



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 030**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 27/403 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04796297 .2**

96 Fecha de presentación : **22.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1680511**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54 Título: **Biosensor electroquímico enzimático.**

30 Prioridad: **24.10.2003 US 513817 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

73 Titular/es: **BAYER HEALTHCARE, L.L.C.**
555 White Plains Road
Tarrytown, New York 10591, US

72 Inventor/es: **Wu, Huan-Ping;**
Beer, Greg, P. y
Blaschke, Christina

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 030 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

Biosensor electroquímico enzimático

Antecedentes

En el control de las afecciones médicas y la respuesta de pacientes a los esfuerzos para tratar afecciones médicas, es deseable usar procedimientos analíticos que son rápidos, precisos, y convenientes para el paciente. Has sido útiles procedimientos electroquímicos para cuantificar ciertos analitos en fluidos corporales, particularmente en muestras de sangre. Típicamente, estos analitos experimentan reacciones de oxidación - reducción cuando están en contacto con enzimas específicas, y la corriente eléctrica generada por estas reacciones se puede correlacionar con la concentración del analito de interés. Se han desarrollado versiones en miniatura de células electroquímicas analíticas que permiten que los pacientes a controlar los niveles de analitos particulares propios, sin la necesidad de un cuidador sanitario o técnico clínico. Los sensores electroquímicos de pacientes operados típicos utilizan una única unidad de medición que contiene los circuitos necesarios y los sistemas de producción. Cuando está en uso, esta unidad está conectada a una tira de análisis desechable que contiene los electrodos y los reactivos necesarios para medir las propiedades electroquímicas de una muestra que se aplica a la tira. Lo más común de estos sistemas electroquímicos en miniatura son los sensores de glucosa que proporcionan mediciones de los niveles de glucosa en sangre. De manera ideal, un sensor en miniatura para la glucosa debe proporcionar lecturas precisas de los niveles de glucosa en sangre mediante el análisis de una sola gota de sangre, típicamente entre 1 - 15 microlitros (μl).

En una célula electroquímica analítica típica, independientemente del tamaño del sistema, la reacción de oxidación o reducción de media célula que implica que el analito o bien produzca o consuma electrones. Este flujo de electrones se puede medir, siempre que los electrones puedan interactuar con el electrodo operativo que está en contacto con la muestra a analizar. El circuito eléctrico se completa mediante un electrodo en contra que también está en contacto con la muestra. También se produce una reacción química en el electrodo opuesto, y esta reacción es del tipo opuesto (oxidación o reducción) con relación al tipo de reacción en el electrodo operativo. Véase, por ejemplo, Fundamentals Of Analytical Chemistry, 4ª Edición, D.A. Skoog y D.M. West; Philadelphia: Saunders College Publishing (1982), p 304 - 341.

En algunos sistemas electroquímicos en miniatura convencionales usados para diagnosis, se emplea una combinación de electrodo opuesto/de referencia. Este tipo de electrodo de combinación es posible cuando los materiales del electrodo de referencia están separados, por su insolubilidad, de los componentes de reacción de la solución de análisis. Los electrodos opuesto / de referencia son típicamente una mezcla de plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl), que muestra propiedades electroquímicas estables debido a la insolubilidad de sus componentes medio acuoso; medio de la solución de análisis. Ya que la relación de Ag a AgCl no cambia de manera significativa durante el uso, las propiedades electroquímicas del electrodo del mismo modo no cambian de manera significativa.

Aunque las funciones del electrodo Ag/AgCl así como las del electrodo de referencia, puede ser menor que el ideal en su función como un electrodo opuesto. El material Ag/AgCl tiene una alta resistividad, que inhibe su capacidad para transportar la corriente eléctrica. De este modo, altas tensiones y / o niveles de corriente pueden ser necesarios para que funciones el sensor. Esto puede ser especialmente problemático en tiras de análisis electroquímico en miniatura, ya que pequeñas fluctuaciones y variabilidades pueden reducir notablemente la sensibilidad de la medición. Muestras que contienen altas concentraciones del analito pueden producir resultados erróneos si la alta corriente producida mediante la reacción del analito está impedida por el electrodo opuesto. Otra característica de tiras electroquímicas en miniatura convencionales es la presencia de una única capa de reactivo sobre tanto los electrodos operativo como opuesto. Los componentes de esta capa de reactivo incluyen la enzima que facilita la reacción de oxidación - reducción del analito, así como cualesquiera mediadores de otras sustancias que ayudan a transferir los electrones entre la reacción de oxidación - reducción y el electrodo operativo.

El documento US 6.287.451 B1 divulga una tira de reactivo con un electrodo de referencia y dos electrodos de trabajo. Las capas de reactivo del primer electrodo operativo (W1) y el electrodo de referencia (R) comprende un mediador redox además de los ingredientes inertes que no están implicados directamente en las reacciones de oxidación - reducción. Se describe ferricianuro de potasio como mediador redox. La capa de reactivo del segundo electrodo operativo (W2) es similar al del primer electrodo operativo (W1) pero además de una enzima capaz de catalizar una reacción que implica un sustrato de la enzima. Se describe que la capa de reactivo del segundo electrodo operativo (W2) comprende ferricianuro de potasio y glucosa oxidasa como componentes principales.

El documento US 2001/0006149 A1 divulga un sensor electroquímico con un electrodo operativo y un electrodo opuesto, en el que la primera capa de reactivo formada sobre el electrodo operativo comprende una enzima como componente principal, y la segunda capa de reactivo comprende un mediador de electrones como el componente principal. Se describe una realización preferida, en la que la primera capa de reactivo no contiene un mediador de electrones y la segunda capa de reactivo no contiene una enzima.

El documento EP 0 909 952 B1 divulga un biosensor que tiene un electrodo operativo y un electrodo opuesto. El electrodo opuesto incluye un compuesto redox en estado reducido. Una capa de reactivo que se forma sobre ambos electrodos contiene una oxidorreductasa y un mediador de electrones.

5 El uso de una sola capa de reactivo puede proporcionar una sencilla fabricación de las tiras, ya que solamente una etapa de deposición cubre el material sobre los electrodos. Una desventaja de la construcción de una sola capa es que cada electrodo está en contacto con el mismo ambiente cuando el dispositivo está en uso. De este modo, el ambiente individual de cada electrodo no se controla para proporcionar las condiciones óptimas de la función de electrodo. Esta pérdida de optimización también puede reducir la sensibilidad del sistema.

10 Existe la necesidad de sistemas electroquímicos en miniatura con sensibilidad mejorada a la concentración de análisis en muestras de paciente. Es deseable para las tiras electroquímicas en miniatura que contengan electrodos optimizados independientemente que tengan altas conductividades.

Sumario

En un aspecto de la invención, existe un sensor electroquímico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14.

15 En todavía otro aspecto de la invención, existe un procedimiento de preparación de una tira de sensor electroquímico de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16.

En todavía otro aspecto de la invención, existe un procedimiento de cuantificación de un analito en una muestra de acuerdo con una de las reivindicaciones 17 a 19.

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1 es un diagrama de vista de la parte superior de una base de sensor que contiene un electrodo operativo y un electrodo opuesto. ;

Figura 2 es un diagrama de vista desde el extremo de la base del sensor de la Figura 1.

Figura 3 es un diagrama de vista de la parte superior de una base de sensor y electrodos bajo una capa dieléctrica.

Figura 4 es un diagrama de vista en perspectiva de una tira de sensor completamente ensamblada.

25 Figura 5 es una microfotografía de un electrodo operativo y electrodo opuesto que tiene capas de reactivo separadas.

Figura 6 es un conjunto de voltamogramas cíclicos para las tiras de sensor que tienen diferentes capas sobre el electrodo opuesto.

Figura 7 es un gráfico de corriente medida como una función de concentración de glucosa para tiras de sensor que tienen diferentes electrodos opuestos.

30 Figura 8 es un conjunto de voltamogramas cíclicos para tiras de sensor que tienen diferentes electrodos de trabajos.

Figura 9 es un conjunto de voltamogramas cíclicos a diversas concentraciones de glucosa para una tira de sensor que tiene ferricianuro sobre el electrodo opuesto, pero sin ferrocianuro en el electrodo operativo.

Figura 10 es un gráfico de corriente medida como una función de la concentración de glucosa para una tira de sensor.

35 Figuras 11 - 13 son diagramas de visión superior de bases de sensor que contienen un electrodo operativo, un electrodo opuesto, y un tercer electrodo.

Figura 14 es un diagrama de vista de recorte de la base de sensor de la Figura 12.

Descripción detallada

40 La presente invención se refiere a un biosensor electroquímico para determinar la presencia o cantidad de una sustancia en una muestra. El biosensor incluye tiras de sensor de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14 que contiene un electrodo operativo y un electrodo opuesto, cada uno de los cuales está al menos parcialmente cubierto con una capa de reactivo separado. Los sensores de la presente invención pueden proporcionar mejoras en precisión, intervalo de análisis, y vida útil.

45 La expresión "muestra" se define como una composición que contiene una cantidad desconocida del analito de interés. Típicamente, una muestra para análisis electroquímico está en forma líquida, y preferiblemente la muestra

está en mezcla acuosa. Una muestra puede ser una muestra biológica, tal como sangre, orina o saliva. Una muestra puede ser un derivado de una muestra biológica, tal como un extracto, una dilución, un filtrado, o un precipitado reconstituido.

5 La expresión "analito" se define como una sustancia en una muestra, la presencia o cantidad de la que se va a determinar. Un analito interactúa con la enzima oxidorreductasa presente durante el análisis, y puede ser un sustrato para la oxidorreductasa, una coenzima, u otra sustancia que afecta a la interacción entre la oxidorreductasa y su sustrato.

10 La expresión "oxidorreductasa" se define como cualquier enzima que facilita la oxidación o reducción de un sustrato. El término oxidorreductasa incluye "oxidasas," que facilitan las reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular es el aceptor de electrones; "reductasas," que facilitan las reacciones de reducción en las que el analito se reduce y el oxígeno molecular no es el aceptor de electrones. Véase, por ejemplo, Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition, A.D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997) p. 161, 476, 477, y 560.

15 La expresión reacción de "oxidación-reducción" se define como una reacción química entre dos especies que implican la transferencia de al menos un electrón de una especie de las otras especies. Este tipo de reacción también se denomina como una "reacción redox." La parte de oxidación de la reacción implica la pérdida de al menos un electrón por una de las especies, y la parte de reducción implica la adición de al menos un electrón a la otra especie. La carga iónica de una especie que está oxidada se realiza de manera más positiva mediante una
20 cantidad igual al número de electrones transferidos. Del mismo modo, la carga iónica de una especie que está reducida se hace menos positiva por una cantidad igual al número de electrones transferidos.

25 La expresión "número de oxidación" se define como la carga iónica formal de una especie química tal como un átomo. Un número de oxidación mayor, tal como (III), es más positivo, y un menor número de oxidación, tal como (II), es menos positivo. Una especie neutra tiene una carga iónica de cero. La oxidación de una especie da como resultado un incremento en el número de oxidación de esa especie, y reducción de una especie da como resultado una disminución en el número de oxidación de esa especie.

La expresión "par redox" se define como dos especies de una sustancia química que tiene números de oxidaciones diferentes. La reducción de la especie que tiene el número de oxidación mayor produce la especie que tiene menor el número de oxidación menor. De manera alternativa, oxidación de la especie que tiene el menor número de
30 oxidación produce la especie que tiene un mayor número de oxidación.

La expresión "especie oxidable" se define como la especie de un par redox que tiene un menor número de oxidación, y que de este modo es capaz de oxidarse en la especie que tiene el mayor número de oxidación. Del mismo modo, el término "especie reducible" se define como la especie de un par redox que tiene el mayor número de oxidación, y que de este modo es capaz de reducirse en la especie que tiene el menor número de oxidación.

35 La expresión "especie soluble redox" se define como una sustancia que es capaz de someterse a oxidación o reducción y que es soluble en agua (pH 7, 25° C) a un nivel de al menos 1,0 gramos por litro. Las especies solubles redox incluyen complejos de metal de organotransición, y complejos de coordinación de metal de transición. El término "especie soluble redox" excluye metales elementales e iones metálicos solos, especialmente los que son insolubles escasamente solubles en agua.

40 La expresión "complejo de metal de organotransición" también se denomina "complejo OTM" se define como un complejo en el que un metal de transición está unido a al menos un átomo de carbono mediante un enlace sigma (carga formal de -1 sobre el átomo de carbono sigma unido al metal de transición) o un enlace pi (carga formal de 0 sobre los átomos de carbono pi unidos al metal de transición). Por ejemplo, ferroceno es un complejo de OTM con dos anillos de ciclopentadienilo (Cp), cada uno unido mediante sus cinco átomos de carbono a un centro de hierro
45 por dos enlaces pi y un enlace sigma. Otro ejemplo de un complejo OTM es ferricianuro (III) y su pareja de ferrocianuro (II) reducido, donde los ligandos de seis ciano (carga formal de -1 en cada uno de los 6 ligandos) están unidos sigma a un centro de hierro mediante los átomos de carbono de los grupos ciano.

La expresión "complejo de coordinación" se define como un complejo que tiene geometría de coordinación bien definida, tales como geometría octaédrica o planar cuadrada. De manera diferente los complejos de OTM, que
50 están definidos por su unión, complejos de coordinación se definen por su geometría. De este modo, complejos de coordinación pueden ser complejos de OTM (tal como el ferricianuro mencionado anteriormente), o complejos en los que los átomos no metálicos distintos de carbono, tales como heteroátomos que incluyen nitrógeno, azufre, oxígeno, y fósforo, están unidos de manera dativa al centro de metal de transición. Por ejemplo, rutenio hexamina es un complejo de coordinación que tiene una geometría octaédrica bien definida donde seis ligandos NH₃ (carga formal de 0 sobre cada uno de los 6 ligandos) están unidos de manera dativa al centro de rutenio. Una descripción más
55

completa de metal de organotransición, complejos de coordinación, y unión de metal de transición se pueden encontrar en Collman et al., Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry (1987) and Miessler & Tarr, Inorganic Chemistry (1991).

5 La expresión "mediador" se define como una sustancia que se puede oxidar o reducir y que puede transferir uno o más electrones entre una primera sustancia y una segunda sustancia. Un mediador es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés. En un sistema simplista, el mediador se somete a una reacción redox con la oxidorreductasa después que la oxidorreductasa se haya reducido u oxidado mediante su contacto con un sustrato apropiado. Este mediador oxidado o reducido después se somete a la reacción opuesta al electrodo y se regenera a su número de oxidación original.

10 La expresión "molécula orgánica electroactiva" se define como una molécula orgánica que no contiene un metal y que es capaz de someterse a reacción de oxidación o reducción. Las moléculas orgánicas electroactivas se comportan como mediadores. Ejemplos de moléculas orgánicas electroactivas incluyen coenzima pirroloquinolina quinona (PQQ), benzoquinonas y naftooquinonas, N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenencinas, fenotiazinas, indofenoles, e indaminas.

15 La expresión "electrodo" se define como una sustancia conductora de manera eléctrica que permanece estacionaria durante el análisis electroquímico. Ejemplos de materiales de electrodo incluyen metales sólidos, pastas de metal, carbono conductor, pastas de carbono conductor, y polímeros conductores.

La expresión "material no ionizante" se define como un material que no se ioniza durante el análisis electroquímico of un analito. Ejemplos materiales no ionizantes incluyen carbono, oro, platino y paladio.

20 La expresión "sobre" se define como "por encima" y es relativo a la orientación que se está describiendo. Por ejemplo, si un primer elemento se deposita sobre al menos una parte de un segundo elemento, el primer elemento es una parte de un segundo elemento, el primer elemento se dice que está "sobre" el segundo. El uso del término "sobre" no excluye la presencia de sustancias entre los elementos superiores e inferiores que se describen. Por ejemplo, un primer elemento puede tener un revestimiento sobre su superficie superior, incluso un segundo elemento
25 sobre al menos una parte del primer elemento y su revestimiento superior se puede describir como "sobre" el primer elemento. De este modo, el uso del término "sobre" puede o no puede significar que los dos elementos están relativamente en contacto físico entre sí.

Los sensores analíticos electroquímicos se pueden construir de una diversidad de formas y usando una diversidad de materiales. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos números. 5.120.420 y 5.798.031. Con relación a las
30 Figuras 1-3 y 11-14, en general, los materiales de electrodo se depositan en un material de base 10. El material de base es preferiblemente un aislante eléctrico de manera que aisle el sistema electroquímico de sus alrededores. Los materiales de electrodo se pueden configurar para configurar el circuito exterior, por ejemplo mediante conductores 12 y 14. Estas conexiones permiten que la respuesta electroquímica del sensor a controlar y / o manipular. Preferiblemente, los materiales de electrodo y el sensor entero se configuran para que sean compatibles con los
35 dispositivos de medición electroanalíticos existentes además, los materiales de electrodo se configuran para proporcionar contacto con la muestra a analizar. Cada electrodo está revestido con una capa de material que contiene reactivos analíticos apropiados. El electrodo operativo 20 está revestido con una primera capa 26 que contiene una enzima oxidorreductasa y un mediator. El electrodo opuesto 30 está revestido con una segunda capa 36 que contiene una especie redox soluble. Los electrodos se pueden cubrir parcialmente por una capa dieléctrica
40 40, tal como un polímero aislante, para aislar las partes de los electrodos que están en contacto con el reactivo las capas de las partes que conectan los electrodos con el circuito exterior. Esta capa dieléctrica, si está presente, se puede depositar antes, durante o después del revestimiento de los electrodos con la capa de reactivo adecuada. El conjunto entero se cubre después al menos parcialmente con una tapa 50. Preferiblemente la tapa cubre, pero no está en contacto con las capas de reactivo, de manera que proporcione un espacio para la muestra a depositar y
45 analizar. El tercer electrodo opcional 70 está revestido con una tercera capa 76 que contiene una especie redox soluble. El tercer electrodo opcional se puede configurar para conectar el circuito exterior mediante el conductor 13.

Cada electrodo puede contener cualquier sustancia eléctricamente activa, incluyendo metales, polímeros conductores, y carbono conductor. Ejemplos de materiales conductores incluyen una capa fina de un metal tal como oro, plata, platino, paladio, cobre, o tungsteno, así como una capa fina de polvo de carbono conductor.
50 Preferiblemente, electrodos que están en contacto con la muestra durante el uso del sensor se fabrican de materiales inertes, de manera que el electrodo no experimente una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis. Más preferiblemente, se fabrican electrodos que están en contacto con la muestra durante el uso del sensor de materiales no ionizantes, tales como carbono, oro, platino, y paladio. En algunos casos, materiales ionizantes, tal como plata, puede formar una especie redox durante el uso del sensor que puede influir adversamente en la
55 corriente o potencial medido del sistema.

Se pueden depositar metales sobre un material base mediante deposición de una lámina de metal, mediante deposición de vapor química, o mediante deposición de una suspensión del metal sobre la base. Se puede depositar carbono conductor, por ejemplo, mediante pirólisis de un material que contiene carbono o por deposición de una suspensión de polvo de carbono. La suspensión puede contener más de un tipo de material conductor. Por ejemplo, la suspensión puede contener tanto paladio como polvo de carbono. En el caso de deposición de suspensión, la mezcla de fluido se puede aplicar como una tinta la material de base material, como se describe en la Patente de Estados Unidos nº. 5.798.031.

El ejemplo ilustrado en la Figura 2 muestra un electrodo operativo 20 y un electrodo opuesto 30, cada uno de los cuales contiene un conductor principal 22 ó 32 y un conductor de superficie opcional 24 ó 34. La configuración y el número de componentes de un sistema de electrodo dado puede variar ampliamente para optimizar la respuesta eléctrica de los electrodos a la electroquímica que tiene lugar cuando una muestra se está analizando. Puede ser deseable para un conductor principal (22 ó 32) que va a ser un extremo de una parte de una única sustancia conductora, mientras que los conductores de conexión, (12 ó 14) están en el otro extremo de la parte. El conductor de superficie opcional puede entonces funcionar para convertir la señal electroquímica en flujo de electrones de estado sólido que se va a comunicar con una unidad de medición mediante la sustancia conductora. (es decir que fluye de 22 a 12). En un ejemplo, los conductores principales 22 y 32 son piezas de lámina de meta que están contiguas con los conductores de conexión 12 y 14, y conductores de superficie 24 y 34 son capas de polvo de carbón conductor.

El ejemplo ilustrado en la Figura 14 muestra un electrodo opuesto 30 y un tercer electrodo 70, cada uno de los cuales contiene un conductor principal 32 ó 72 y un conductor de superficie opcional 34 ó 74. Los componentes del tercer electrodo también pueden variar para optimizar el comportamiento global del sensor. Puede ser deseable para el conductor principal 72 que va a ser un extremo de la parte de una única sustancia conductora, mientras el conductor de conexión 13 está en el otro extremo de la parte. En un ejemplo, conductor principal 72 es una pieza de una lámina de metal que es contigua al conductor de conexión 13. Conductor de superficie opcional 74 puede ser, por ejemplo, una capa de polvo de carbón conductor. La tercera capa 76, que contiene una especie soluble redox, puede tener una composición que es diferente de la composición de la segunda capa 36, o la segunda y tercera capas pueden ser idénticas. En un ejemplo, la tercera capa es una parte de la segunda capa que se configura para cubrir los conductores 32 (y opcionalmente 34) y 72 (y opcionalmente 74).

Si un electrodo contiene un electrodo de superficie, se prefiere que el electrodo de superficie sea un material conductor no ionizante. Si un electrodo es simplemente una capa de material conductor sin una capa conductora distinta sobre su superficie, se prefiere que el material conductor sea no ionizante. Más preferiblemente, la superficie del electrodo opuesto, que puede o no puede ser una capa distinta de del conductor principal, es un material no ionizante.

Las capas de reactivo para los electrodos operativo y opuesto tienen composiciones que son diferentes entre sí. Esta distinción permite que las capas de reactivo se van a optimizar separadamente para proporcionar una tira de sensor que tiene propiedades mejoradas de análisis electroquímico. La capa sobre el electrodo operativo contiene moléculas electroactivas que facilitan la reacción del molécula orgánica electroactivas del analito y la comunicación de los resultados de esta reacción al electrodo y la circuitería conectada. La capa sobre el electrodo opuesto contiene ingredientes que facilitan el flujo libre de electrones entre la muestra que se está analizando y el electrodo y su circuitería conectada. Para optimizar además el sistema, un tercer electrodo puede tener una capa que contiene ingredientes que facilitan el flujo libre de electrones entre la muestra que se está analizando y el electrodo y su circuitería conectada. Cada una de las capas puede independientemente contener ingredientes inertes que no están implicados directamente en ninguna de las reacciones de oxidación - reducción en la célula electroquímica. Ejemplos de tales ingredientes inertes incluyen agentes de unión tales como bentonita, óxido de polietileno, o carboximetil celulosa; agentes espesantes tales como sílice u óxido de polietileno; y uno o más tampones.

La capa sobre el electrodo operativo contiene una enzima oxidorreductasa. La oxidorreductasa puede ser específica para un sustrato que es el analito de interés. La oxidorreductasa puede ser específica para un sustrato de manera que la reacción de la oxidorreductasa y su sustrato esté afectada por la presencia o cantidad del analito de interés. Ejemplos de oxidorreductasas y sus sustratos específicos se proporcionan en la Tabla 1. Por ejemplo, una alcohol oxidasa se puede usar en la capa de reactivo para proporcionar un sensor que es sensible a la presencia de alcohol en una muestra. Tal sistema puede ser útil en la medición de concentraciones de alcohol en sangre. En otro ejemplo, glucosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa se puede usar en la capa de reactivo para proporcionar un sensor que es sensible a la presencia de glucosa en una muestra. Este sistema puede ser útil en la medición de concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo en pacientes que se sabe o se sospecha que tienen diabetes. Si las concentraciones de dos sustancias diferentes están unidas mediante una relación conocida, entonces la medición de una de las sustancias mediante su interacción con la oxidorreductasa puede proporcionar el cálculo de la concentración de la otra sustancia. Por ejemplo, una oxidorreductasa puede proporcionar un sensor que es sensible

a un sustrato particular, y la concentración medida de este sustrato se puede usar después para calcular la concentración del analito de interés.

Tabla I

Oxidorreductasa (capa de reactivo)	Sustrato / analito
Glucosa deshidrogenasa	β -glucosa
Glucosa oxidasa	β -glucosa
Colesterol esterasa; colesterol oxidasa	Colesterol
Lipoproteína lipasa; glicerol quiinasa; glicerol-3-fosfato oxidasa	Triglicéridos
Lactato oxidasa; Lactato deshidrogenasa; diaforasa	Lactato
Piruvato oxidasa	Piruvato
Alcohol oxidasa	Alcohol
Bilirrubina oxidasa	Bilirrubina
Uricasa	Ácido úrico
Glutación reductasa	NAD(P)H
Monóxido de carbono oxidorreductasa	Monóxido de carbono

- 5 La capa sobre el electrodo operativo contiene una o más sustancias mediadoras. La presencia de un mediador puede potenciar la transmisión de señal eléctrica de la reacción redox facilitada por enzima al material de electrodo. Sin desear estar unido a ninguna teoría de interpretación, se cree que los mediadores pueden actuar o bien como un cofactor redox en la reacción enzimática inicial o como un colector redox para aceptar electrones de o donar electrones a la enzima u otra especie después que se haya producido la reacción. En la situación de un cofactor redox, el mediador se cree que es la especie que equilibra la reacción redox del sustrato. De este modo si el sustrato se reduce, el mediador se oxida. En la situación de un colector redox, otra especie se puede haber oxidado o reducido inicialmente para equilibrar la reacción redox del sustrato. Esta especie puede ser la propia oxidorreductasa, o puede ser otra especie tal como un cofactor redox.

- 15 Se describen mediadores en células electroquímicas enzimáticas, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos nº. 5.653.863. En algunos casos, el mediador puede funcionar para regenerar la oxidorreductasa. Por ejemplo, si la enzima oxida un sustrato, la propia enzima se reduce. La interacción de esta enzima con un mediador puede dar como resultado la reducción del mediador, conjuntamente con la oxidación de la enzima a su estado original, sin reaccionar. la interacción del mediador con el electrodo a un potencial eléctrico apropiado puede dar como resultado una liberación uno o más electrones al electrodo conjuntamente con oxidación del mediador a su estado original, sin reaccionar.

- 25 Mediadores son moléculas orgánicas electroactivas que incluyen coenzimas tal como una coenzima pirroloquinolina quinina (PQQ); las benzoquinonas y naftoquinonas sustituidas descritas en la Patente de Estados Unidos nº. 4.746.607, los compuestos N-óxidos, nitroso, hidroxilaminas y oxinas específicamente descritos en el documento EP 0 354 441; las flavinas, fenencinas, fenotiazinas, indofenoles, 1,4-benzoquinonas sustituidas e indaminas descritos en el documento EP 0 330 517, que se incorpora en el presente documento como referencia; y las sales fenazinio y fenoxazinio descritas en la Patente de Estados Unidos nº. 3.791.988, que se incorpora en el presente documento por referencia. Una revisión de mediadores electroquímicos de sistemas redox biológicos se pueden encontrar en Analytica Clinica Acta. 140 (1982), páginas 1 - 18. Ejemplos de mediadores de molécula orgánica electroactiva también incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos nº. 5.520.786 que incluye 3- fenilimino-3H-fenotiazina (PIPT), y 3-fenilimino-3H-fenoxazina (PIPO).

La capa de reactivo sobre el electrodo opuesto contiene una especie redox soluble. La especie redox soluble experimenta la reacción opuesta con relación a la reacción del sustrato de la oxidorreductasa, y haciéndolo así se convierte en su especie homóloga del par redox. Por ejemplo, si el analito se reduce, la especie redox soluble se oxida; y si el analito se oxida, la especie redox soluble se reduce. La especie homóloga del par redox está presente en la capa, pero está presente en una concentración menor que la concentración de la especie redox primaria.

Una especie redox soluble puede ser un complejo de metal de organotransición, puede ser un complejo de coordinación de metal de transición, o pueden ser mezclas de cualesquiera de éstos.

Una especie redox soluble puede ser un complejo de metal de organotransición o un complejo de coordinación de metal de transición. Muchos metales de transición se producen de forma natural en forma de compuestos con hidrógeno, oxígeno, azufre, u otros metales de transición, y estos metales de transición se observan en general en uno o más estados de oxidación. Por ejemplo hierro, cromo, y cobalto se encuentran típicamente en estados de oxidación de +2 (es decir, II) o +3 (es decir, III). De este modo, hierro (II) y hierro (III) son dos especies de un par. Sin embargo, muchos metales elementales o iones metálicos, son solamente escasamente solubles en ambientes acuosos, limitando su utilidad como especie redox en el equilibrio de las reacciones de oxidación - reducción en un sistema de análisis electroquímico. Los iones metálicos que están unidos o coordinados a ligandos se pueden hacer más solubles por su asociación con aquellos ligandos. Típicamente, el metal en un complejo de metal de organotransición o un complejo de coordinación de metal de transición es el resto en el complejo que está actualmente reducido u oxidado. Por ejemplo, el centro de hierro en ferroceno $[\text{Fe}(\text{II})(\text{C}_5\text{H}_6)_2]$ y en el ion ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{II})(\text{CN})_6]^{4-}$ está en el estado de oxidación formal +2, mientras el ion ferricianuro $[\text{Fe}(\text{III})(\text{CN})_6]^{3-}$ contiene hierro en su estado de oxidación formal +3. Ferrocianuro y ferricianuro conjuntamente forman un par redox, y o bien puede funcionar como la especie redox soluble en la capa de reactivo sobre el electrodo opuesto, dependiendo del tipo de oxidorreductasa usado en el electrodo operativo. Un ejemplo de un par redox que contiene complejos de coordinación de metal de transición es la combinación de dos especies de rutenio hexamina, $[\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ y $[\text{Ru}(\text{II})(\text{NH}_3)_6]^{2+}$.

La especie del par redox que está presente en la capa de reactivo sobre el electrodo opuesto, denominada la primera especie, está presente en una cantidad mayor molar que su especie homóloga (es decir, la segunda especie) del mismo par redox. La relación molar de la primera especie a la segunda especie es al menos 1.2:1. Preferiblemente, la relación molar de la primera especie a la segunda especie es al menos 2:1. Más preferiblemente, la relación molar ratio de la primera especie a la segunda especie es al menos 10:1. Todavía más preferiblemente, la relación molar de la primera especie a la segunda especie es al menos 100:1. Todavía más preferiblemente, la segunda especie del par redox está presente en una cantidad de 1 parte por mil (ppt) o menos antes del uso de la tira de sensor en un análisis. Todavía más preferiblemente, la segunda especie del par redox está presente en una cantidad de 1 parte por millón (ppm) o menos antes del uso de la tira del sensor en un análisis.

Preferiblemente, la especie soluble redox se solubiliza en la muestra y se mezcla con el analito y otros constituyentes de muestra. La especie soluble redox, con el tiempo, se mezclará con la enzima y el mediator, aunque esto no se puede producir a un grado que se pueda medir en el curso del análisis. La especie soluble redox no está separada de la muestra por una barrera mecánica, ni está separada de la muestra líquida en virtud de su existencia en una fase separada que es distinta de la muestra líquida.

En otra realización preferida, a especie soluble redox se elige para que tenga potencial de reducción estándar de +0,24 voltios o mayor, contra el electrodo de hidrógeno estándar (SHE). En todavía otra realización preferida, una especie soluble redox se elige para que tenga un potencial reducción estándar de +0.35 voltios o mayor, contra SHE. En todavía otra realización preferida, se elige una especie redox que tiene un potencial de reducción de aproximadamente +0.48 voltios contra SHE (en 0,01 M HCl).

De este modo, una amplia variedad de combinaciones de oxidorreductasas, mediadores, y especie soluble redox se pueden usar para preparar un sensor analítico electroquímico. El uso de la especie soluble redox que tiene mayor o menor número de oxidaciones con relación a su especie homóloga en el par redox se dicta por el tipo de reacción a realizar en el electrodo operativo. En un ejemplo, el analito experimenta oxidación por la interacción con una oxidasa o una deshidrogenasa. En este caso, la especie redox más concentrada sobre el electrodo opuesto tiene el mayor número de oxidación. Un ejemplo específico de esta situación es el análisis de glucosa usando glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa. En otro ejemplo, el analito experimenta la reducción por la interacción con una reductasa. En este caso, la especie redox más concentrada sobre el electrodo opuesto tiene el menor número de oxidación.

Si está presente un tercer electrodo en el sensor, también incluirán una capa de reactivo que contiene una especie soluble redox como se ha descrito para la capa de electrodo opuesto reactivo. Preferiblemente la capa de reactivo del tercer electrodo es idéntica a la capa del electrodo opuesto reactivo. Si las capas de reactivos sobre los electrodos tercero y opuesto son idénticas, entonces puede ser deseable simplemente recubrir ambos electrodos con una única parte de una composición de capa de reactivo.

Los sensores electroquímicos se pueden usar para medir la cantidad de un analito que es un sustrato para la oxidorreductasa sobre el electrodo operativo o que influye en la reacción de la oxidorreductasa con su sustrato. Para los sensores que se pretende que puedan hacerse funcionar por el paciente, es deseable para la muestra que sea una pequeña cantidad de fluido biológico del paciente. Es preferible para la muestra que se analice directamente, sin la necesidad de dilución, adición de reactivos u otras sustancias, o filtración u otros procedimientos de purificación de muestra. Los ejemplos de fluidos biológicos obtenidos fácilmente incluyen sangre, orina, y saliva. Con relación a la Figura 4, la muestra se aplica a los electrodos depositando una gota de la muestra en la muestra suministrada en el extremo de entrada 60 de la tira, que es opuesto al extremo de la tira que se conecta a la unidad de medición. La muestra migra al área entre la tapa en la parte superior del electrodo operativo y el electrodo opuesto en el fondo. Es de ayuda para la tapa que tenga una abertura 54 para permitir que el aire en el interior de la tira a purgar tras la aplicación de la muestra líquida. El área entre la tapa y la base puede contener una sustancia que retiene líquido e inmoviliza la muestra y su contenido en el área alrededor de los electrodos. Los ejemplos de tales sustancias incluyen polímeros que se hinchan en agua, tales como carboximetil celulosa y propilen glicol; y matrices de polímeros porosos, tales como dextrano y poliácridamida.

Si una muestra contiene un sustrato para la oxidorreductasa, la reacción redox entre el sustrato y la enzima puede comenzar una vez que la capa de reactivo y la muestra están en contacto. Los electrones producidos o consumidos a partir de esta reacción redox se pueden determinar aplicando un potencial eléctrico (es decir, tensión) entre el electrodo operativo y el electrodo opuesto, y midiendo la corriente. La corriente se puede correlacionar con la concentración del sustrato en la muestra, siempre que el sistema de tira electroquímica se haya calibrado con las muestras que contienen cantidades conocidas de sustrato. La unidad de medición preferiblemente contiene la circuitería y microprocesadores necesarios para proporcionar información útil de manera que la concentración del sustrato en la muestra, la concentración del sustrato en el cuerpo del paciente, o la concentración relevante de sustancia que se relaciona con el sustrato medido.

Los electrones producidos o consumidos por la reacción de oxidorreductasa con su sustrato se traducen en una corriente que se puede medir cuando se proporciona un circuito cerrado por el electrodo opuesto. La reacción que se produce en el electrodo opuesto es opuesta a la de la reacción que se produce en el electrodo operativo. De este modo, el electrodo opuesto suministra o acepta electrones a la muestra a través de la reacción de uno o más ingredientes de la capa de reactivo, dependiendo del tipo de reacción redox que se produce en el electrodo operativo. Por ejemplo, si la oxidación se produce en el electrodo operativo, la reducción se produce en el electrodo opuesto.

Puede ser deseable retrasar la medición de la corriente en el sistema hasta un tiempo dado después que se haya aplicado una tensión. Debido a la naturaleza cinética complicada la electroquímica dentro de la muestra, las reacciones redox puede no alcanzar un "estado estable" en el que las tasas de reacción se han estabilizado durante un período de entre una fracción de un segundo a varios minutos. Las mediciones antes o después de de este estado estable se haya logrado puede proporcionar mediciones erróneas de corriente, y de este modo de la concentración del analito. Preferiblemente, las mediciones de corriente comienzan aproximadamente 20 segundos después de la aplicación de la muestra.

Preferiblemente, la tensión inicialmente se aplica al sistema al mismo tiempo que, o inmediatamente después de, la deposición de la muestra. La aplicación inicial de tensión se mantiene durante 10 segundos y después se para, de manera que no se aplique tensión durante un tiempo de espera de 10 segundos. Después de este tiempo de espera la tensión se aplica de nuevo, y se controla la corriente, durante un tiempo de lectura de 10 segundos.

Para las tiras de sensor que contienen un tercer electrodo, la tensión aplicada se puede controlar por el tercer electrodo. Cualquier tendencia en el valor propuesto del potencial eléctrico proporciona retroalimentación a la circuitería a través del tercer electrodo, de manera que la tensión se puede ajustar de manera apropiada.

El uso de un tercer electrodo puede ser deseable para algunas aplicaciones. La precisión aumentada en la tensión aplicada puede proporcionar una mejor precisión en la medición del analito. Cuando se usa un tercer electrodo, también puede ser posible reducir el tamaño del electrodo opuesto o a aplicar una pequeña cantidad de la especie redox al electrodo opuesto. Si el tercer electrodo se posiciona aguas arriba del electrodo opuesto, como se ilustra en la Figura 13, después puede ser posible detectar cuando se ha aplicado una muestra insuficiente a la tira, una situación denominada "infrallena." La detección infrallena se puede detectar cuando existe suficiente muestra para completar el circuito entre el electrodo operativo y el tercer electrodo, pero no cubre el electrodo opuesto. La pérdida de corriente eléctrica en la célula se puede convertir electrónicamente en una señal para el usuario instruyendo al usuario para añadir muestra adicional a la tira.

Tiras de sensor electroquímico que contienen capas de reactivo optimizadas separadamente para los electrodos operativo y opuesto pueden proporcionar comportamiento mejorado con relación a las tiras de sensor convencionales. La especie del par redox sobre el electrodo opuesto, que experimenta una reacción de oxidación -

reducción de tipo opuesto con respecto al sustrato, debe estar presente en una mayor relación molar que la relación de 1:1 que se usa típicamente. Esta mayor relación molar de la especie redox no produce interferencia significativa con las reacciones de oxidación - reducción que se producen cerca del electrodo operativo durante el tiempo necesario para análisis. También, la alta concentración de la especie redox proporciona un ambiente electroquímico estable para el electrodo opuesto. Aunque especie redox se está consumiendo (es decir, convertida en su especie homóloga), mantiene la suficiente alta concentración de manera que existe una relación lineal relativamente constante lineal entre la corriente medida y la concentración de analito para la misma escala de análisis.

La gran relación molar de la especie soluble redox sobre el electrodo opuesto también puede incrementar la vida útil de la tira de sensor. Un pequeño grado de conversión espontánea de la especie soluble redox en su especie homóloga se puede producir durante el tiempo entre la fabricación de la tira y su uso con una muestra. Ya que la concentración relativa permanecerá alta, el sensor puede todavía producir resultados precisos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Preparación de Pares de Electrodo sobre una Base

Se formaron electrodos sobre una base de material aislante usando técnicas descritas en las Patentes de Estados Unidos números. 5.798.031 y 5.120.420. Con relación a la Figura 1, se depositó pasta de plata por serigrafía sobre una tira de policarbonato 10. Esta pasta se imprimió en un patrón 12 y 14 para formar los contactos eléctricos y la capa inferior de los electrodos. Con relación a la Figura 2, una tinta que contenía carbono conductor y un ligando se aplicó después se aplicó mediante serigrafía en un patrón 24 y 34 para formar la capa superior de cada electrodo. Con relación a la Figura 3, una capa dieléctrica que contiene un poliuretano modificado por acrilato se depositó sobre la base y las capas inferiores de los electrodos en un patrón 40 y después se curó por exposición a radiación UV.

Ejemplo 2 - Tira de sensor que tiene una única, especie soluble redox sobre el Electrodo opuesto

Se construyó una tira de sensor usando un par de electrodos sobre una base, preparada como se describe en el Ejemplo 1. Con relación a la Figura 2, uno de los electrodos se hizo el electrodo operativo depositando sobre el electrodo una mezcla acuosa 26 de la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) en combinación con 20 unidades por microlitro de coenzima PQQ, 24 mM de 3-fenilimino-3H-fenotiazina (PIPT), 8 mM ferrocianuro, y 1% de polímero CMC. Estos ingredientes estaban contenidos en un tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 7,4. El otro electrodo se hizo el electrodo opuesto depositando sobre el electrodo una mezcla acuosa 36 de ferricianuro 200 mM y NaCl 100 mM en un tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 7,4.

Con relación a la Figura 4, después que estas mezclas acuosas se dejaron secar, la base, la capa dieléctrica y electrodos recubiertos se unieron después a una tapa 50 formando la tira de sensor. La construcción de la tapa se realizó como se describe en la Patente de Estados Unidos nº. 5.798.031. Una solución de recubrimiento de una dispersión de poliuretano acuoso se dispersó sobre un lado de una tira de policarbonato y se dejó secar. La tira se formó en una tapa mediante estampación en relieve formando un área cóncava 52 y mediante perforación del agujero 54. La tapa se unió a la base mediante alineación y puesta en contacto de la tapa y la base, seguido de aplicación de calor al área de contacto a lo largo de la periferia de la estructura.

Con relación a la Figura 5, antes de cubrirse la tapa, se tomó una imagen de la estructura del electrodo mediante microscopía óptica. El electrodo operativo es el círculo de la izquierda, y el electrodo opuesto es el círculo de la derecha.

Ejemplo 3 - Tira de sensor que tiene dos especies de especie Of A Par redox Sobre el electrodo opuesto

Una tira de sensor se construyó como en el Ejemplo 2, excepto que la mezcla depositada para formar el electrodo opuesto contenía tanto ferricianuro (100 mM) como ferrocianuro (100 mM).

Ejemplo 4 – Estudios voltamétricos cíclicos de Tiras de sensor

Cada una de las tiras de sensor de los Ejemplos 2 - 3 se analizó mediante voltametría cíclica. Las tiras se volvieron a hidratar con un tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 7,4. Cada tira se unió a un analizador que contenía una fuente de tensión y un dispositivo de medición de corriente. La tensión se fijó a -0,6V, se aumentó hasta +0,6V, y se redujo de Nuevo hasta -0,6V a una velocidad de 0,025 V/seg, y se midió la corriente a lo largo del ciclo de tensión. Una representación gráfica de voltamogramas cíclicos, midiendo la corriente en función de la tensión aplicada, para cada tira de sensor se muestra en la Figura 6. Cada uno de los voltamogramas cíclicos muestra un máximo en la corriente positiva (máximo de oxidación) debido a la oxidación del mediador de PIPT. El máximo de oxidación se produce cerca de -0,2V para la tira del Ejemplo 2 y cerca de -0.15V para la tira del Ejemplo 3. Estos máximos de oxidación indican el potencial al que la tira particular se debe hacer funcionar para obtener la máxima respuesta de corriente.

Ejemplo 5 - Cuantificación de Glucosa usando Tiras de sensor

La corriente generada como una función de la concentración de glucosa en una muestra se estudió para las tiras de sensor de los Ejemplos 2 y 3. Las muestras que contienen cantidades predeterminadas de glucosa en un tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 7,4 se aplicaron de manera separada a tiras de sensor individuales hechas de acuerdo con el Ejemplo 2 o de acuerdo con el Ejemplo 3. Se aplicó un potencial de +0,4V al par de electrodos durante 10 segundos, seguido de 10 segundos de potencial no aplicado. El potencial de +0,4V se aplicó después de nuevo durante 10 segundos, y se midió la corriente durante este intervalo de 10 segundos. La Figura 7 es una representación gráfica de la corriente total durante el período de tiempo de medición en función de la concentración de glucosa para el Ejemplo 2 y Ejemplo 3.

Los sensores del Ejemplo 2 mostraron un incremento lineal en la corriente media para las concentraciones de glucosa entre cero y 400 miligramos por decilitro (mg/dl). Los sensores del Ejemplo 3 mostraron un incremento lineal en la corriente media para las concentraciones de glucosa entre cero y 200 mg/dl. El intervalo de respuesta lineal es de este modo dependiente de la cantidad de la especie oxidada del par redox, en este caso ferricianuro. La no linealidad de las respuestas de corriente se cree que se debe a una deficiencia en la especie oxidada del par redox en el electrodo opuesto, de manera que la reacción de oxidación en el electrodo operativo no se puede mantener para mayores concentraciones de glucosa. Los sensores del Ejemplo 3 muestran una respuesta lineal sobre un intervalo de concentración mucho más pequeño que los sensores del Ejemplo 2 ya que los sensores del Ejemplo 3 contienen como mucho la mitad de la especie oxidada del par redox.

Ejemplo 6 - Tira de sensor sin Ferrocianuro sobre el Electrodo operativo

Una tira de sensor se construyó como en el Ejemplo 2, excepto que la mezcla depositada para formar el electrodo operativo no contenía ferrocianuro.

Ejemplo 7 - Tira de sensor que tiene una cantidad reducida de la especie soluble redox sobre el Electrodo operativo

Una tira de sensor se construyó como en el Ejemplo 2, excepto que la mezcla depositada para formar el electrodo operativo contenía 4 mM de ferrocianuro.

Ejemplo 8 – Contribución del Mediador

Cada una de las tiras de sensor de los Ejemplos 2, 6 y 7 se analizó mediante voltametría cíclica. Las mezclas de análisis eran sangre entera con 40% de hematocrito que no contenía glucosa. Las tiras se volvieron a hidratar con muestras de sangre entera al 40%. Cada tira estaba unida a un analizador que contenía una fuente de tensión y un dispositivo de medición de corriente. La tensión se fijó a -0,8V, se aumentó hasta +0,6V, y se redujo de nuevo hasta -0,8V a una velocidad de 0,025 V/seg, y la corriente se midió a lo largo del ciclo de tensión. Una representación gráfica de los voltamogramas cíclicos, midiendo la corriente en función de la tensión aplicada, para cada tira de sensor se muestra en la Figura 8.

El voltamograma para el sensor del Ejemplo 6 (curva "a") mostró un claro máximo de oxidación para PIPT entre -0,4V and +0,4V. Un máximo local en la corriente alrededor de -0,3V también se mostró en los voltamogramas cíclicos de los sensores de los Ejemplos 2 (curva "c") y 7 (curva "b"); sin embargo, los máximos principales para sensores se produjeron entre 0V y +0,1V.

Todos estos potenciales son relativos a la mitad del potencial de la célula para la reducción de ferricianuro en el electrodo opuesto.

Los máximos de oxidación a potencial positivo se deben a la oxidación de ferrocianuro en el electrodo operativo. Ya que el sensor del Ejemplo 2 tenía dos veces la cantidad molar de ferrocianuro sobre el electrodo operativo con relación al sensor del Ejemplo 7, la corriente máxima debida al ferrocianuro en el voltamograma cíclico del Ejemplo 2 es aproximadamente dos veces la observada para el Ejemplo 7. El voltamograma cíclico del sensor del Ejemplo 6 no mostró evidencia de ferrocianuro oxidación. Ya que el sensor del Ejemplo 6 no contenía ferrocianuro sobre el electrodo operativo, estos resultados indican que no hay migración detectable de ferrocianuro desde el electrodo opuesto al electrodo operativo durante la escala de tiempo de análisis. Ferrocianuro se produce en el electrodo opuesto por la reducción del ferricianuro que se depositó originalmente sobre el electrodo opuesto. Además, estos resultados demuestran que un biosensor electroquímico de la presente invención puede funcionar con un mediador sobre el electrodo operativo y una especie de un par redox sobre el electrodo opuesto, donde el mediador no es otra especie del par redox sobre el electrodo opuesto.

Ejemplo 9 – Examen de Interferencia de la Especie redox del Electrodo opuesto

Voltamogramas cíclicos del sensor del Ejemplo 6 se realizaron usando muestras de sangre entera con 40% de hematocrito que tenían diversas concentraciones de glucosa. La tensión se fijó a -0,8V, se elevó hasta +0,6V, y se

redujo de nuevo hasta $-0,8V$ a una velocidad de $0,025 V/seg$, y la corriente se midió a lo largo del ciclo de tensión. Una representación gráfica de los voltamogramas cíclicos, midiendo la corriente en función de la tensión aplicada, se ilustra en la Figura 9. El potencial máximo medido para el máximo de oxidación a aproximadamente $-0,2V$ llegó a ser más positivo con concentraciones aumentadas de glucosa. Como se observa en el Ejemplo 8 para la voltametría cíclica realizada en la ausencia de glucosa, no existe migración detectable al electrodo operativo de ningún ferrocianuro producido en el electrodo opuesto.

Ejemplo 10 - Cuantificación de Glucosa en Sangre entera

La corriente generada en función de la concentración de glucosa en una muestra se estudió para la tira de sensor del Ejemplo 6. Muestras de sangre entera que tienen 40% de hematocrito se analizaron para la valoración de la concentración de glucosa usando un analizador de glucosa YSI como el procedimiento de referencia. Una vez que se determinaron las concentraciones de glucosa reales de las diversas muestras, las muestras se aplicaron de manera separada a las tiras de sensor individuales hechas de acuerdo con el Ejemplo 6. Un potencial de $+0,4V$ se aplicó al par de electrodos durante 10 segundos, seguido de 10 segundos de potencial no aplicado. El potencial de $+0,4V$ después se aplicó de Nuevo durante 10 segundos, y se midió la corriente durante este intervalo de 10 segundos. La Figura 10 es una representación gráfica de la corriente total durante el período de tiempo de medición en función de la concentración de glucosa por ejemplo 6. Los sensores de los Ejemplos 6 mostraron una respuesta lineal en la corriente en función de la concentración de glucosa en sangre desde cero a aproximadamente 600 mg/dl.

Ejemplo 11 - Preparación de Tiras de sensor que contienen tres Electrodos

Los electrodos se forman sobre una base de material aislante como se describe en el Ejemplo 1, excepto que también se aplica un tercer electrodo a la base. Con relación a la Figuras 12 - 14, se deposita pasta de plata mediante serigrafía en una tira de policarbonato 10. Esta pasta se imprime en un patrón 12, 13 y 14 para formar los contactos eléctricos y la capa inferior de los electrodos. Una tinta que contiene carbono conductivo y un ligando se aplica después mediante serigrafía en un patrón 24, 3 y 74 formando una capa superior de cada electrodo. Una capa dieléctrica que contiene un poliuretano modificado por acrilato se deposita sobre la base y las capas inferiores de los electrodos en un patrón para exponer los electrodos y después se curó por exposición a radiación UV.

Uno de los electrodos se hace el electrodo operativo depositando sobre el electrodo una mezcla acuosa 26 de la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) en combinación con 20 unidades por microlitro de coenzima PQQ, 24 mM de 3-fenilimino-3H-fenotiazina (PIPT), y 1% de polímero CMC. Estos ingredientes están contenidos en un tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 7,4.

Uno de los otros electrodos se hace el electrodo opuesto depositando sobre el electrodo una mezcla acuosa 36 de 200 mM de ferricianuro y 100 mM NaCl en un tampón fosfato 100 mM que tiene un pH de 7,4. El tercer electrodo se prepara cubriendo el electrodo remanente con una capa de reactivo 76. La deposición de la capa de reactivo 76 se puede hacer como una etapa separada con una tercera mezcla acuosa, o la capa de reactivo 76 se puede aplicar como una parte de la misma mezcla acuosa depositada para preparar el electrodo opuesto.

Después estas mezclas acuosas se secan, la base, capa dieléctrica y electrodos se unen después a la tapa formando una tira de sensor. Una solución de recubrimiento de una dispersión acuosa de poliuretano se dispersa sobre una tira de policarbonato y se deja secar. La tira se forma en una tapa mediante estampación en relieve formando un área cóncava y mediante perforación de un agujero. La tapa está unida a la base mediante alineación y puesta en contacto de la tapa y la base, seguido de aplicación de calor al área de contacto a lo largo de la periferia de la estructura.

Aunque la invención se ha descrito e ilustrado con referencia a sus realizaciones ilustrativas específicas, no se pretende que la invención se limite a esas realizaciones ilustrativas. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden realizar variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones que siguen. Por lo tanto se pretende incluir dentro de la invención todas las variaciones y modificaciones comprendidas en las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Una tira de sensor electroquímico, que comprende:

una base (10);

un primer electrodo (20) sobre la base (10);

5 una primera capa de reactivo (26) sobre el primer electrodo (20), comprendiendo la primera capa de reactivo (26) una oxidorreductasa capaz de facilitar una reacción redox de sustrato;

a segundo electrodo (30) sobre la base (10); y

10 una segunda capa de reactivo (36) sobre el segundo electrodo (30), comprendiendo la segunda capa de reactivo una primera especie soluble redox seleccionada entre el grupo que consiste en un complejo de metal de organotransición, complejo de coordinación de metal de transición, y sus mezclas, siendo la primera especie soluble redox capaz de experimentar una reacción redox opuesta a la del sustrato,

caracterizada porque

la primera capa de reactivo (26) además comprende una molécula orgánica electroactiva capaz de experimentar una reacción redox opuesta a la del sustrato, y **porque**

15 la segunda capa de reactivo (36) además comprende una segunda especie redox que es una especie de un par redox comprendiendo la primera especie soluble redox y la segunda especie redox, siendo la segunda especie soluble redox capaz de experimentar la reacción redox opuesta a la de la primera especie soluble redox, la relación molar de la primera especie soluble redox a la segunda especie redox es mayor que 1.2:1.

2. La tira de sensor electroquímico de la reivindicación 1, en la que la relación molar de la primera especie soluble redox a la segunda especie redox es mayor que 2:1.

20 3. La tira de sensor electroquímico de la reivindicación 1, en la que la segunda especie la relación molar de la primera especie soluble redox a la segunda especie redox es mayor que 10:1.

4. La tira de sensor electroquímico de la reivindicación 1, en la que la segunda especie redox está presente en una cantidad menor que 1 parte por mil.

25 5. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la primera especie soluble redox tiene un potencial de reducción estándar de al menos +0,24 voltios.

6. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la primera especie soluble redox tiene un potencial de reducción estándar de al menos +0,35 volts.

7. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la primera especie soluble redox comprende ferrocianuro o ferricianuro.

30 8. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la primera especie soluble redox comprende rutenio(II) hexamina o rutenio(III) hexamina.

9. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la oxidorreductasa comprende una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en una oxidasa y una deshidrogenasa, y en la que la primera especie soluble redox es una especie reducible.

35 10. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la oxidorreductasa comprende a reductasa y la primera especie soluble redox es una especie oxidable.

40 11. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la molécula orgánica electroactiva se selecciona entre el grupo que consiste en coenzima pirroloquinolina quinona (PQQ), benzoquinonas sustituidas, naftoquinones sustituidas, N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenencinas, fenotiazinas, indofenoles, indiaminas, sales de fenazinio, sales de fenoxazinio, 3-fenilimino-3H-fenotiazinas, 3-fenilimino-3H-fenoxacinas, y sus mezclas.

12. La tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un tercer electrodo (70) sobre la base (10) y una tercera capa de reactivo (76) sobre el tercer electrodo (70), comprendiendo la tercera capa de reactivo (76) una tercera especie soluble redox.

13. La tira de sensor electroquímico de la reivindicación 12, en la que la tercera especie soluble redox es sustancialmente idéntica a la primera especie soluble redox.
14. La tira de sensor electroquímico de la reivindicación 12 ó 13, en la que el potencial de funcionamiento del tercer electrodo (70) es adecuado para el potencial de funcionamiento entre el primer y segundo electrodos (20, 30).
- 5 15. Un procedimiento de preparación de la tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- depositar el primer electrodo (20) sobre la base (10);
- depositar el segundo electrodo (30) sobre la base (10);
- aplicar la primera capa de reactivo (26) sobre el primer electrodo (20); y
- 10 aplicar la segunda capa de reactivo (36) sobre el segundo electrodo (30).
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la deposición comprende serigrafiar un patrón de carbono conductivo.
17. Un procedimiento de cuantificación de un analito en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- poner en contacto la muestra con una tira de sensor electroquímico de una de las reivindicaciones 1 a 14;
- 15 aplicar un potencial eléctrico entre el primer y segundo electrodos (20, 30);
- medir una corriente que pasa a través del primer y segundo electrodos (20, 30) y la muestra; y
- correlacionar la corriente con una concentración del analito.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el analito es el sustrato para la oxidorreductasa.
19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el analito es un cofactor para la oxidorreductasa.

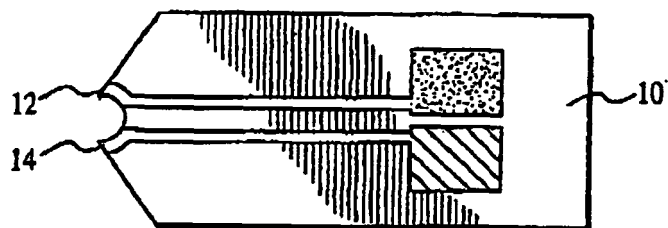


FIG. 1

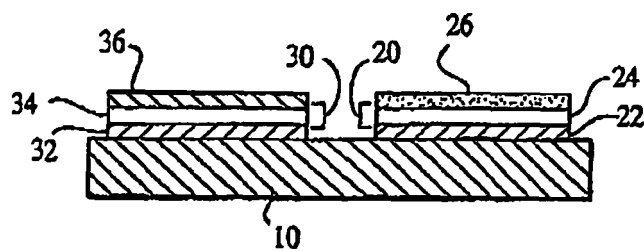


FIG. 2

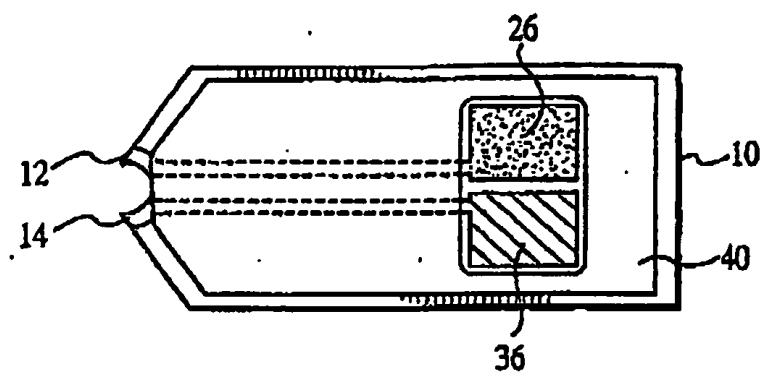


FIG. 3

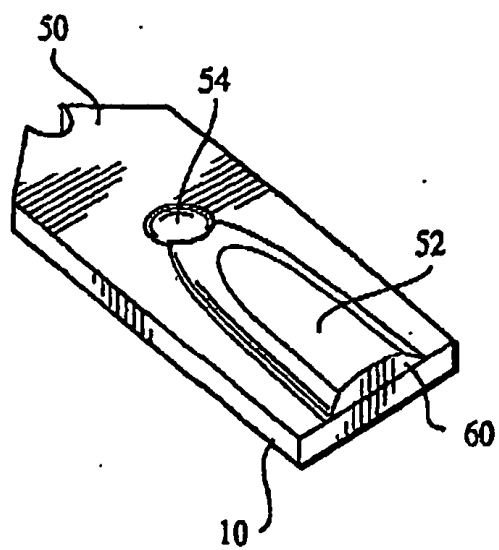


FIG. 4

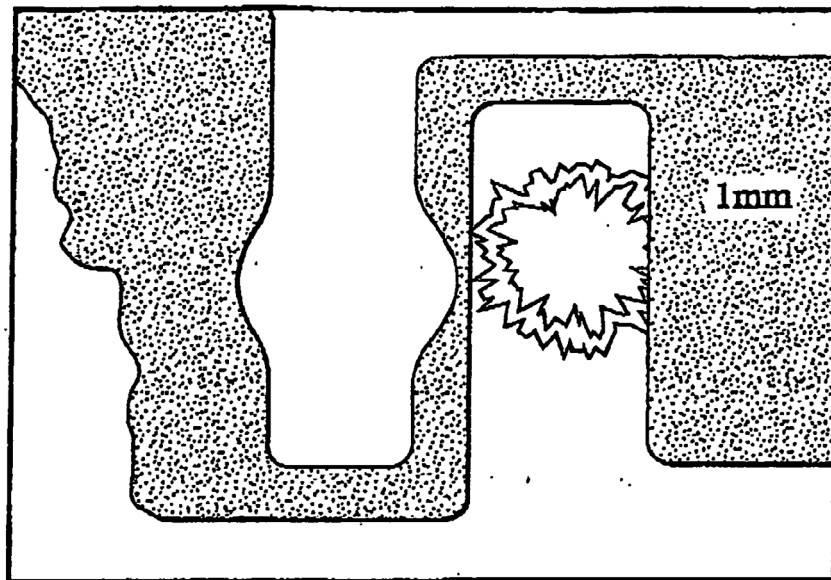


FIG. 5

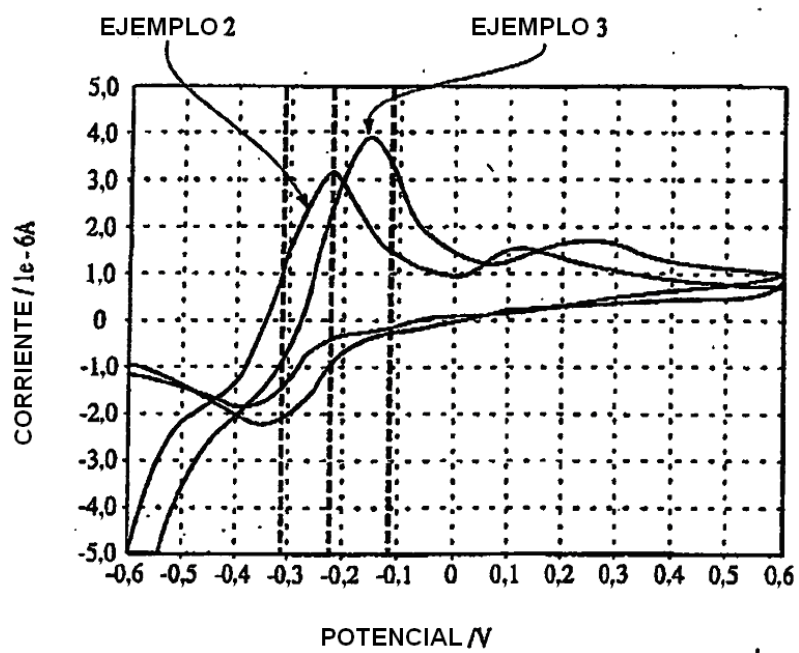


FIG. 6

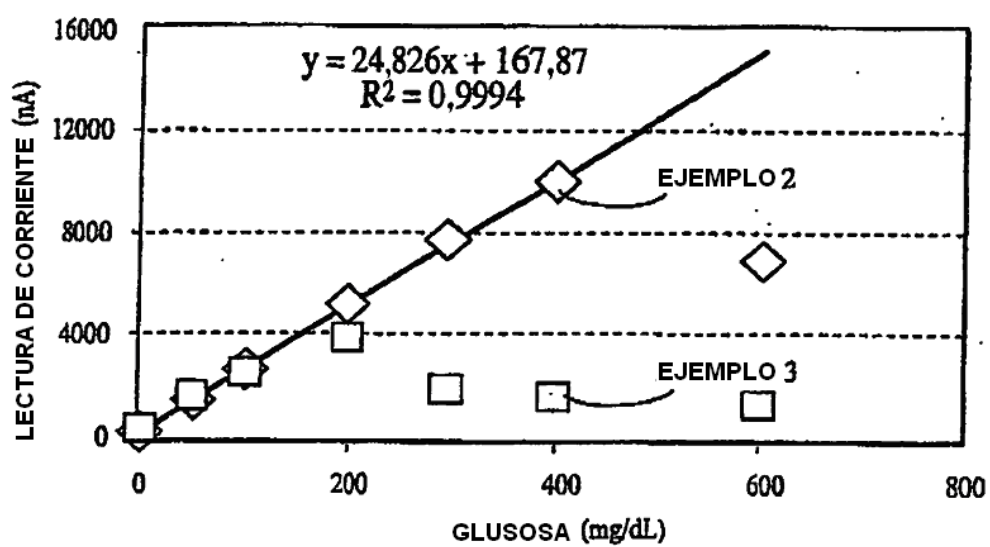


FIG. 7

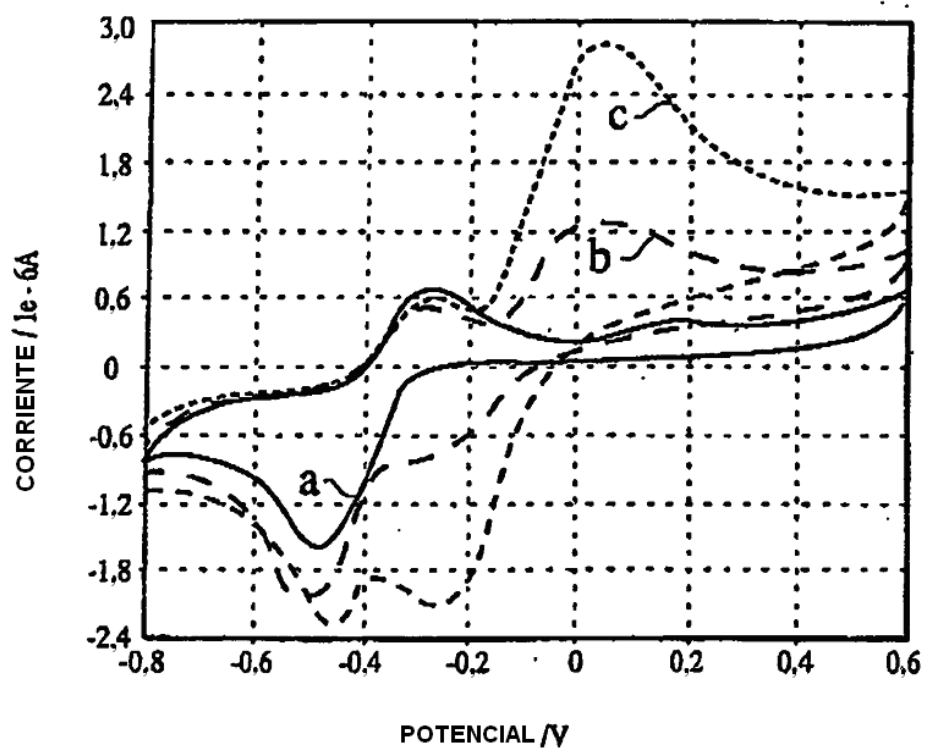


FIG. 8

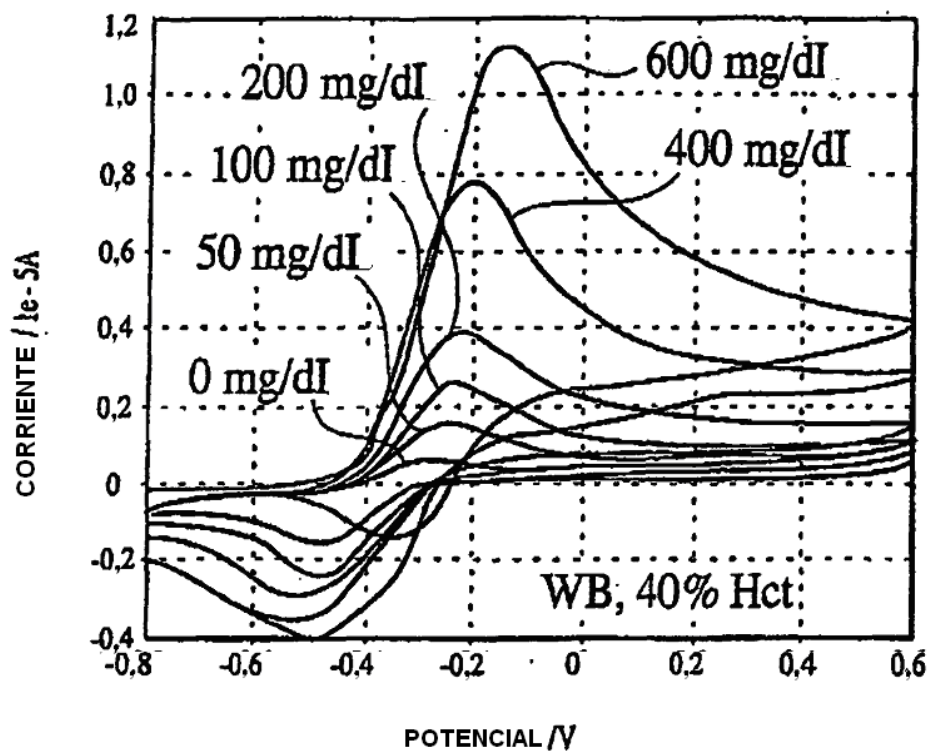


FIG. 9

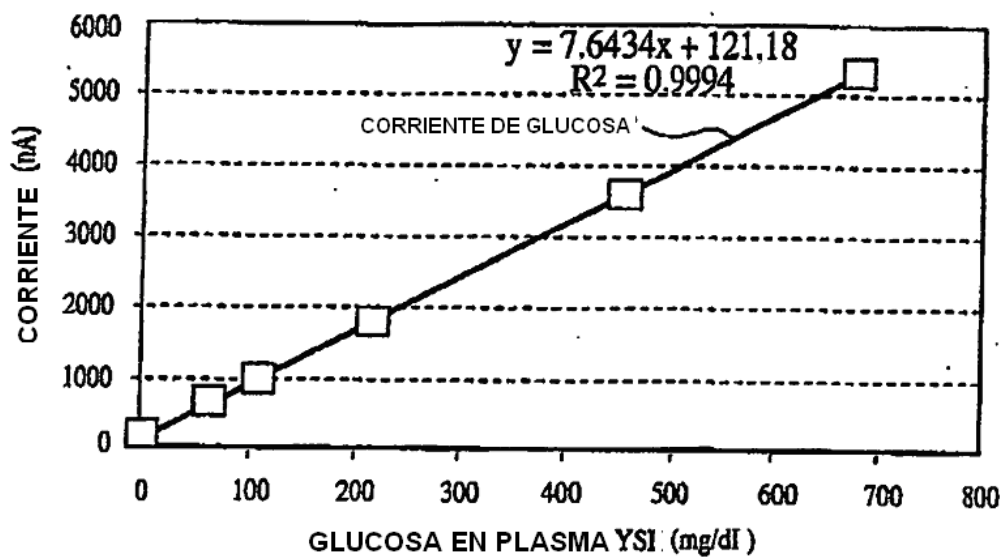


FIG. 10

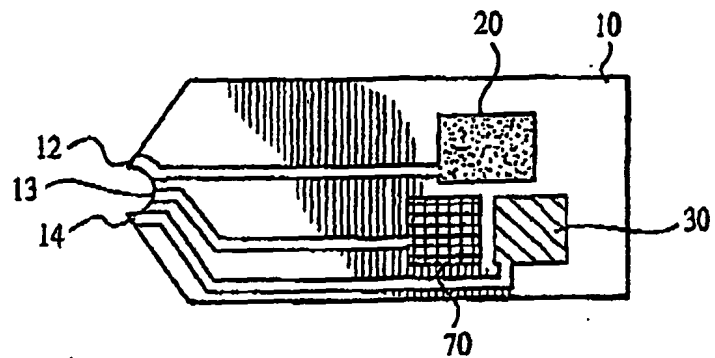


FIG. 11

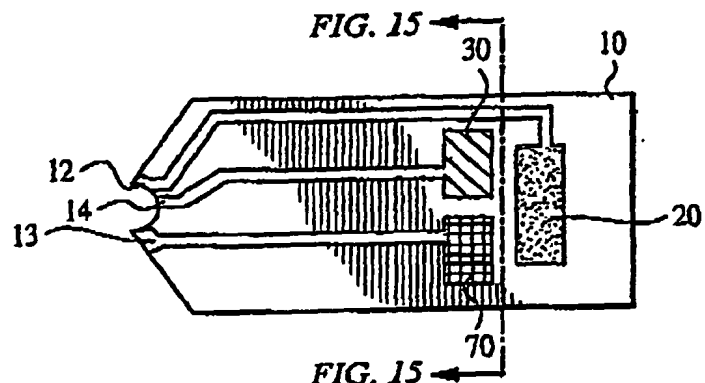


FIG. 12

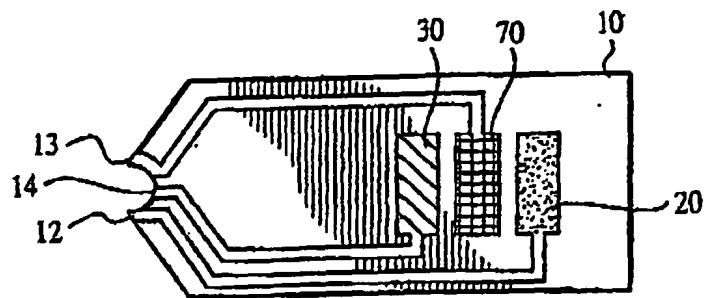


FIG. 13

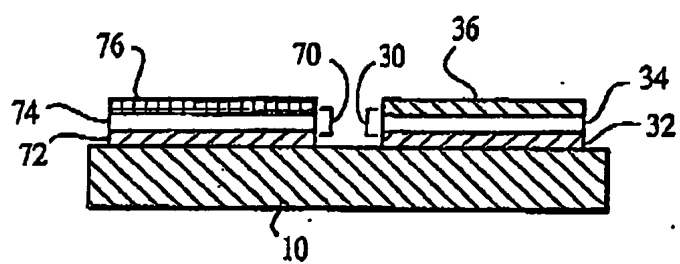


FIG. 14