

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 905**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/54 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05854033 .7**
96 Fecha de presentación: **12.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1885869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54 Título: **Composiciones autolimitantes en términos de dimensión y dispositivos de ensayo para medir analitos en fluidos biológicos**

30 Prioridad:
13.12.2004 US 635711 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2012

73 Titular/es:
**BAYER HEALTHCARE, LLC
555 WHITE PLAINS ROAD
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:
MARFURT, Karen L.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 905 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

Composiciones autolimitantes en términos de dimensión y dispositivos de ensayo para medir analitos en fluidos biológicos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a formulaciones utilizadas para determinar la cantidad de un analito en fluidos biológicos. En una aplicación importante, la invención se aplica a medir el contenido en glucosa de la sangre u otros fluidos.

Antecedentes de la invención

10 La determinación cuantitativa de analitos en fluidos biológicos, tales como sangre completa, es de gran importancia en el diagnóstico y el tratamiento de ciertos trastornos médicos, por ejemplo, la determinación del nivel de glucosa en la sangre de individuos diabéticos, que deben comprobar con frecuencia su nivel de glucosa en sangre para regular su dieta y su medicación. La medición del contenido en glucosa de la sangre puede realizarse mediante diversos procedimientos. Un procedimiento emplea un biodetector electroquímico que relaciona el contenido en glucosa con una corriente eléctrica medida. Otro procedimiento proporciona una indicación visual del contenido en glucosa, tal como revelando un color mediante la reacción con un indicador. Aunque la presente invención es particularmente útil en las mediciones ópticas, también tiene aplicación en biodetectores electroquímicos.

15 Existen muchas patentes que describen procedimientos que emplean indicadores que revelan un color u otras respuestas mensurables cuando son químicamente oxidados como última etapa de una serie de reacciones, por ejemplo, procedimientos que emplean enzimas, tales como analito oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa) o analito deshidrogenasas (por ejemplo, glucosa deshidrogenasa). Los procedimientos utilizados son similares, pero emplean enzimas, mediadores e indicadores diferentes.

20 Los procedimientos que emplean enzimas glucosa oxidasas se divulgan en muchas patentes de EEUU y solicitudes de patente. Como ejemplo se indican las patentes de EEUU 4.211.845; 4.808.529; 5.116.729; 5.264.348; 5.620.863; y 2003/0077702 A1. Estas patentes divulgan un procedimiento en el que la glucosa se oxida a ácido glucónico con la liberación de peróxido de hidrógeno. Se menciona que el peróxido de hidrógeno oxida un indicador en presencia de una peroxidasa para producir un color mensurable, indicando el contenido en glucosa de la muestra de sangre. Algunas patentes recientes sugieren un procedimiento en el que la glucosa primero se convierte en ácido glucónico y después en gluconolactona con la liberación de peróxido de hidrógeno. También se ha sugerido que primero se forma la gluconolactona y después se hidroliza al ácido glucónico. Independientemente de cuál es el esquema de procedimiento correcto, las enzimas glucosa oxidasas se han utilizado ampliamente en tiras secas y en otras técnicas para medir el contenido en glucosa de la sangre.

25 Se han empleado diversos indicadores en detectores de glucosa, tales como indicadores de tipo benzidina y azinas heterocíclicas, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y siringaldazina, luminol, o-tolidina, o-dianisitina, entre otros. Otra familia de indicadores son los precursores de tintes de tetrazolio. Los ejemplos de patentes que describen dichos indicadores incluyen las patentes de EEUU 5.126.275, 5.322.680, 5.300.637, 5.290.536, 5.360.595 y 6.586.199. Se emplean indicadores de tetrazolio en una realización preferida de la invención que se describirá a continuación.

30 De particular interés con respecto a la presente invención es el procedimiento descrito en la patente de EEUU 6.200.773 y en su patente principal, la patente de EEUU 5.902.731. En estas patentes, un ensayo del contenido en glucosa emplea la glucosa deshidrogenasa, como cofactor de NAD o PQQ o sus derivados, un precursor de tinte de tetrazolio, una enzima diaforasa o un análogo, y una sal nitrito. La figura 5 de la patente de EEUU 6.200.773 es un diagrama del procedimiento mediante el cual se detecta la glucosa mediante el revelado de un color a partir de la reducción del precursor del tinte de tetrazolio a formazano.

35 Una patente anterior relacionada con el uso de enzimas para determinar la cantidad de glucosa en sangre es la patente de EEUU 3.630.957. La glucosa oxidasa y peroxidasa se distribuyen de manera uniforme en una película polimérica resistente al agua para que reaccionen con la glucosa y produzcan un color. La película puede tener un sustrato soporte, por ejemplo una película polimérica. Se sugiere que pueden añadirse cargas, que incluyen creta, dióxido de titanio, ácido silícico coloidal (utilizado en los ejemplos) y similares, y que pueden incluirse pigmentos para que las películas sean opacas. Se aplica sangre a la película que contiene el reactivo y después se limpia antes de leer el color revelado. El uso de cargas opacas para reducir la interferencia con las mediciones de glucosa por los eritrocitos también se analiza en la patente de EEUU 5.968.765.

40 Otra patente de interés es la patente de EEUU 4.312.834, que describe el uso de una película resistente al agua que incluye partículas insolubles finas, que proporcionan acceso al reactivo y al mismo tiempo bloquean el acceso de componentes más grandes. La película puede tener un soporte en forma de portadores, tales como películas,

láminas, etc. Los titulares de la patente estaban preocupados por el acceso de ciertas moléculas, e indican que la cantidad de partículas finas (denominadas "abridoras de película") debe estar dentro de ciertos límites. Se sugieren diversos tipos de partículas, tales como gel de diatomita, gel de sílice, yeso, y similares. Se sugiere el dióxido de titanio, como abridor de película y como una manera de mejorar las propiedades de remisión de la película. En general, en los ejemplos se depositan películas relativamente espesas de 200-400 μm sobre películas de sustrato; en algunos casos se aplican múltiples capas. Al igual que en la patente de EEUU 3.630.957, el exceso de muestra, por ejemplo sangre, se limpia después de que se haya producido la reacción.

Se han descrito tiras de ensayo en muchas patentes, puesto que se emplean mucho para la detección de analitos en muestras biológicas. Cada aplicación de tira de ensayo tiene sus propios problemas exclusivos que debe solucionar si se quieren obtener unos resultados precisos y constantes. El ensayo de sangre completa requiere que los eritrocitos no interfieran con el color que se revela para indicar la presencia de glucosa, o con las mediciones electroquímicas. En algunos casos se incluyen componentes específicos en las tiras de ensayo de modo que los eritrocitos se filtran de la muestra. En otros casos la muestra se limpia después de que haya pasado un periodo de tiempo para que pueda medirse el color revelado. Otro problema que existe cuando se ensaya sangre completa está relacionado con la concentración de eritrocitos en la muestra. Habitualmente se miden por su volumen en la muestra y esto se denomina valor de hematocrito. Puesto que el hematocrito puede variar del 20% al 60% en muestras sanguíneas, las mediciones de glucosa pueden verse afectadas. Además, el movimiento del plasma sanguíneo que porta la glucosa hacia los reactivos para que se revele el color (o una respuesta electroquímica) puede retrasarse o ser incompleto.

Evitar que los eritrocitos alcancen a los reactivos que reaccionan con la glucosa es un problema para muchos expertos en la técnica. En la tira de ensayo de la patente de EEUU 5.968.765 mencionada anteriormente, a una membrana porosa con un espesor de 50,8 a 5080 μm se le añade un agente para separar los eritrocitos de la sangre completa, que incluye poli(ácido acrílico), entre otros, como agente indicador, y una carga opaca, por ejemplo dióxido de titanio, talco, etc. La disolución de revestimiento se deposita sobre la superficie de la membrana porosa o se embebe dentro de la membrana.

En la patente de EEUU 5.306.623, se selecciona un revestimiento capaz de separar la sangre completa de un grupo de polímeros que incluyen poli(ácido vinilsulfónico), polietilenglicol, poliestireno-ácido sulfónico, hidroxipropilcelulosa, polipropilenglicol, polivinilpirrolidona, y poli(ácido acrílico). El revestimiento separador se deposita sobre una matriz porosa junto con reactivos para ensayar la sangre.

La sensibilidad de las tiras de ensayo de sangre frente al hematocrito de la sangre completa se analiza en la patente de EEUU 5.789.255. El inventor descubrió que la adición de un polímero de ácido acrílico al 0,1-2% en p/v de alto peso molecular (>750.000) reduce el efecto de la variación del hematocrito sobre las mediciones de glucosa.

La solicitud internacional WO 00/42422 A1 describe una formulación reactiva para medir la cantidad de glucosa en un fluido biológico, que comprende glucosa oxidasa como sistema enzimático, una matriz polimérica hinchable y soluble en agua, fabricada de poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona-acetato de vinilo y hidroxietilcelulosa, y partículas de sílice insolubles en agua. El detector descrito en esta solicitud proporciona un tiempo de respuesta rápido y es insensible al valor de hematocrito.

La tira de ensayo ideal para medir la glucosa en muestras de sangre completa sería insensible al valor de hematocrito en la muestra de sangre y proporcionaría unos resultados rápidos, precisos y constantes. Un tiempo de respuesta rápido combinado con un criterio de valoración estable proporcionaría un ensayo que sería significativamente menos dependiente del tiempo y, por tanto, más conveniente en las manos del usuario. En otro aspecto importante para el usuario, la tira de ensayo debería ser insensible al volumen de sangre aplicada. La tira de ensayo que se describirá con más detalle a continuación se aproxima mucho a esta actuación ideal.

Sumario de la invención

La invención se refiere, en general, a formulaciones reactivas autolimitantes en términos de dimensión utilizadas en procedimientos ópticos o electroquímicos para medir analitos en fluidos biológicos y tiras de ensayo que contienen la formulación reactiva. Aunque la glucosa es un analito de particular interés, se considera que otros analitos en otros fluidos biológicos están dentro del alcance de la presente invención.

La formulación de la invención en general incluye una matriz polimérica hinchable y soluble en agua que contiene partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm , preferiblemente de 1 a 10 μm , y un sistema enzimático para que reaccione con el analito. La proporción en peso de las partículas insolubles en agua a la matriz polimérica hinchable y soluble en agua es de 1/2 a 2/1. Además, la formulación se caracteriza por un espesor de 6 a 16 μm .

En una realización preferida, la formulación reactiva de la invención incluye como reactivos un sistema enzimático

para que reaccione con la glucosa y un indicador. El sistema enzimático incluye glucosa deshidrogenasa y un cofactor para la enzima, por ejemplo NAD, un indicador de sal de tetrazolio, y la enzima diaforasa como un mediador en una realización particularmente preferida. Los reactivos se combinan con una matriz polimérica hinchable y soluble en agua que contiene pequeñas partículas insolubles en agua, preferiblemente dióxido de titanio y carbonato de calcio. La matriz polimérica preferiblemente se elige de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfúrico, látices poliacrílicos, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros. La proporción en peso de las partículas a la matriz polimérica preferiblemente es de 1/2 a 2/1. En la fabricación de una tira de ensayo, la formulación de la invención se moldea como una membrana con un espesor de 6 a 16 μm , preferiblemente de 7 a 10 μm , sobre un sustrato no poroso. La membrana se cubre con una capa adhesiva que incluye un pasillo capilar y una cubierta protectora para completar la tira de ensayo. La cubierta puede ser transparente u opaca.

En otro aspecto, la invención es un procedimiento de ensayo mediante procedimientos ópticos o electroquímicos para un analito en un fluido biológico, por ejemplo glucosa en sangre completa, que proporciona una respuesta estable y rápida, y que es insensible a la cantidad de muestra. El procedimiento de la invención emplea una tira de ensayo en la que una membrana fina se moldea sobre un sustrato no poroso, incluyendo la membrana partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm , preferiblemente 1-10 μm , en una matriz polimérica hinchable y soluble en agua. La membrana fina preferiblemente tiene un espesor de 6 a 16 μm , más preferiblemente de 7 a 10 μm , y la proporción en peso de partículas reflectoras a la matriz polimérica es preferiblemente de 1/2 a 2/1.

20 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1a, 1b son gráficas de los resultados del ejemplo 1.

Las figuras 2a, 2b son gráficas de los resultados del ejemplo 2.

Las figuras 3a, 3b son gráficas de los resultados del ejemplo 3.

Las figuras 4a, 4b son gráficas de los resultados del ejemplo 4.

25 **Descripción de las realizaciones preferidas**

La invención se refiere en general a formulaciones para medir analitos en fluidos biológicos que incluyen, pero no se limitan a glucosa, lactato, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, bilirrubina, ascorbato, peróxido de hidrógeno, y ácido úrico. Una aplicación importante de la invención es la medición del contenido en glucosa de sangre completa, que se describe con más detalle a continuación. Será evidente para los expertos en la técnica que en las formulaciones se pueden utilizar otros reactivos en lugar de los que se utiliza para medir la glucosa.

Medición de glucosa en sangre

Procedimientos ópticos

Puede determinarse la glucosa en sangre mediante sistemas de reactivos que emplean enzimas para oxidar la glucosa que incluyen, sin limitación hexolinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

En los procedimientos que emplean glucosa oxidasa, estas enzimas reaccionan con la glucosa, produciendo glucosa oxidada y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno oxida un compuesto indicador en presencia de una peroxidasa. El indicador oxidado produce un color que se correlaciona con el contenido en glucosa de la muestra de sangre.

40 En otras realizaciones de la presente invención se utiliza una glucosa deshidrogenasa, junto con un cofactor, tal como NAD, FAD o PQQ, un mediador, por ejemplo diaforasa, y un indicador, tal como un precursor de tinte de tetrazolio, para producir una respuesta visible proporcional al contenido en glucosa de la muestra. Estas reacciones normalmente se describen mediante la siguiente secuencia de reacciones:



Según esta secuencia de reacciones, la glucosa se convierte en gluconolactona mientras se reduce la deshidrogenasa-cofactor y después se vuelve a ser oxidada por un mediador para una posterior reacción con la glucosa disponible.

Deshidrogenasas

Una deshidrogenasa específica para la reacción con glucosa se denomina una glucosa deshidrogenasa. Están disponibles en el mercado en Toyobo, Kyowa, Amano, Genzyme, Biozyme y otros, y son enzimas nativas o enzimas recombinantes producidas mediante los procedimientos de fermentación y/o recombinación clásicos. Para que sean eficaces, dichas deshidrogenasas requieren un cofactor, tal como NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y sus derivados, FAD (flavina adenina dinucleótido) y sus derivados, y PQQ (pirroloquinolina quinona) y sus derivados.

Mediadores

Generalmente se emplea un mediador para reoxidar la deshidrogenasa-cofactor reducida después de la reacción con glucosa para formar la correspondiente lactona. Los ejemplos de mediadores (denominados extractor de hidruro en la patente de EEUU 6.200.773) incluyen diaforasa, PMS (metosulfato de fenazina), PES (etosulfato de fenazina), DCIP (2,6-diclorofenolindofenol), y ferroceno. Un mediador utilizado habitualmente en detectores electroquímicos es el ferricianuro.

Indicadores de tetrazolio

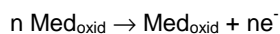
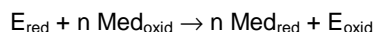
Los indicadores de tetrazolio son descritos en general en la patente de EEUU 5.360.595 y otras mencionadas anteriormente. En la patente de EEUU 6.200.773 se listan ciertos precursores de tintes de tetrazolio como particularmente útiles en reacciones con combinaciones de deshidrogenasa-cofactor. Entre estos está el compuesto de tetrazolio denominado WST-4, utilizado en los siguientes ejemplos.

Sustrato de soporte

La capa reactiva de la invención generalmente se coloca sobre un sustrato de soporte sustancialmente no poroso, generalmente un asa o tira polimérica, tal como un poliéster, un policarbonato o similares. Estas tiras tendrán unas dimensiones adecuadas para su uso con el instrumento utilizado para leer el color revelado. Por ejemplo, las tiras descritas en los ejemplos serán de aproximadamente 1,5 por 4,1 mm, y tendrán un espesor de aproximadamente 51 μm . Aunque no es crítico para la invención, los sustratos preferiblemente serán ópticamente transparentes y pueden contener uno o más revestimientos aplicados durante su fabricación para ayudar a la adhesión a otras superficies, tales como la capa que porta el reactivo.

Procedimientos electroquímicos

En los detectores electroquímicos se aplica un potencial a electrodos en contacto con una muestra de sangre (u otra) para producir una corriente eléctrica que se mide y se correlaciona con la cantidad del analito (por ejemplo, glucosa) en la muestra. Los electrodos están en contacto con una capa sólida que contiene reactivos enzimáticos que oxidan el analito en la muestra, y mediadores que reoxidan la enzima reducida. Los reactivos pueden describirse mediante las siguientes etapas:



en las que E_{oxid} y E_{red} son las formas oxidada y reducida del centro redox de la enzima, y Med_{oxid} y Med_{red} son las formas oxidada y reducida del mediador.

En general, la formulación reactiva utilizada en los detectores electroquímicos será similar a la utilizada en los procedimientos ópticos, excepto que no se requieren indicadores.

Formulaciones reactivas en capa

La capa reactiva de la invención es una única capa muy fina que reacciona con la glucosa en una muestra de sangre y produce una respuesta rápida y uniforme. La capa reactiva puede caracterizarse como autolimitante en términos de dimensión porque bloquea el movimiento de partículas grandes, tales como eritrocitos, y permite el movimiento de los componentes deseados. En general puede describirse como una matriz polimérica hinchable y soluble en agua que contiene partículas insolubles en agua, y una enzima para la reacción con la glucosa, tal como una glucosa deshidrogenasa y su cofactor, un mediador y un indicador cuando se emplea una detección óptica. Otros componentes pueden incluir detergentes, tensioactivos y similares.

Los polímeros pueden incluir poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfónico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros. En general, dichos polímeros se caracterizan porque tienen un peso molecular relativamente bajo, por ejemplo de 100 a 100.00 daltons, e incluyen oligómeros de

bajo peso molecular. Estos polímeros tendrán una alta solubilidad en disoluciones acuosas y en general tendrán una baja viscosidad. Generalmente se disolverán en una disolución tamponada para mantener un pH deseado, por ejemplo aproximadamente 7,5. Los polímeros se hinchan con rapidez cuando se rehidratan en disoluciones con pH neutro, tales como sangre completa. Se cree que estos polímeros proporcionan el acceso rápido del analito (por ejemplo, glucosa) a los reactivos.

Las partículas pueden incluir dióxido de titanio, carbonato de calcio, arcilla de bentonita, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, látex y similares. Las partículas adecuadas son fundamentalmente insolubles en agua y tienen un tamaño nominal de aproximadamente 0,05 a 20 μm , pero preferiblemente están en el intervalo de 1 a 10 μm . Las partículas no deben tener poros que permitan la migración indeseable de reactivos o de componentes de la muestra.

Los detergentes y los tensioactivos pueden incluir materiales patentados, tales como Silwet L-7600 (polidimetilsiloxanmetiletoxilato), Gerepon T-77, (N-oleil-N-metiltaurato de sodio), y Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato), entre otros.

Otros aditivos que pueden incluirse son emulgentes, agentes humectantes, espesantes, pigmentos y aditivos similares.

Después de aplicar y secar el revestimiento, la proporción en peso de las partículas reflectoras a la matriz polimérica generalmente es entre aproximadamente 1/2 a 2/1. Según se aplica, el revestimiento puede tener un espesor de 6 a 16 μm , preferiblemente de aproximadamente 7 a 10 μm . Estos revestimientos son mucho más delgados de los que se utilizan habitualmente en la técnica. Fue sorprendente descubrir que dichas capas finas pueden proporcionar una respuesta rápida y estable, tal como se ilustrará en los siguientes ejemplos.

Preparación de una tira de ensayo para procedimientos ópticos

La capa reactiva se prepara mezclando los componentes descritos anteriormente en un revestimiento acuoso uniforme, que se aplica a un sustrato utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como fotograbado o revestimiento de varilla de Mayer, y se seca. Pueden utilizarse otros procedimientos de revestimiento, puesto que el procedimiento de aplicar el revestimiento no se considera fundamental para el éxito.

Después de aplicar el revestimiento al sustrato se cubrirá con una cubierta protectora, preferiblemente un poliéster con revestimiento hidrófilo, que puede ser transparente u opaca. También puede añadirse otra capa opaca. Entre la capa reactiva y la cubierta protectora se coloca una capa adhesiva que une las otras dos capas y también forma un pasillo capilar para introducir muestras de sangre. Tal como se observará en los ejemplos, las tiras de ensayo de la invención no son sensibles a las dimensiones del capilar, es decir, las tiras de ensayo no requieren la aplicación de una cantidad fijada de sangre (u otro fluido biológico).

En cada una de las siguientes muestras, los componentes listados se combinan mezclando polímeros, tampones, partículas y adyuvantes en agua destilada, primero con bajo cizallamiento y luego con alto cizallamiento, durante un periodo de tiempo hasta se mezclan de modo uniforme para fabricar el material de base. Después los reactivos de diagnóstico se mezclan con el material de base, y los componentes mezclados se aplican a tiras de un material de soporte de policarbonato o de poliéster sustancialmente no poroso, en forma de un revestimiento de 10 μm de espesor. Se añade una capa adhesiva-espaciadora de 3M F9460, con un espesor de 50 u 80 μm . Por último, se aplica una cubierta protectora de un poliéster con revestimiento hidrófilo (3M 9971) mediante el uso de un adhesivo de transferencia. Se aplica un trozo de material opaco a la parte externa de la cubierta de poliéster para proporcionar una pequeña cantidad de opacidad añadida.

Detectores electroquímicos

La capa reactiva, sin el indicador óptico, se aplicará a electrodos para producir un detector electroquímico, tal como los divulgados, por ejemplo, en la solicitud publicada de EEUU 2001/0042683.

Ejemplo 1

Se prepara una capa reactiva mezclando los componentes listados en la tabla A, aplicándolos a un sustrato, y completando la tira de ensayo como se describió anteriormente. La actuación de las tiras de ensayo se midió añadiendo a la capa reactiva una pequeña muestra de sangre completa (aproximadamente 600 nl) que contiene una cantidad conocida de glucosa, colocando la tira en un área de lectura pequeña (por ejemplo, con un diámetro de 0,75 mm) de un instrumento de medición de la reflectancia difusa, y leyendo el color revelado a lo largo de un periodo de aproximadamente 60 segundos. Los resultados se indican como K/S, la función de Kubelka-Munk $(1-R)^2/2R$, en la que R es la reflectancia medida. Tal como se observa en la figura 1a, la intensidad de color medida permanece constante a lo largo del periodo para cada una de las concentraciones de glucosa ensayadas. La respuesta del medidor de glucosa se representó gráficamente frente al contenido en glucosa, tal como se muestra

en la figura 1b. Es evidente que el tiempo de respuesta es rápido y que los resultados para 12 segundos y 52 segundos son muy similares. Por tanto, se puede concluir que las tiras de ensayo de la invención proporcionan una respuesta rápida y no son indebidamente sensibles al momento de la lectura.

Tabla A

Componente	Concentración
Fosfato de potasio, pH 7,5	120 mM
Arcilla de bentonita ⁽¹⁾	al 0,78%
Dióxido de titanio ⁽²⁾	TiO ₂ al 5%
Sal de sodio del poli(ácido acrílico) (60 k) ⁽³⁾	al 1,0%
Gerepon T-77 ⁽⁴⁾	al 0,45%
Silwet L-7600 ⁽⁵⁾	al 0,10%
PEG 8000 ⁽⁶⁾	al 2,0%
Sal de tetrazolio de WST-4 ⁽⁷⁾	40 mM
NAD ⁽⁸⁾	10 mM
Diaforasa ⁽⁹⁾	1900 μ/ml
Glucosa deshidrogenasa ⁽¹⁰⁾	1100 μ/ml
(1) Rheox, Bentone EW (2) Sigma-Aldrich, T-8141 (3) Polysciences, Inc., 18611 (4) Pragmatics, Inc. (5) OSi Specialties (6) Pragmatics, Inc. (7) Dojindo Laboratories (8) Calbiochem (9) Unitika, diaforasa I (10) Amano Enzyme Inc., Amano 2	

5

Ejemplo 2

Se preparó otra capa reactiva mezclando los componentes listados en la tabla B, aplicándolos a un sustrato, y completando la tira de ensayo como se describió anteriormente. Se realizó una serie de ensayos como en el ejemplo 1 con muestras de sangre completa que contenían cantidades conocidas de glucosa. Los resultados de los ensayos se muestran en las figuras 2a-b. Se observará que el color revelado es sustancialmente constante a lo largo de un periodo de tiempo de 60 segundos, excepto que se reveló algo más de color a concentraciones mayores.

10

Tabla B

Componente	Concentración
Fosfato de potasio, pH 7,5	120 mM
Arcilla de bentonita ⁽¹⁾	al 0,78%
Dióxido de titanio ⁽²⁾	TiO ₂ al 5,3%
PSSA (70 k) ⁽³⁾	al 1,8%
Látex acrílico ⁽⁴⁾	al 3,6%

Zwittergent 3-12 ⁽⁵⁾	al 0,2%
Sal de tetrazolio de WST-4 ⁽⁶⁾	40 mM
NAD ⁽⁷⁾	10 mM
Diaforasa ⁽⁸⁾	1900 µ/ml
Glucosa deshidrogenasa ⁽⁹⁾	1100 µ/ml
(1) Rheox, Bentone EW (2) Sigma-Aldrich, T-8141 (3) Polysciences, Inc. (4) Dow, UCAR Latex 455 (5) Calbiochem (6) Dojindo Laboratories (7) Sigma-Aldrich (8) Unitika, diaforasa I (9) Amano Enzyme Inc., Amano 2	

Ejemplo 3

5 Se preparó una capa reactiva mezclando los componentes listados en la tabla C, aplicándolos a un sustrato, y completando la tira de ensayo como se describió anteriormente. La capa reactiva se ensayó como en el ejemplo 1 y 2. Los resultados se muestran en la figura 3a,b,c. Las figuras 3a y 3b muestran resultados similares a los de los ejemplos 1 y 2. El revelado de color adicional a concentraciones mayores de glucosa que se advierte en las figuras 2a y b no aparece en este ejemplo.

10 En la figura 3c se muestran otros resultados. Se midieron muestras de sangre completa que tienen tres hematocritos diferenciados (20%, 40%, 60%) y los resultados se representaron gráficamente. Es evidente que la tira de ensayo de la invención no se ve afectada significativamente por la concentración de eritrocitos en la sangre.

Tabla C

Componente	Concentración
HEPES, semisal de sodio ⁽¹⁾	0,3 m
Arcilla de bentonita ⁽²⁾	al 1,44%
Dióxido de titanio ⁽³⁾	TiO ₂ al 8%
Sal de sodio del poli(ácido acrílico) (60 k) ⁽⁴⁾	al 3,85%
PEG 8000 ⁽⁵⁾	al 2,0%
Rhodasurf-ON870 ⁽⁶⁾	al 1,0%
Gerepon T-77 ⁽⁷⁾	al 0,6%
Silwet L-7600 ⁽⁸⁾	al 0,08%
Sal de tetrazolio de WST-4 ⁽⁹⁾	60 mM
NAD ⁽¹⁰⁾	10 mM
Diaforasa ⁽¹¹⁾	1085 µ/ml
Glucosa deshidrogenasa ⁽¹²⁾	2680 µ/ml
(1) Research Organics (2) Rheox, Bentone EW (3) Sigma-Aldrich, T-8141 (4) Polysciences, Inc. (5) Pragmatics, Inc.	

- (6) Pragmatics, Inc.
 (7) Pragmatics, Inc.
 (8) OSi Specialties
 (9) Dojindo Laboratories
 (10) Sigma-Aldrich, nº N-6522
 (11) Unitika, diaforasa I
 (12) Toyobo Co., Ltd., nº GLD311

Ejemplo 4

5 Se preparó una capa reactiva mezclando los componentes listados en la tabla D, aplicándolos a un sustrato, y completando la tira de ensayo como se describió anteriormente. La tira de ensayo resultante se ensayó como en el ejemplo previo. Los resultados se muestran en la figura 4a,b,c. La constancia del revelado del color medido es aún mayor que la que se obtiene en los ejemplos previos. Es decir, se puede concluir que el revelado del color se completa sustancialmente en los primeros segundos.

10 La figura 4c muestra otra ventaja de las tiras de ensayo de la invención. Se compararon dos tiras de ensayo. La primera tenía una separación capilar de 50 µm a través del cual entra la muestra de sangre, mientras que el segundo tipo tenía una separación capilar de 80 µm. La figura 4c muestra que esta diferencia en la altura de la separación capilar y el cambio resultante en el volumen de la muestra no tiene un efecto significativo sobre los resultados. La razón de este resultado no está clara, pero puede ser debida a que la glucosa sea incapaz de difundirse desde la muestra de sangre hacia la capa reactiva después de que haya sido inicialmente rehidratada por la muestra de sangre. En cualquier caso, esto representa una ventaja significativa de las tiras de ensayo de la invención, puesto que significa que no son sensibles a la cantidad de sangre aplicada.

Tabla D

Componente	Concentración
Fosfato de potasio, pH 7,5	0,25 mm
Poli(ácido acrílico) (60 k) ⁽¹⁾	al 6%
Poli(alcohol vinílico) (6 k) ⁽²⁾	al 6%
TiO ₂ ⁽³⁾	al 15%
CaCO ₃ ⁽⁴⁾	al 10%
Gerepon T-77 ⁽⁵⁾	al 0,6%
Surfonyl DF37 ⁽⁶⁾	al 0,5%
Silwet L-7600 ⁽⁷⁾	al 0,1%
Sal de tetrazolio de WST-4 ⁽⁸⁾	100 mM
NAD ⁽⁹⁾	19 mM
Diaforasa ⁽¹⁰⁾	1800 µ/ml
Glucosa deshidrogenasa ⁽¹¹⁾	4020 µ/ml

- (1) Polysciences, Inc.
 (2) Polysciences, Inc.
 (3) DuPont, R-706
 (4) Huber Inc., Optifil
 (5) Pragmatics, Inc.
 (6) Air Products and Chemicals, Inc.
 (7) OSi Specialties
 (8) Dojindo Laboratories
 (9) Sigma-Aldrich, nº N-6522
 (10) Unitika, diaforasa I
 (11) Toyobo Co., Ltd., nº GLD311

REALIZACIÓN ALTERNATIVA A

Una formulación reactiva para medir la cantidad de un analito en un fluido biológico, que comprende:

- (a) una matriz polimérica hinchable y soluble en agua;
- (b) partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm ;
- 5 (c) un sistema enzimático para reaccionar con dicho analito; y

en la que la proporción en peso de dichas partículas insolubles en agua a dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua es de 1/2 a 2/1, en la que la formulación reactiva se aplica como un revestimiento que tiene un espesor de 6 a 16 μm .

REALIZACIÓN ALTERNATIVA B

- 10 Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dicho sistema enzimático se formula para que sea reactivo con un miembro del grupo que consiste en glucosa, lactato, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, bilirrubina, ascorbato, peróxido de hidrógeno, y ácido úrico.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA C

- 15 Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dicho analito es glucosa, y el sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA D

Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dichas partículas son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

- 20 REALIZACIÓN ALTERNATIVA E

Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfónico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA F

- 25 Una formulación reactiva de la realización alternativa A, que comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA H

Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dicho revestimiento tiene un espesor de 7 a 10 μm .

- 30 REALIZACIÓN ALTERNATIVA I

Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dicho polímero hinchable y soluble en agua tiene un peso molecular menor que 100.000.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA J

- 35 Una formulación reactiva de la realización alternativa A, en la que dichas partículas insolubles en agua tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO K

Un procedimiento para medir la cantidad de un analito en un fluido biológico, mediante la aplicación de una muestra de dicho fluido biológico a una tira de ensayo o a un detector electroquímico, y la obtención de una respuesta rápida y estable que no sea sensible al volumen de dicha muestra, comprendiendo dicho procedimiento:

- 40 (a) aplicar una muestra de dicho fluido biológico a dicha tira de ensayo o detector electroquímico, comprendiendo dicha tira de ensayo o detector electroquímico un sustrato no poroso sobre el cual se deposita una película que contiene un sistema enzimático para que reaccione con dicho analito en una formulación que incluye una matriz polimérica hinchable y soluble en agua, y partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm ; en el que la película tiene un espesor de 6 a 16 μm , y

(b) medir la respuesta de dicha muestra a dicho sistema enzimático mediante procedimientos ópticos o electroquímicos, y determinar la cantidad de dicho analito presente en dicho fluido biológico.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO L

5 Un procedimiento del procedimiento alternativo K, en el que dicho analito es glucosa, y dicho fluido biológico es sangre completa.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO M

Un procedimiento del procedimiento alternativo L, en el que dicho sistema enzimático incluye una glucosa oxidasa o una glucosa deshidrogenasa.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO O

10 Un procedimiento del procedimiento alternativo N, en el que dicha película fina tiene un espesor de 7 a 10 µm.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO P

Un procedimiento del procedimiento alternativo K, en el que la proporción en peso de dichas partículas a dicha matriz polimérica es de 1/2 a 2/1.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO Q

15 Un procedimiento del procedimiento alternativo K, en el que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua es una matriz polimérica que incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfúrico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO R

20 Un procedimiento del procedimiento alternativo K, en el que dichas partículas son partículas que incluyen al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO S

Un procedimiento del procedimiento alternativo K, en el que dicho polímero hinchable tiene un peso molecular menor que 100.000.

25 PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO T

Un procedimiento del procedimiento alternativo K, en el que dichas partículas insolubles tienen un tamaño nominal de 1 a 10 µm.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA U

Una formulación reactiva para medir el contenido en glucosa de sangre completa, que comprende:

- 30 (a) una matriz polimérica hinchable y soluble en agua;
- (b) partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 µm;
- (c) un sistema enzimático para oxidar dicha glucosa;
- (d) un indicador;

35 en la que la proporción en peso de las partículas reflectoras de (b) a la matriz polimérica es de 1/2 a 2/1, en la que la formulación reactiva se aplica como un revestimiento que tiene un espesor de 6 a 16 µm.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA V

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dicho sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

40 REALIZACIÓN ALTERNATIVA W

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dicho sistema enzimático comprende glucosa

deshidrogenasa, un cofactor para dicha glucosa deshidrogenasa, un indicador de sal de tetrazolio, y un mediador.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA X

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dichas partículas son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

5 REALIZACIÓN ALTERNATIVA Y

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfúrico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA Z

10 Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dicho polímero hinchable y soluble en agua se disuelve en una disolución tamponada para mantener un pH deseado.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA AA

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, que comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

15 REALIZACIÓN ALTERNATIVA CC

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dicho revestimiento tiene un espesor de 7 a 10 μm .

REALIZACIÓN ALTERNATIVA DD

20 Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dicho polímero hinchable y soluble en agua tiene un peso molecular menor que 100.000.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA EE

Una formulación reactiva de la realización alternativa U, en la que dichas partículas insolubles tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .

REALIZACIÓN ALTERNATIVA FF

25 Una tira de ensayo para medir el contenido en glucosa de muestras de sangre completa, que comprende:

(a) un sustrato no poroso;

(b) una capa reactiva depositada sobre dicho sustrato, comprendiendo dicha capa reactiva:

(1) una matriz polimérica hinchable y soluble en agua;

(2) partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm ;

30 (3) un sistema enzimático para oxidar dicha glucosa;

(4) un indicador;

en la que la capa reactiva tiene un espesor de 6 a 16 μm ;

(c) una cubierta protectora para dicha capa reactiva de (b);

35 (d) una capa adhesiva entre dicha capa reactiva y dicha cubierta protectora, teniendo dicha capa adhesiva un canal capilar para recibir dicha muestra de sangre.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA GG

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicho sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

40 REALIZACIÓN ALTERNATIVA HH

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicho sistema enzimático comprende glucosa deshidrogenasa, un cofactor para dicha glucosa deshidrogenasa, un indicador de sal de tetrazolio, y un mediador.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA II

- 5 Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua es al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfónico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA JJ

- 10 Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dichas partículas insolubles en agua son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA KK

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que la proporción en peso de las partículas reflectoras de b(2) a la matriz polimérica de (b)(1) es de 1/2 as 2/1.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA LL

- 15 Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicho polímero se disuelve en una disolución tamponada para mantener un pH deseado.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA MM

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicha capa reactiva de (b) comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

- 20 REALIZACIÓN ALTERNATIVA OO

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicha capa reactiva tiene un espesor de 7 a 10 µm.

REALIZACIÓN ALTERNATIVA PP

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dicho polímero hinchable tiene un peso molecular menor que 100.000.

- 25 REALIZACIÓN ALTERNATIVA QQ

Una tira de ensayo de la realización alternativa FF, en la que dichas partículas tienen un tamaño nominal de 1 a 10 µm.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO RR

- 30 Un procedimiento para medir la cantidad de glucosa en una muestra de sangre completa, mediante la aplicación de una muestra de sangre a una tira de ensayo, y la obtención de una respuesta rápida y estable que no sea sensible al volumen de dicha muestra de sangre, comprendiendo dicho procedimiento:

- 35 (a) aplicar dicha muestra de sangre a dicha tira de ensayo, comprendiendo dicha tira de ensayo un sustrato no poroso sobre el cual se deposita una película fina que contiene un sistema enzimático para que reaccione con dicha glucosa en una formulación que incluye una matriz polimérica hinchable y soluble en agua, partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 µm, y un indicador; y en el que la película tiene un espesor de 6 a 16 µm, y

(b) medir la respuesta de dicho indicador, y determinar la cantidad de dicha glucosa en dicha muestra de sangre.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO SS

- 40 Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que dicho sistema enzimático incluye una glucosa oxidasa o una glucosa deshidrogenasa.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO UU

Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que dicha película fina tiene un espesor de 7 a 10 µm.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO VV

Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que la proporción en peso de dichas partículas a dicha matriz es de 1/2 a 2/1.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO WW

5 Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que las partículas tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO XX

Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfúrico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

10 PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO YY

Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que dichas partículas son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO ZZ

15 Un procedimiento del procedimiento alternativo RR, en el que dicho polímero hinchable y soluble en agua tiene un peso molecular menor que 100.000.

REIVINDICACIONES

1.- Una formulación reactiva para medir la cantidad de un analito en un fluido biológico, que comprende:

(a) un sistema enzimático para reaccionar con dicho analito;

(b) una matriz polimérica hinchable y soluble en agua; y

5 (c) partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 µm;

en la que la proporción en peso de dichas partículas insolubles en agua a dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua es de 1/2 a 2/1,

que se caracteriza porque la formulación reactiva se aplica como un revestimiento que tiene un espesor de 6 a 16 µm.

10 2.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dicho sistema enzimático se formula para que reaccione con un miembro del grupo que consiste en glucosa, lactato, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, bilirrubina, ascorbato, peróxido de hidrógeno, y ácido úrico.

15 3.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dicho analito es glucosa, y el sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

4.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dichas partículas son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

20 5.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfónico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

6.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, que comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

7.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dicho revestimiento tiene un espesor de 7 a 10 µm.

25 8.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua tiene un peso molecular menor que 100.000.

9.- Una formulación reactiva de la reivindicación 1, en la que dichas partículas insolubles en agua tienen un tamaño nominal de 1 a 10 µm.

30 10.- Un procedimiento para medir la cantidad de un analito en un fluido biológico, mediante la aplicación de una muestra de dicho fluido biológico a una tira de ensayo o a un detector electroquímico, y la obtención de una respuesta rápida y estable que no sea sensible al volumen de dicha muestra, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) aplicar una muestra de dicho fluido biológico a dicha tira de ensayo o detector electroquímico, comprendiendo dicha tira de ensayo o detector electroquímico un sustrato no poroso sobre el cual se deposita una película que contiene un sistema enzimático para que reaccione con dicho analito en una formulación; y

35 (b) medir la respuesta de dicha muestra a dicho sistema enzimático mediante procedimientos ópticos o electroquímicos, y determinar la cantidad de dicho analito presente en dicho fluido biológico,

en el que la formulación incluye una matriz polimérica hinchable y soluble en agua, y partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 µm,

que se caracteriza porque la película tiene un espesor de 6 a 16 µm.

40 11.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho analito es glucosa, y dicho fluido biológico es sangre completa.

12.- Un procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho sistema enzimático incluye una glucosa oxidasa o una glucosa deshidrogenasa.

13.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha película tiene un espesor de 7 a 10 µm.

14.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que la proporción en peso de dichas partículas a dicha matriz

polimérica es de 1/2 a 2/1.

15.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua es una matriz polimérica que incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfúrico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

5 16.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que dichas partículas son partículas que incluyen al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

17.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha matriz polimérica hinchable tiene un peso molecular menor que 100.000.

10 18.- Un procedimiento de la reivindicación 10, en el que dichas partículas insolubles tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .

19.- Una formulación reactiva para medir el contenido en glucosa de sangre completa, que comprende:

(a) un sistema enzimático para oxidar dicha glucosa; y

(b) un indicador;

15 (c) una matriz polimérica hinchable y soluble en agua; y

(d) partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm ;

en la que la proporción en peso de las partículas reflectoras de (d) a la matriz polimérica (c) es de 1/2 a 2/1,

que se caracteriza porque la formulación reactiva se aplica como un revestimiento que tiene un espesor de 6 a 16 μm .

20 20.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dicho sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

21.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dicho sistema enzimático comprende glucosa deshidrogenasa, un cofactor para dicha glucosa deshidrogenasa, un indicador de sal de tetrazolio, y un mediador.

25 22.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dichas partículas son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

23.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfúrico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

30 24.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua se disuelve en una disolución tamponada para mantener un pH deseado.

25.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, que comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

26.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dicho revestimiento tiene un espesor de 7 a 10 μm .

35 27.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua tiene un peso molecular menor que 100.000.

28.- Una formulación reactiva de la reivindicación 19, en la que dichas partículas insolubles tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .

29.- Una tira de ensayo para medir el contenido en glucosa de muestras de sangre completa, que comprende:

40 (a) un sustrato no poroso;

(b) una capa reactiva depositada sobre dicho sustrato, comprendiendo dicha capa reactiva:

(1) un sistema enzimático para oxidar dicha glucosa; y

(2) un indicador;

(3) una matriz polimérica hinchable y soluble en agua;

(4) partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm ;

(c) una cubierta protectora para dicha capa reactiva de (b);

que se caracteriza porque la capa reactiva tiene un espesor de 6 a 16 μm ; y

- 5 (d) una capa adhesiva entre dicha capa reactiva y dicha cubierta protectora, teniendo dicha capa adhesiva un canal capilar para recibir dicha muestra de sangre.
- 30.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicho sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.
- 10 31.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicho sistema enzimático comprende glucosa deshidrogenasa, un cofactor para dicha glucosa deshidrogenasa, un indicador de sal de tetrazolio, y un mediador.
- 32.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua es al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido sulfónico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.
- 15 33.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dichas partículas insolubles en agua son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.
- 34.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que la proporción en peso de las partículas reflectoras de b(4) a la matriz polimérica de (b)(3) es de 1/2 a 2/1.
- 20 35.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicho polímero se disuelve en una disolución tamponada para mantener un pH deseado.
- 36.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicha capa reactiva de (b) comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.
- 37.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicha capa reactiva tiene un espesor de 7 a 10 μm .
- 25 38.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dicho polímero hinchable tiene un peso molecular menor que 100.000.
- 39.- Una tira de ensayo de la reivindicación 29, en la que dichas partículas tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .
- 40.- Un procedimiento para medir la cantidad de glucosa en una muestra de sangre completa, mediante la aplicación de una muestra de sangre a una tira de ensayo, y la obtención de una respuesta rápida y estable que no sea sensible al volumen de dicha muestra de sangre, comprendiendo dicho procedimiento:
- 30 (a) aplicar dicha muestra de sangre a dicha tira de ensayo, comprendiendo dicha tira de ensayo un sustrato no poroso sobre el cual se deposita una película fina que contiene un sistema enzimático para que reaccione con dicha glucosa en una formulación que incluye un indicador, una matriz polimérica hinchable y soluble en agua, y partículas insolubles en agua que tienen un tamaño nominal de 0,05 a 20 μm ;
- 35 (b) medir la respuesta de dicho indicador, y determinar la cantidad de dicha glucosa en dicha muestra de sangre,
- que se caracteriza porque** la película tiene un espesor de 6 a 16 μm .
- 41.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que dicho sistema enzimático incluye una glucosa oxidasa o una glucosa deshidrogenasa.
- 42.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que dicha película fina tiene un espesor de 7 a 10 μm .
- 40 43.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que la proporción en peso de dichas partículas a dicha matriz es de 1/2 a 2/1.
- 44.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que las partículas tienen un tamaño nominal de 1 a 10 μm .
- 45.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua incluye al menos un miembro del grupo que consiste en poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno sodio-ácido

sulfúrico, látex poliacrílico, polietilenglicol, acrilatos de estireno, y sus copolímeros.

46.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que dichas partículas son al menos un miembro del grupo que consiste en dióxido de titanio, carbonato de calcio, sílice, sulfato de bario, metales pulverizados, y látex.

5 47.- Un procedimiento de la reivindicación 40, en el que dicha matriz polimérica hinchable y soluble en agua tiene un peso molecular menor que 100.000.

48.- El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho analito es glucosa, y el sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

10 49.- El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la película comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

50.- El procedimiento de la reivindicación 40, en el que el sistema enzimático incluye un miembro del grupo que consiste en hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa-PQQ, y glucosa oxidasa.

15 51.- El procedimiento de la reivindicación 40, en el que la película comprende además al menos un tensioactivo, detergente, o espesante.

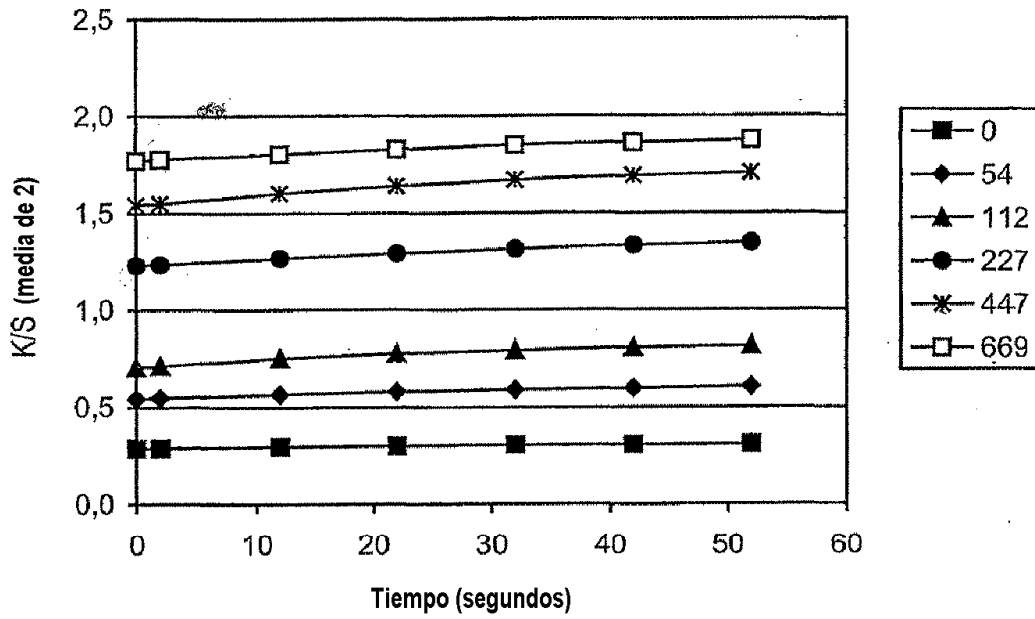


Fig. 1a

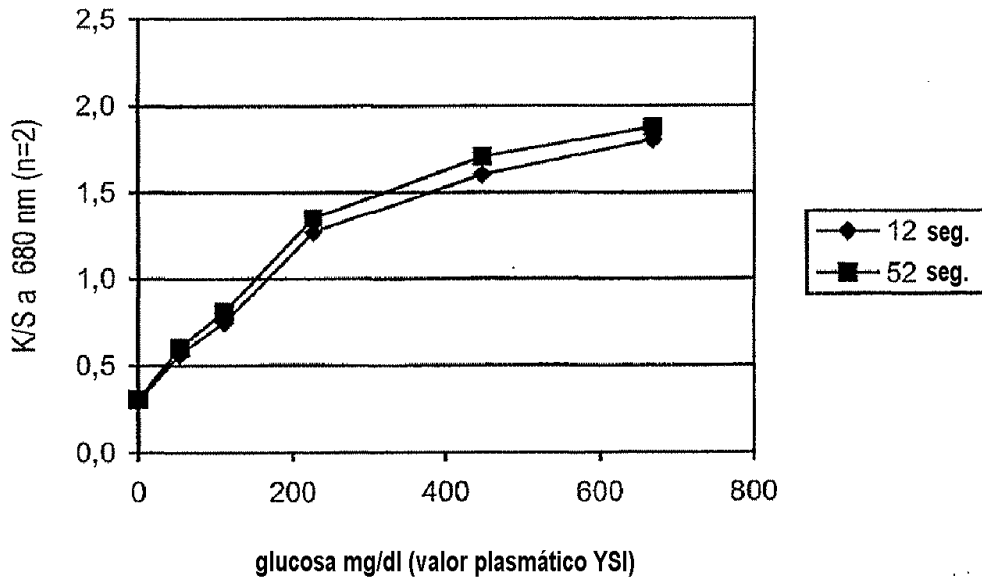


Fig. 1b

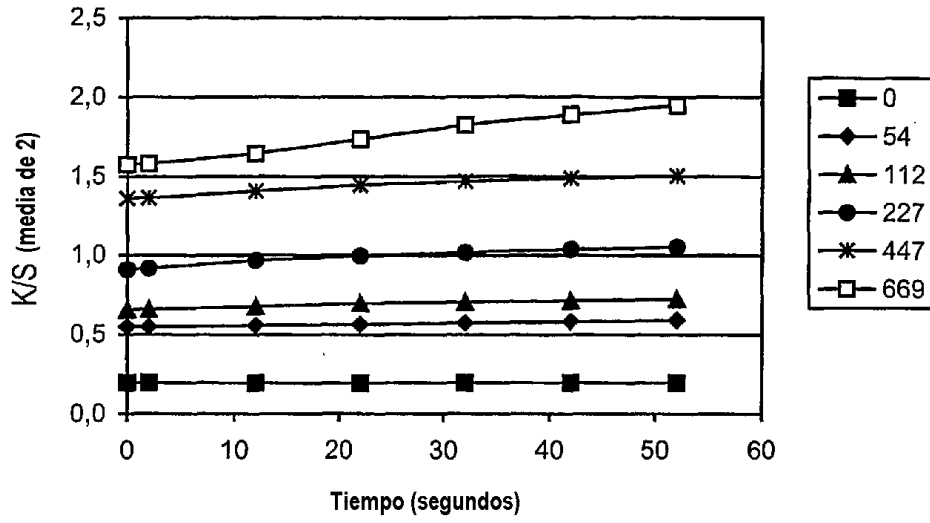


Fig. 2a

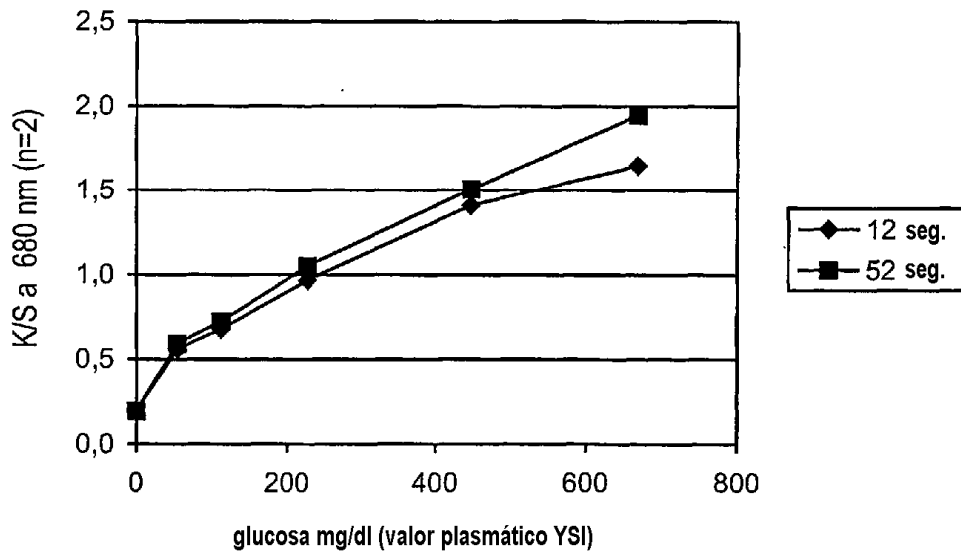


Fig. 2b

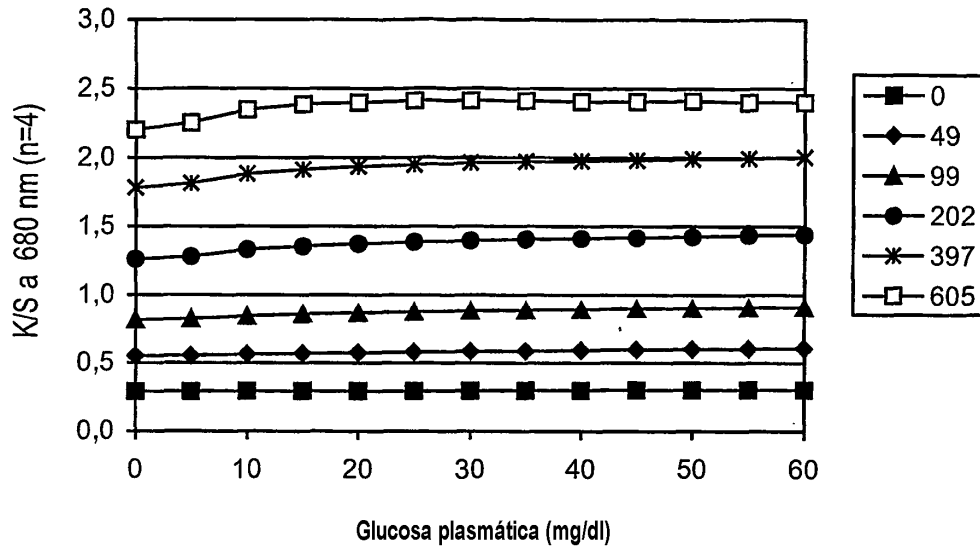


Fig. 3a

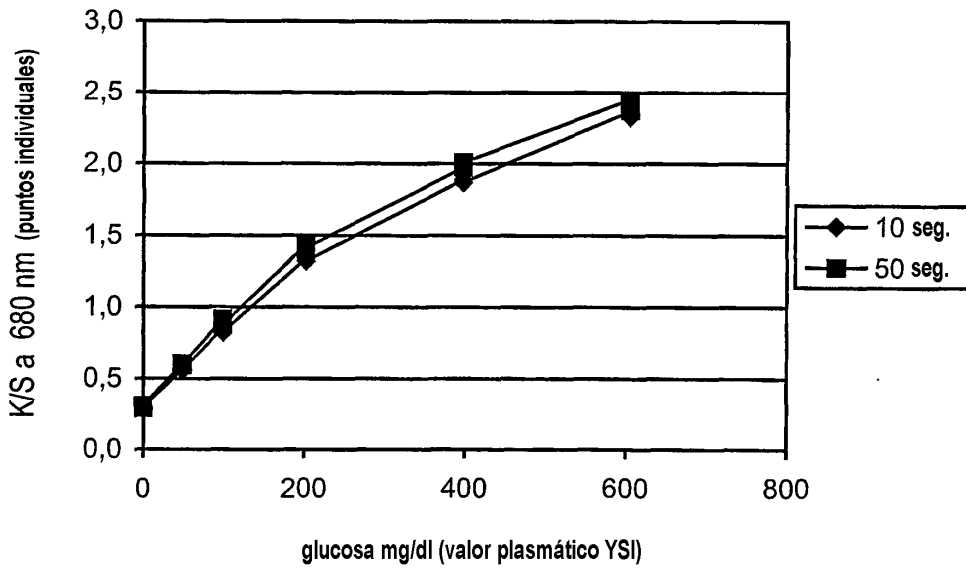


Fig. 3b

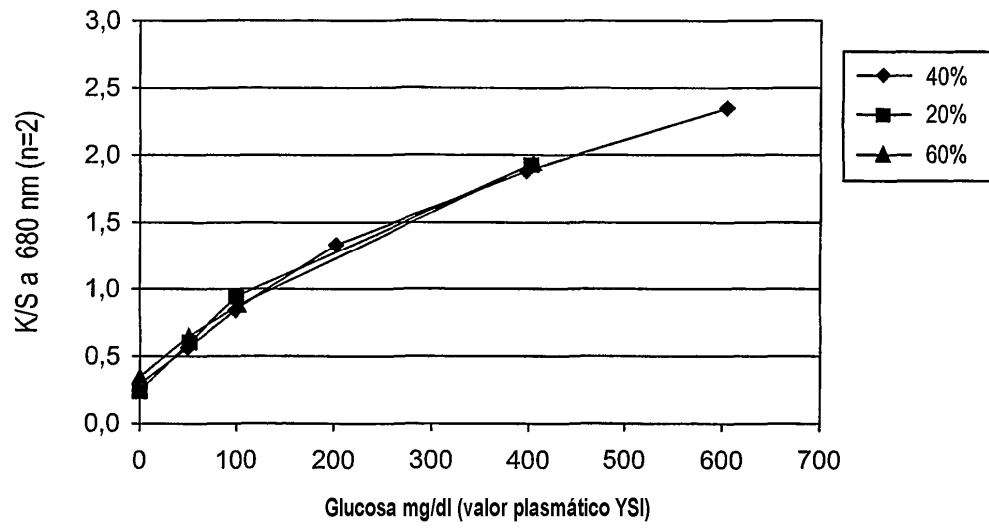


Fig. 3c

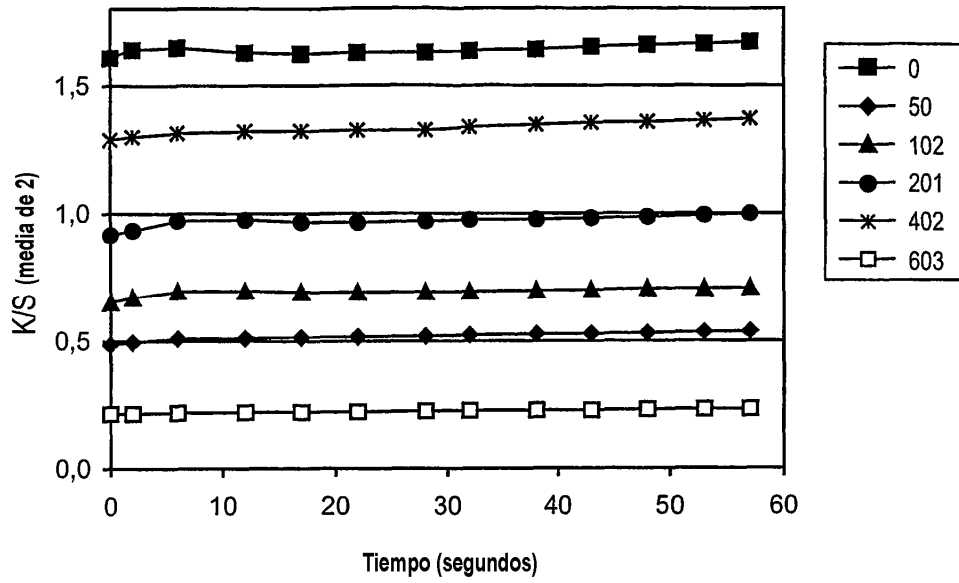


Fig. 4a

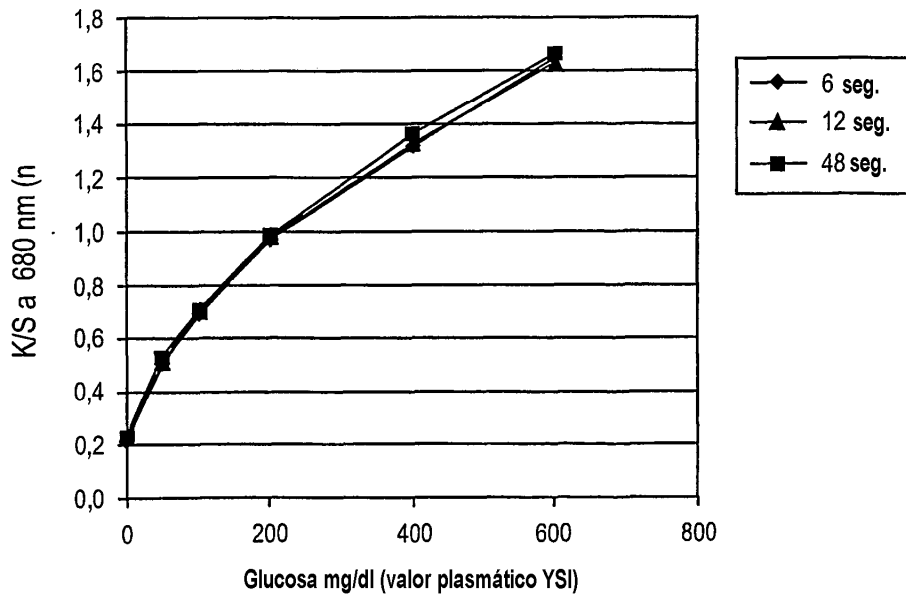


Fig. 4b

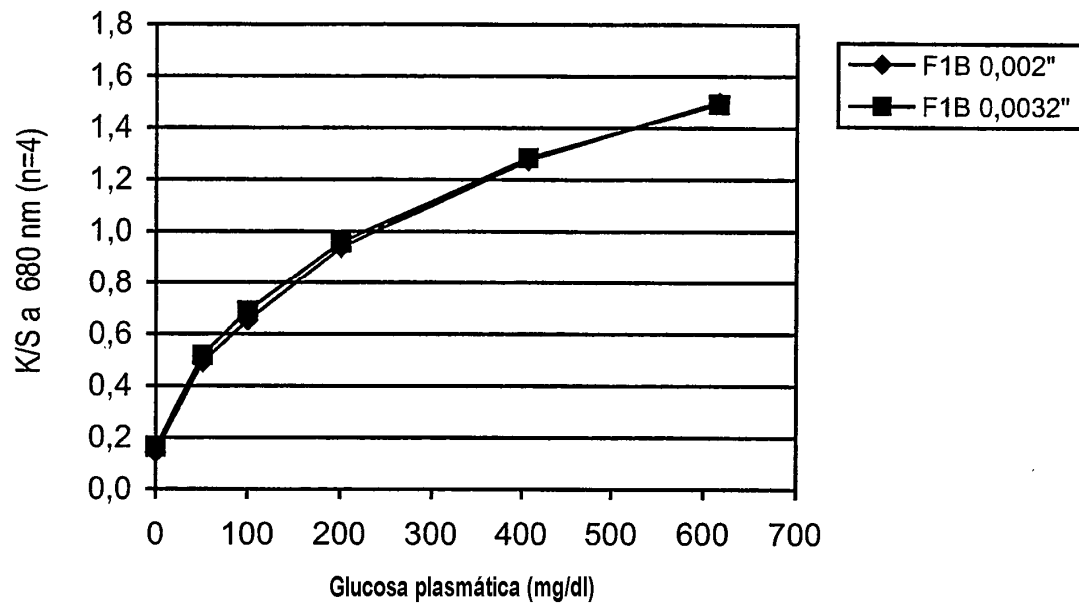


Fig. 4c