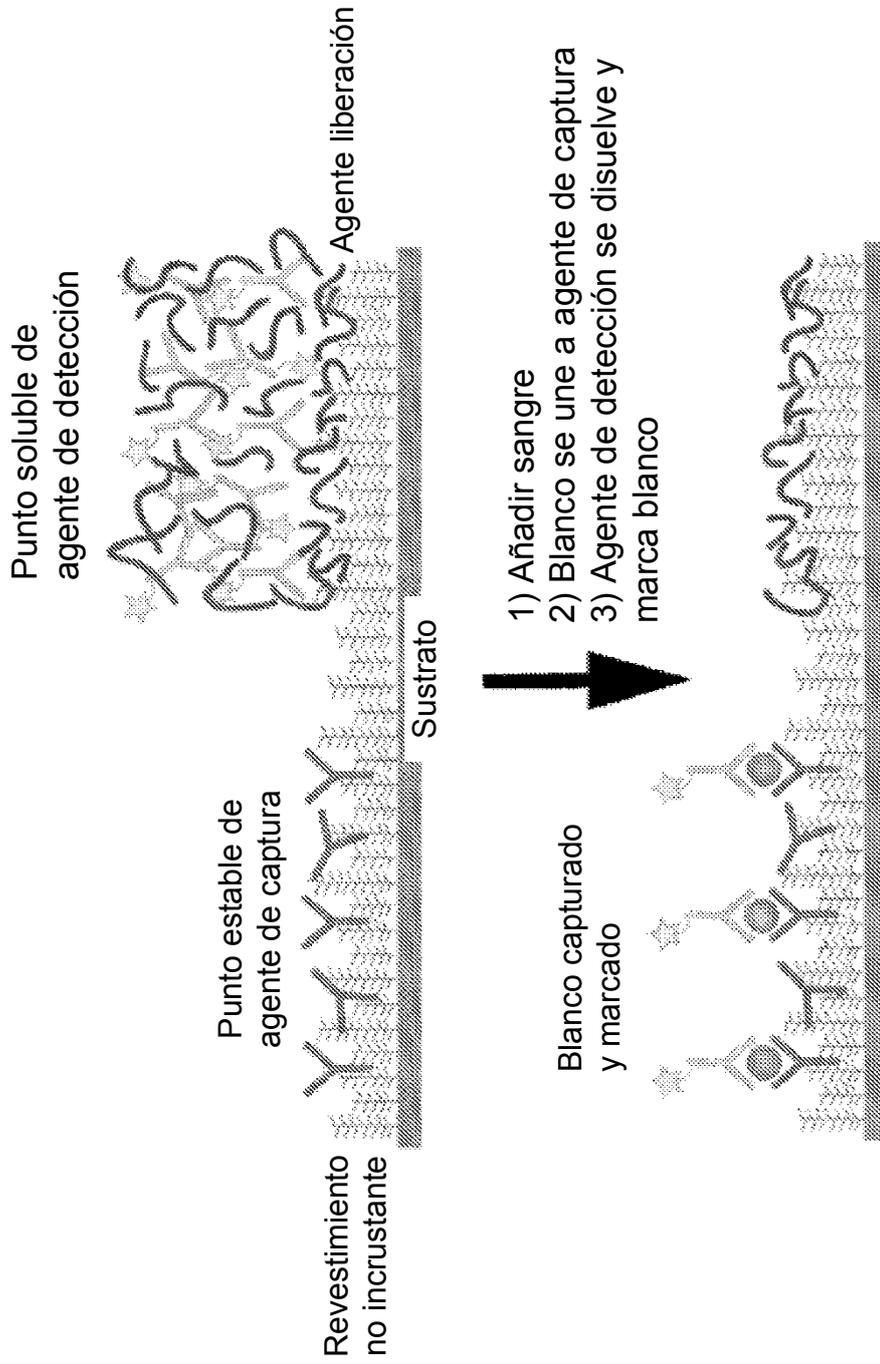


FIGURA 4

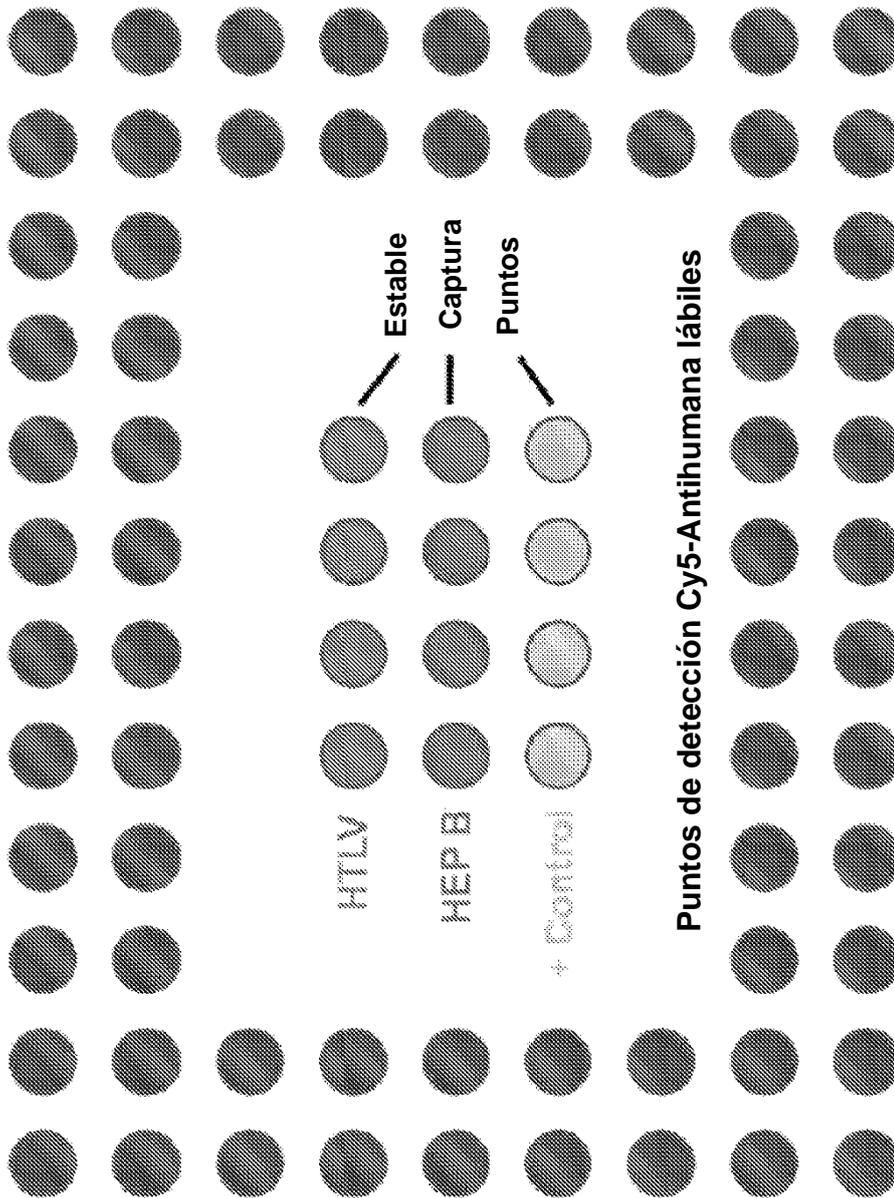


FIGURA 5

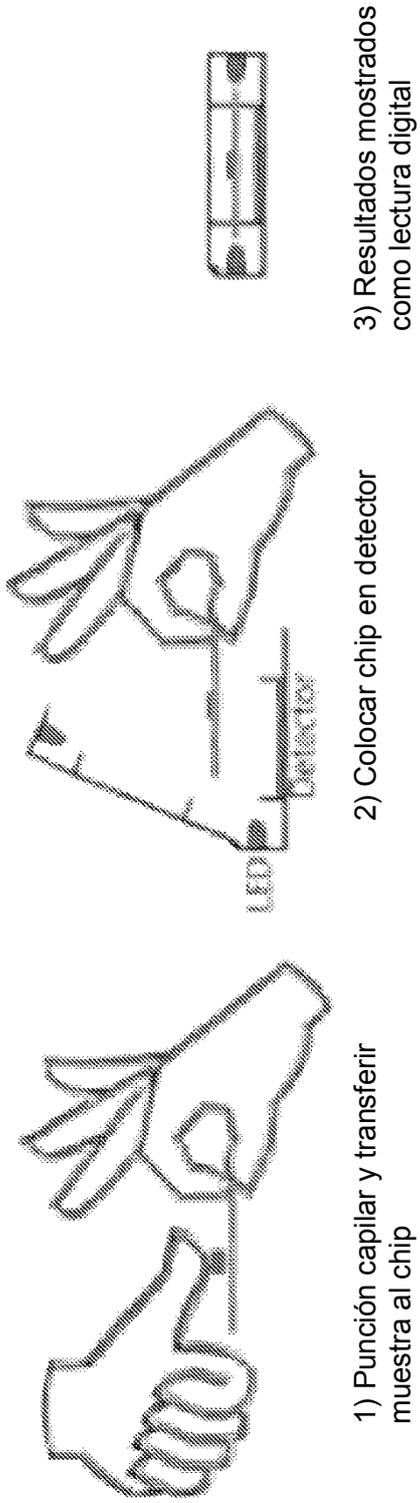


FIGURA 6

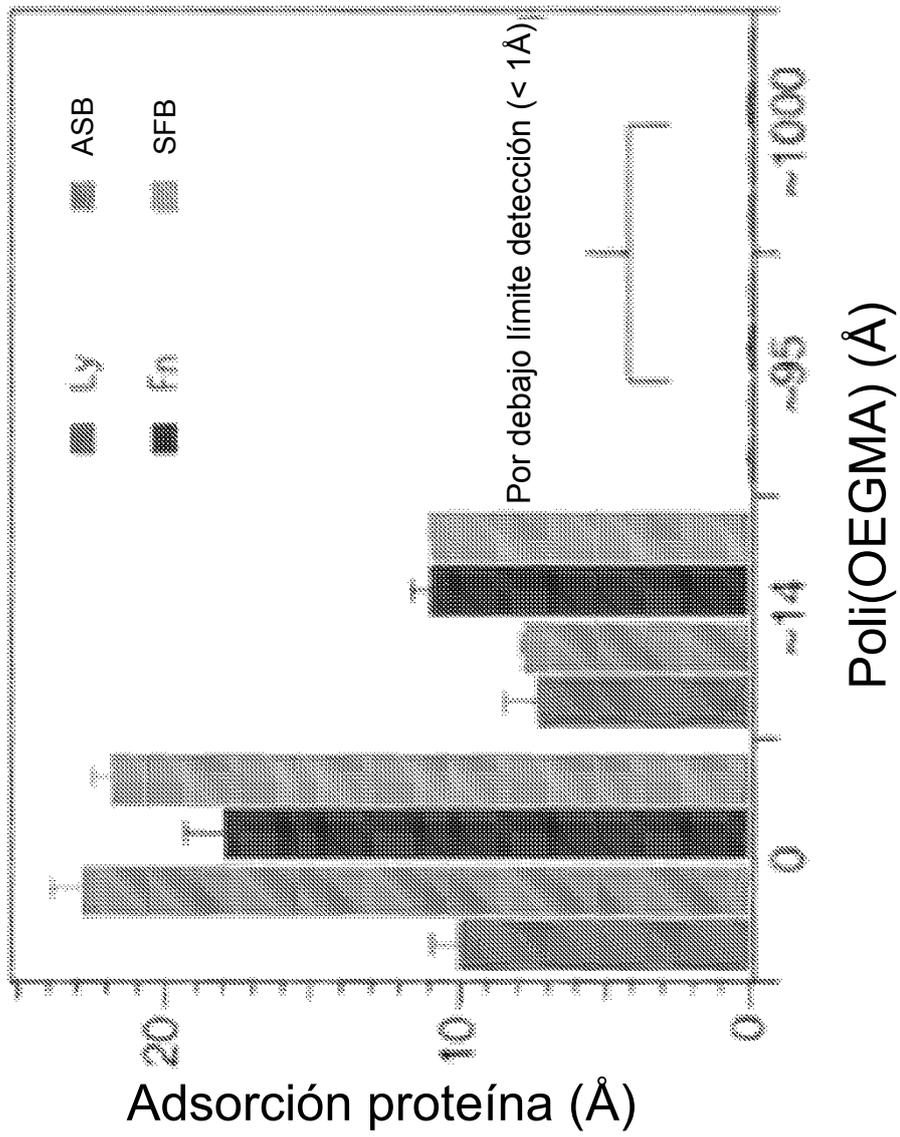


FIGURA 7

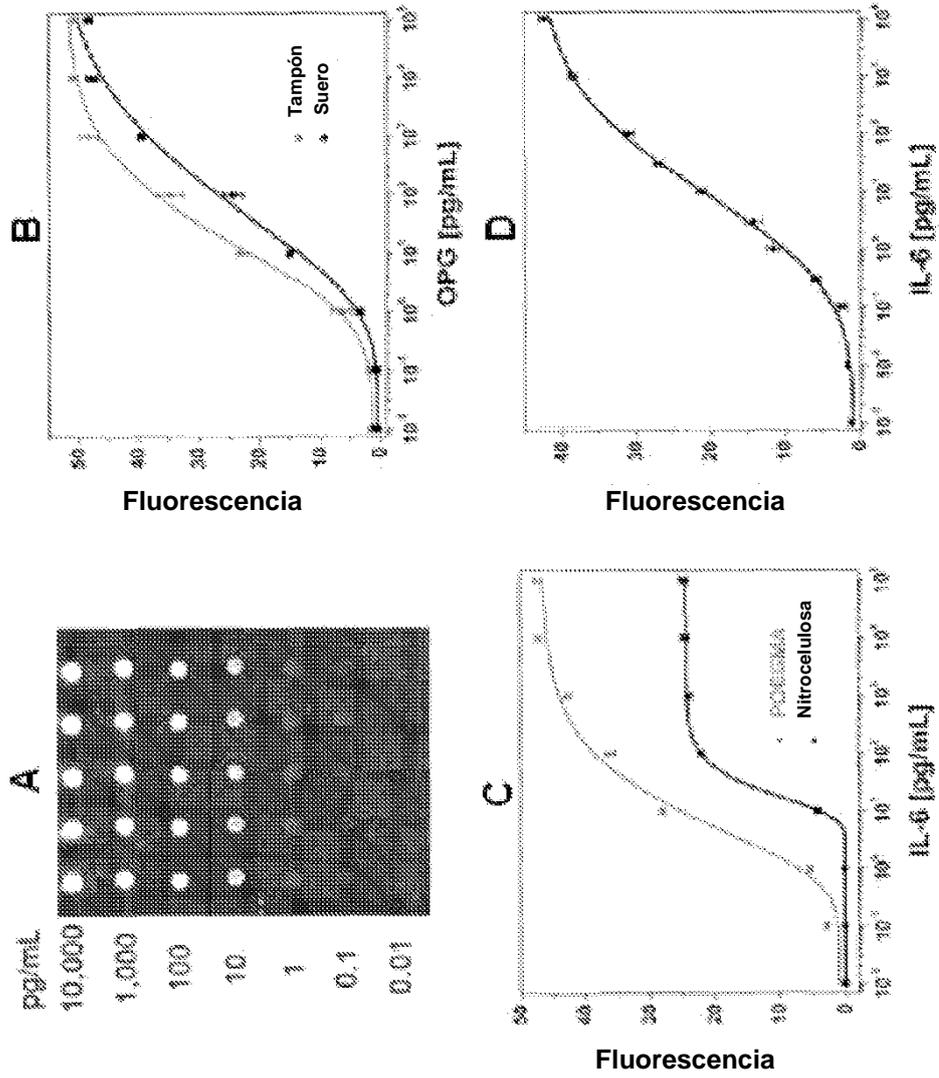


FIGURA 8

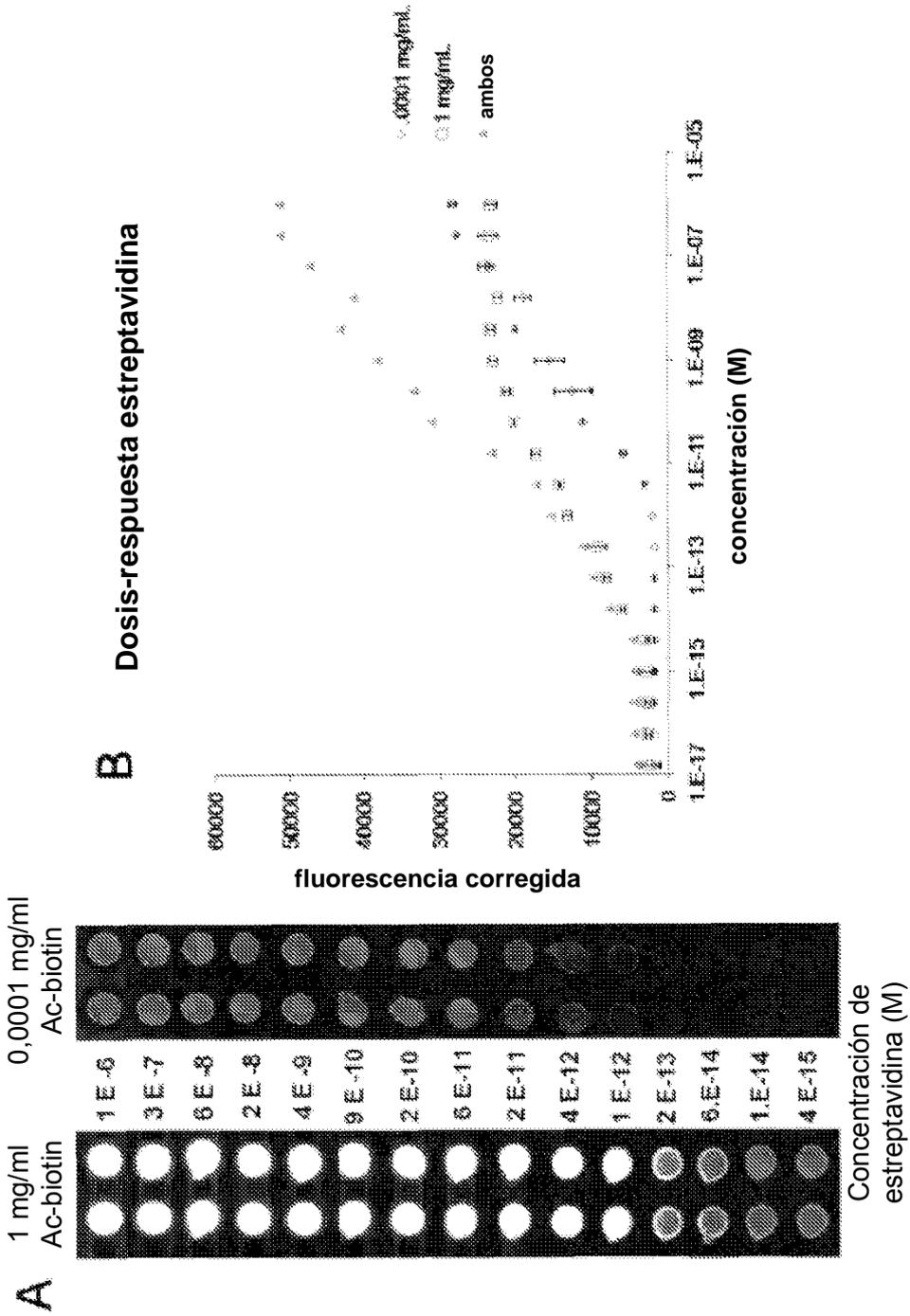


FIGURA 9

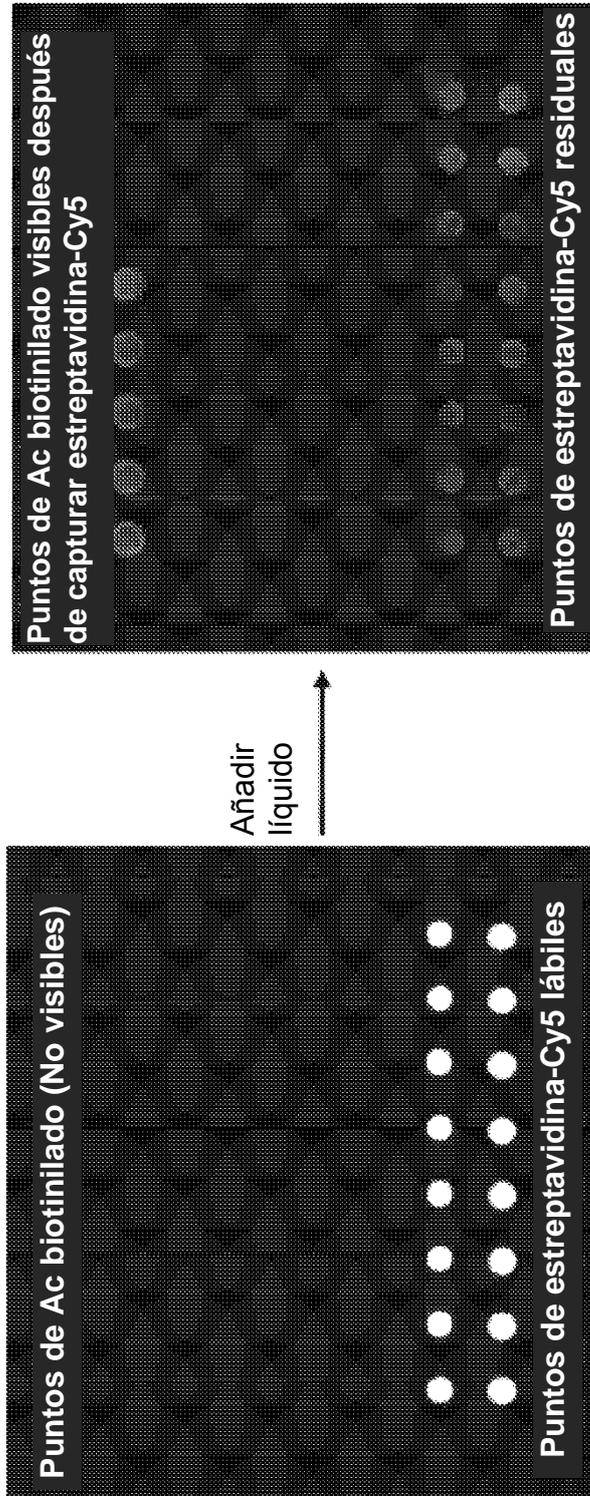


FIGURA 10

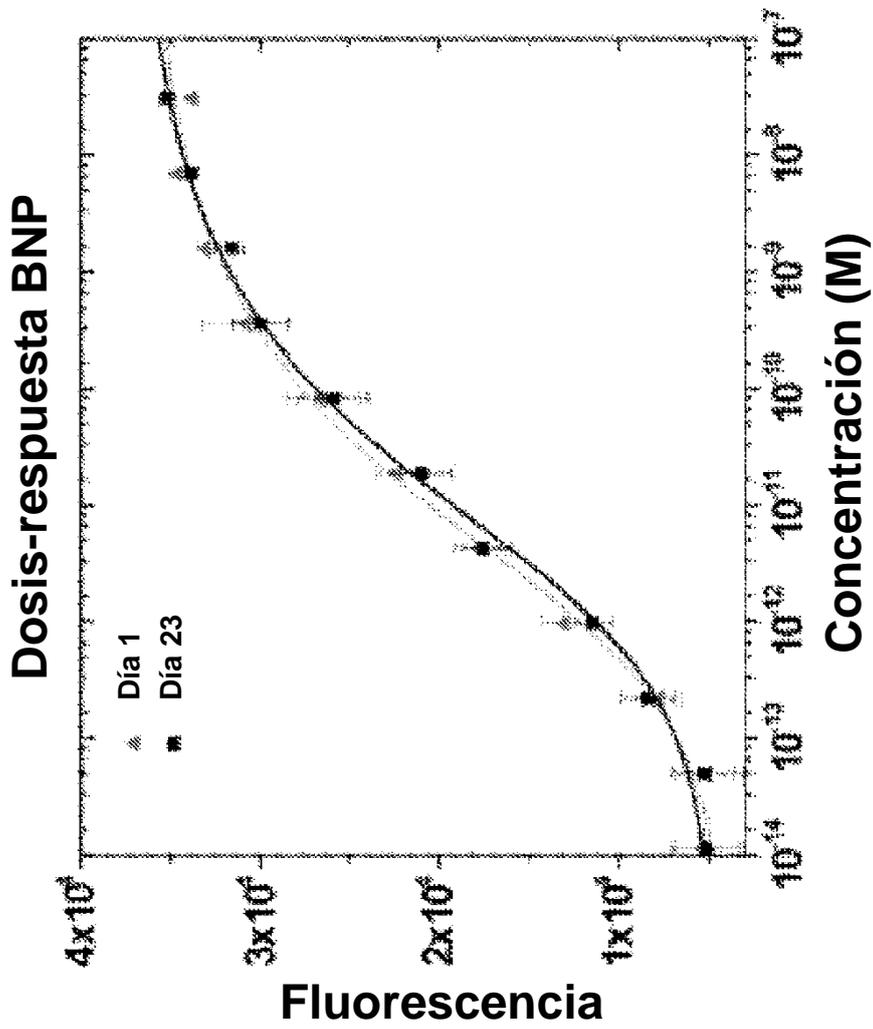


FIGURA 11

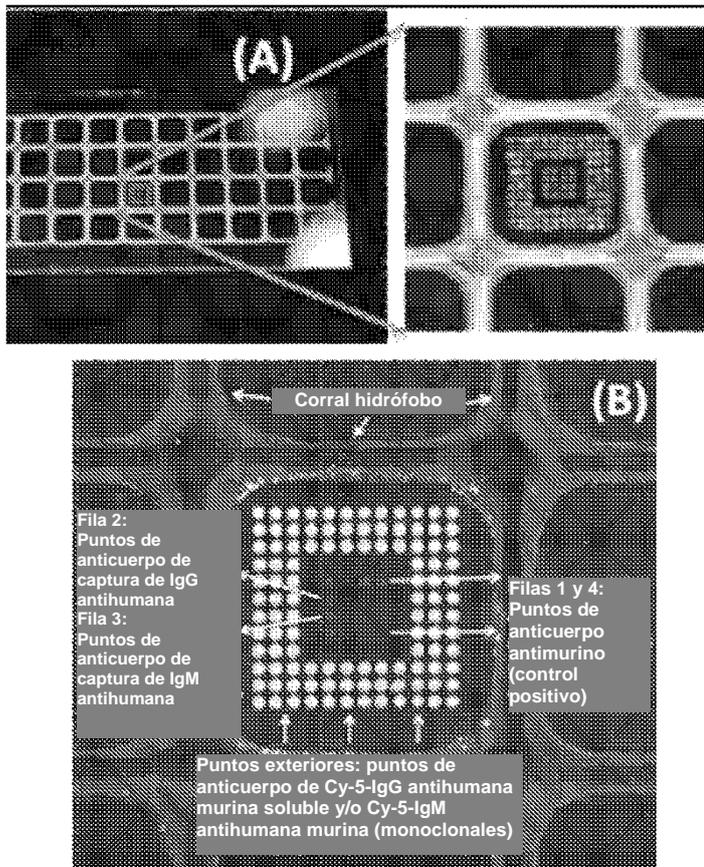


FIGURA 12

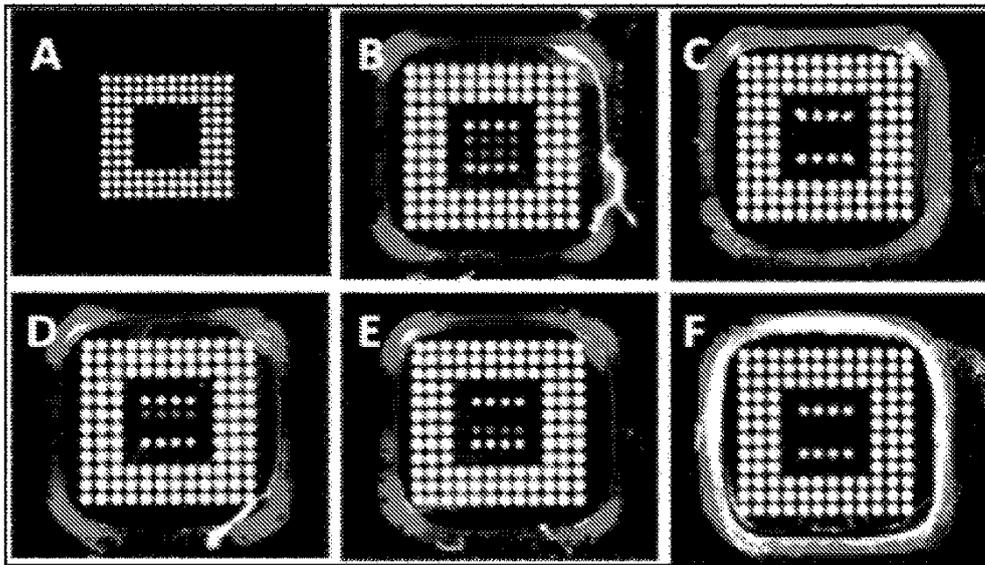


FIGURA 13

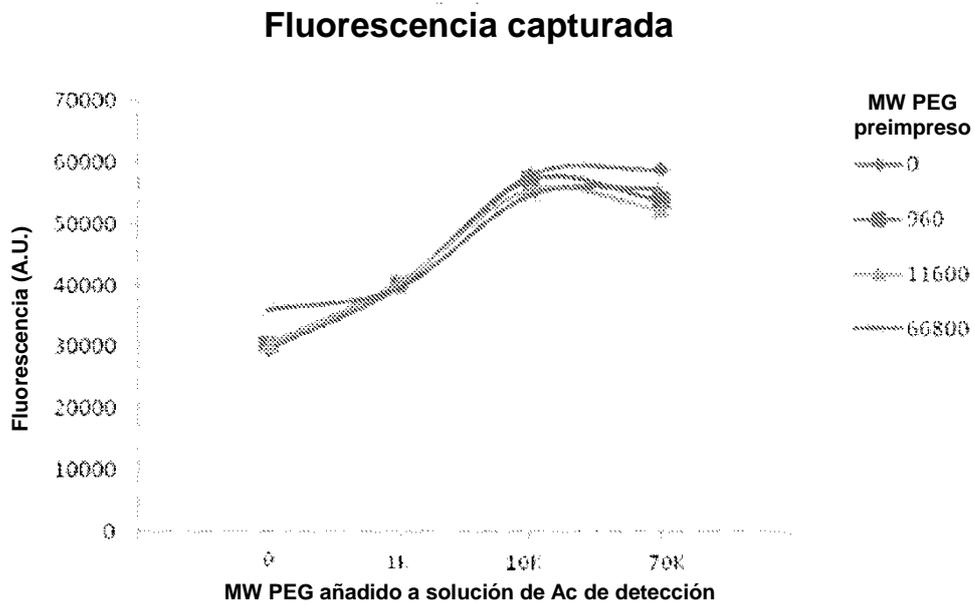


FIGURA 14