

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 166**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 27/28 (2006.01)

G01N 27/403 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03077244 .6**

96 Fecha de presentación: **15.11.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1362922**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Sensor electroquímico**

30 Prioridad:
16.11.1995 AU PN661995

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2012

73 Titular/es:
LIFESCAN, INC.
1000 GIBRALTAR DRIVE
MILPITAS, CA 95035-6312, US

72 Inventor/es:
Hodges, Alastair McIndoe;
Beck, Thomas William;
Maxwell, Ian Andrew y
Johansen, Oddvar

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 384 166 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

Sensor electroquímico

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a una celda electroquímica para determinar la concentración de un analito en un vehículo.

10 **Técnica antecedente**

10

La invención que se describe en este documento es una mejora o una modificación de la invención descrita en la solicitud de los autores pendiente de tramitación PCT/AU96/00365 (WO-A-97/00441), cuyo contenido se incorpora a este documento por referencia.

15 La invención se describirá en este documento con particular referencia a un biosensor adaptado para medir la concentración de glucosa en sangre.

20 Se sabe medir la concentración de un componente que se ha de analizar en una muestra líquida acuosa colocando la muestra en una zona de reacción en una celda electroquímica que comprende dos electrodos que tienen una impedancia que los hace adecuados para medición amperométrica. Se deja que reaccione el componente que se ha de analizar directa o indirectamente con un reactivo redox de modo que forme una sustancia oxidable (o reducible) en una cantidad correspondiente a la concentración del componente que se ha de analizar. La cantidad de sustancia oxidable (o reducible) presente se estima a continuación electroquímicamente. En general este método requiere suficiente separación de los electrodos de manera que los productos de electrolisis en un electrodo no puedan alcanzar al otro electrodo ni interferir con los procesos en el otro electrodo durante el período de medición.

25 En la solicitud pendiente de tramitación de los autores se describe un nuevo método para determinar la concentración de la forma reducida (u oxidada) de una especie redox en una celda electroquímica de la clase que comprende un electrodo de trabajo y un electrodo contador (o contador/referencia) espaciado del electrodo de trabajo por una distancia predeterminada. El método implica aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos y seleccionar el potencial del electrodo de trabajo de manera que la velocidad de electro-oxidación de la forma reducida de la especie química (o de la electro-reducción de la forma oxidada) se controla por difusión. El espaciado entre el electrodo de trabajo y el electrodo contador se selecciona de manera que los productos de reacción del electrodo contador lleguen al electrodo de trabajo. Determinando la corriente en función del tiempo después de la aplicación del potencial y antes de la consecución de corriente en estado estacionario y estimando a continuación la magnitud de la corriente en estado estacionario, el método anteriormente descrito permite estimar el coeficiente de difusión y/o la concentración de la forma reducida (u oxidada) de las especies.

30 La solicitud pendiente de tramitación de los autores ejemplifica este método con referencia al uso de una "celda electroquímica de capa delgada" que emplea un sistema GOD/ferrocianuro. Según se usa en este documento la expresión "celda electroquímica de capa delgada" se refiere a una celda que tiene electrodos espaciados muy próximos de manera que el producto de reacción del electrodo contador llegue al electrodo de trabajo. En la práctica, la separación de electrodos en una celda de este tipo para medir glucosa en sangre será menos de 500 micrómetros, y preferiblemente menos de 200 micrómetros.

45

La química usada en la celda electroquímica ejemplificada es como sigue:



50 donde GOD es la enzima glucosa oxidasa, y GOD* es la enzima "activada". Ferricianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) es el "mediador" que devuelve la GOD* a su estado catalítico. GOD, un catalizador enzimático, no se consume durante la reacción siempre que esté presente mediador en exceso. Ferrocianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) es el producto de la reacción total. Idealmente no hay ferrocianuro inicialmente, aunque en la práctica a menudo hay una pequeña cantidad. Después de que la reacción se termina la concentración de ferrocianuro (medida electroquímicamente) indica la concentración inicial de glucosa. La reacción total es la suma de las reacciones 1 y 2:

55

GOD



"Glucosa" se refiere específicamente a β -D-glucosa.

60 La técnica anterior sufre una serie de inconvenientes. En primer lugar, el tamaño de muestra requerido es mayor de lo deseable. En general sería preferible que se pudieran hacer las mediciones sobre muestras de volumen reducido porque

esto a su vez facilita el uso de métodos menos invasivos para obtener muestras.

En segundo lugar, sería deseable generalmente mejorar la precisión de la medición y eliminar o reducir las variaciones debidas, por ejemplo, a la asimetría de la celda u otros factores que se introducen durante la producción en gran cantidad de microceldas. Igualmente, sería deseable reducir los efectos "de borde" del electrodo.

En tercer lugar, dado que las celdas son desechables después de usar, es deseable que permitan la producción en gran cantidad a coste relativamente bajo.

10 **Exposición de la invención**

Según la presente invención se proporciona un sensor electroquímico para la determinación analítica de glucosa en una muestra líquida de sangre, comprendiendo el sensor:

15 una primera hoja de material eléctricamente resistivo que define una primera pared terminal de una celda electroquímica y que tiene dispuesta sobre ella un electrodo;

20 una segunda hoja de material eléctricamente resistivo que define una segunda pared terminal de una celda electroquímica y que tiene dispuesta sobre ella un electrodo;

una tercera hoja de material eléctricamente resistivo que tiene un orificio que se extiende a través de la tercera hoja y que define una pared lateral de la celda electroquímica, en la que el espacio entre la primera pared terminal y la segunda pared terminal comprende un espacio capilar;

25 una primera muesca en un borde lateral del sensor, que se extiende a través de la primera hoja, la segunda hoja y la tercera hoja, en la que una muestra líquida de sangre en contacto con la muesca es arrastrada espontáneamente por acción capilar adentro de la celda electroquímica;

30 una segunda muesca en un segundo borde lateral del sensor, que se extiende a través de la primera hoja, la segunda hoja y la tercera hoja, en comunicación con la celda y adaptada para permitir que escape aire desde la celda electroquímica; y

un sistema glucosa oxidasa / ferricianuro para medir la concentración inicial de glucosa en la muestra líquida.

35 **Descripción de realizaciones preferidas**

La invención se describirá ahora particularmente solo a manera de ejemplo con referencia a los dibujos esquemáticos que se acompañan en los que:

40 La figura 1 muestra el producto de la etapa 2 de fabricación en planta.

La figura 2 muestra el producto de la figura 1 en perfil.

45 La figura 3 muestra el producto de la figura 1 en alzado.

La figura 4 muestra el producto de la etapa 3 de fabricación en planta.

La figura 5 muestra el producto de la figura 4 en sección transversal sobre la línea 5-5 de la figura 4.

50 La figura 6 muestra el producto de la etapa 5 de fabricación en planta.

La figura 7 muestra el producto de la figura 6 en perfil.

55 La figura 8 muestra el producto de la figura 6 en alzado.

La figura 9 muestra el producto la etapa 7 de fabricación en planta.

La figura 10 es una sección transversal de la figura 9 sobre la línea 10-10.

60 La figura 11 muestra el producto de la figura 9 en alzado.

La figura 12 muestra una celda según la invención en planta.

La figura 13 muestra la celda de la figura 12 en perfil.

65 La figura 14 muestra la celda de la figura 12 en alzado.

La figura 15 muestra una pequeña porción de una segunda realización de la invención en sección ampliada.

5 La construcción de una celda electroquímica de capa delgada se describirá ahora a manera de ejemplo del método de fabricación mejorado.

10 Etapa 1: Una hoja 1 de Melinex® (un poli(tereftalato de etileno) ["PET"] químicamente inerte y eléctricamente resistivo) de aproximadamente 13 cm x 30 cm y 100 micrómetros de espesor se extendió en plano sobre una hoja de papel antiadhesivo 2 y se revistió usando una barra MYAR Número 2 con un espesor de 12 micrómetros en húmedo (aproximadamente 2-5 micrómetros en seco) con un adhesivo 3 basado en agua activado por calor (sistema ICI Novacoat que usa catalizador:adhesivo). A continuación se evaporó el agua por medio de un secador de aire caliente que deja una superficie de adhesivo de contacto. A continuación se dio la vuelta a la hoja sobre un papel antiadhesivo y se revistió de manera similar el reverso con el mismo adhesivo 4, se secó, y se aplicó un papel antiadhesivo protector 5 a la superficie de adhesivo que quedaba al descubierto. Se recortaron los bordes para obtener una hoja revestida uniformemente por ambos lados con adhesivo pegajoso de contacto protegido por papel antiadhesivo.

Etapa 2: La hoja con los papeles antiadhesivos protectores se cortó en tiras 7, cada una de aproximadamente 18 mm x 210 mm (figuras 1-3).

20 Etapa 3: Una tira 7 de PET revestido con adhesivo de la etapa 2 con papel antiadhesivo 2, 5 sobre los respectivos lados, se colocó en un conjunto de troquelado (que no se muestra) y se sujetó con mordazas. Se adaptó el conjunto de troquelado para taladrar la tira con un agujero localizador 10 en cada extremo y, por ejemplo, con 37 agujeros circulares 11 cada uno de 3,4 mm de diámetro con centros equiespaciados a 5 cm a lo largo de una línea entre los agujeros localizadores 10. El área de cada agujero 11 es aproximadamente de 9 mm cuadrados.

25 Etapa 4: Una hoja 12 de PET Mylar® de aproximadamente 21 cm cuadrados y 135 micrómetros de espesor se colocó en una cámara de pulverización catódica para revestir con paladio 13. El revestimiento por pulverización catódica tuvo lugar a un vacío entre 400 y 600 Pa y en atmósfera de gas argón. Se revistió paladio sobre el PET a un espesor de 100-1.000 angstroms. Se forma así una lámina 14 que tiene un revestimiento de paladio por pulverización catódica 13.

30 Etapa 5: La hoja 14 de PET revestido con paladio de la etapa 4 se cortó a continuación en tiras 14 y 15 y se usó un troquel para taladrar dos agujeros de localización 16 en cada tira, en un extremo (figuras 6, 7 y 8). Las tiras 14 y 15 solamente difieren en que las dimensiones de las tiras 14 son 25 mm x 210 mm y las dimensiones de las tiras 15 son 23 mm x 210 mm.

35 Etapa 6: Una tira espaciadora 7 preparada como en la Etapa 3 se colocó a continuación en una plantilla de guiado (que no se muestra) que tenía dos clavijas localizadoras (cada una correspondiente a cada agujero localizador 10 de la tira 7) y se retiró el papel antiadhesivo 2. Una tira 14 de PET revestido con paladio preparado como en la Etapa 5, se extendió a continuación sobre la capa adhesiva, con la superficie de paladio hacia abajo, usando las clavijas de la plantilla de guiado para alinear los agujeros localizadores 16 con la tira 7 de PET subyacente. Esta combinación se pasó a continuación por una laminadora que comprendía un conjunto de rodillos de apriete, uno de los cuales estaba adaptado para calentar el lado que lleva la tira 14 de PET revestido con paladio. El rodillo del lado opuesto de la tira 7 se mantuvo frío. Por este medio, solo se activó el adhesivo entre el paladio de la tira 14 y la tira 7 de PET.

45 Etapa 7: A continuación se dio la vuelta a la tira 7 de PET y se localizó en la plantilla de guiado con el revestimiento despegable hacia arriba. Se peló el revestimiento despegable y se colocó una segunda tira 15 revestida con paladio con el lado del paladio hacia abajo sobre la superficie de adhesivo que quedaba al descubierto usando las clavijas localizadoras para alinear las tiras. Este conjunto se pasó ahora otra vez por la laminadora de la etapa 6, esta vez con el rodillo caliente adyacente al Mylar® revestido de paladio que se añadió en la etapa 7 de manera que se activó el adhesivo intermedio (figuras 9, 10 y 11).

50 Etapa 8: El conjunto de la etapa 7 se devolvió al conjunto de troquelado y se taladraron muescas 17 en localizaciones de manera que se extendieran entre los agujeros circulares 11 previamente taladrados en el PET de Melinex® y el borde de la tira 17. Las muescas 16 se extienden de manera que interceptan la circunferencia de cada celda circular. A continuación se guillotiné la tira para dar 37 "tiras sensoras" individuales, siendo cada tira de aproximadamente 5 mm de ancho y teniendo cada tira una celda de cavidad de capa delgada (figuras 12, 13 y 14).

60 Se produce así una celda según se muestra en las figuras 12, 13 y 14. La celda comprende un primer electrodo que está constituido de la capa de PET 12, una capa de paladio 13, una capa de adhesivo 3, una hoja de PET 1, una segunda capa de adhesivo 4, un segundo electrodo que comprende la capa de paladio 13, y una capa de PET 12. La lámina 1 define una celda cilíndrica 11 que tiene un espesor en la dirección axial de la celda que corresponde al espesor de la capa 1 de la hoja de PET de Melinex® junto con el espesor de las capas 3 y 4 de adhesivo. La celda tiene paredes terminales circulares de paladio. Se proporciona acceso a la celda en el borde lateral de la celda donde las muescas 16 intersecan con la celda 11.

65 Según la invención, una muestra que se va a analizar se introduce en la celda por acción capilar. La muestra se coloca

en contacto con la muesca 16 y se introduce espontáneamente en la celda por acción capilar, el aire se desplaza de la celda expulsándose por la muesca opuesta 16. Se puede incluir un tensioactivo en el espacio capilar para ayudar a la introducción de la muestra.

5 Los sensores están provistos de medios de conexión por ejemplo conectores de bordes de modo que los sensores se pueden colocar en un circuito de medida. En una realización preferida esto se consigue haciendo el espaciador 1 más corto que las hojas 14, 15 que llevan paladio y haciendo la hoja 15 de menor longitud que la 14. Esto forma una región de toma de corriente 20 que tiene áreas de contacto 21, 22 conectadas eléctricamente con los electrodos de trabajo y contadores respectivamente. Un enchufe macho de lengüeta simple que tenga las correspondientes superficies conductoras de acoplamiento se puede usar entonces para la conexión eléctrica. Se pueden idear conectores de otra forma.

Los compuestos químicos para uso en la celda pueden estar soportados sobre los electrodos o las paredes de la celda, pueden estar soportados sobre un soporte independiente contenido dentro de la celda o pueden ser autoportantes.

15 En una realización, los compuestos químicos para uso en la celda se imprimen en la superficie de paladio del electrodo inmediatamente después de la etapa 1, etapa en la que el paladio recién depositado es más hidrófilo. Por ejemplo, se puede imprimir una disolución que contiene ferricianuro de potasio 0,2 molar y 1% en peso de glucosa oxidasa deshidrogenasa sobre la superficie de paladio. Deseablemente, los compuestos químicos se imprimen solamente en las áreas que formarán una pared de la celda y con preferencia los compuestos químicos se imprimen sobre la superficie por medio de una impresora de chorro de tinta. De esta manera, la deposición de compuestos químicos se puede controlar con precisión. Si se desea, los compuestos químicos que deseablemente están separados hasta que se requieren para uso, se pueden imprimir respectivamente en los electrodos primero y segundo. Por ejemplo, se puede imprimir una composición GOD/ferricianuro sobre un electrodo y un tampón sobre el otro. Aunque es altamente preferido aplicar los compuestos químicos a los electrodos antes de montar una celda, también se pueden introducir los compuestos químicos en la celda como una disolución después de la etapa 6 o la etapa 8 mediante pipeta a la manera tradicional y se retira posteriormente el disolvente mediante evaporación o secado. Los compuestos químicos no necesitan imprimirse sobre la pared de la celda o los electrodos y en vez de ello se pueden impregnar en una gasa, membrana, material textil no tejido o similar contenido en la cavidad, o que la llena, (por ejemplo insertado en la celda 11 antes de las etapas 6 o 7). En otra realización los productos químicos se forman en una masa porosa que se puede introducir en la celda como perlas o gránulos. Como alternativa, los compuestos químicos se pueden introducir como un gel.

En una segunda realización de la invención, se hace en primer lugar un estratificado 21 a partir de una tira 14 según se obtiene en la etapa 5 emparedado adhesivamente entre dos tiras 7 según se obtienen en la etapa 3. El laminado 20 sustituye a la hoja 1 en la etapa 5 y se ensambla con electrodos como en las etapas 6 y 7.

Se obtiene así una celda como se muestra en la figura 15 que difiere de las celdas de las figuras 9 a 11 en que la celda tiene un electrodo anular dispuesto entre el electrodo primero y el segundo. Se puede usar este electrodo, por ejemplo, como electrodo de referencia.

40 Se entenderá que en la producción de la celda en grandes cantidades, se pueden ensamblar las piezas como un estratificado en una línea continua. Por ejemplo, una hoja continua 1 de PET se podría taladrar en primer lugar y a continuación se podría aplicar continuamente adhesivo imprimiendo sobre la hoja restante. Los electrodos (preimpresos con disolución del producto químico y secados) se podrían alimentar directamente como un estratificado en el lado revestido con adhesivo. Entonces se podría aplicar adhesivo al otro lado de la hoja taladrada de núcleo y a continuación se podría alimentar el electrodo como un estratificado al segundo lado.

El adhesivo se podría aplicar como una película entrelazada de fusión en caliente. Como alternativa, la hoja de núcleo se podría revestir con adhesivo en primer lugar y se podría taladrar a continuación.

50 Secando los compuestos químicos sobre cada electrodo antes de la etapa de pegado la superficie del electrodo se protege de la contaminación.

Aunque se ha descrito la celda con referencia a PET de Mylar® y Melinex®, se pueden utilizar otros materiales químicamente inertes y eléctricamente resistivos y se pueden elegir otras dimensiones. Los materiales usados para la hoja espaciadora 1 y para soportar los electrodos de referencia y contadores pueden ser iguales o pueden diferir uno del otro. Aunque se ha descrito la invención con referencia a electrodos de paladio, se pueden usar otros metales tales como platino, plata, oro, cobre o similares y se puede hacer que reaccione plata con cloruro para formar un electrodo de plata/cloruro de plata o con otros haluros. Los electrodos no necesitan ser del mismo metal.

60 Aunque se ha descrito el uso de adhesivos activados por calor, las piezas se pueden ensamblar mediante uso de adhesivos de fusión en caliente, estratificados fundibles y otros métodos.

Las dimensiones del sensor se pueden variar fácilmente según requisitos.

65 Aunque se prefiere enormemente que los electrodos cubran las aberturas terminales de la celda, en otras realizaciones

(no ilustradas) los electrodos no cubren completamente las aberturas terminales de la celda. En ese caso, es deseable que los electrodos estén sustancialmente en registro que se superpone.

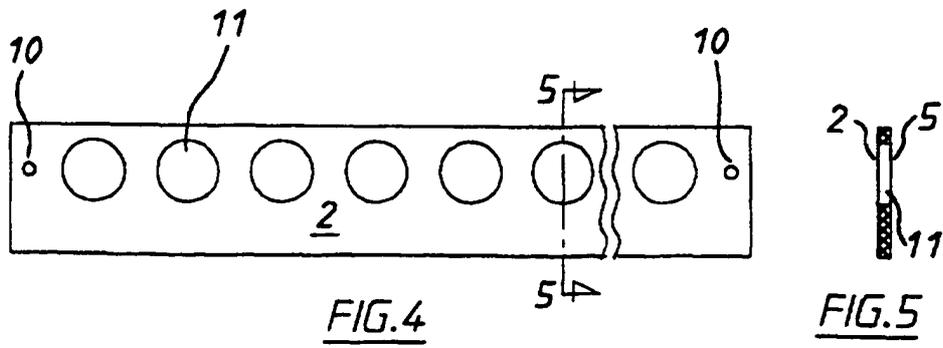
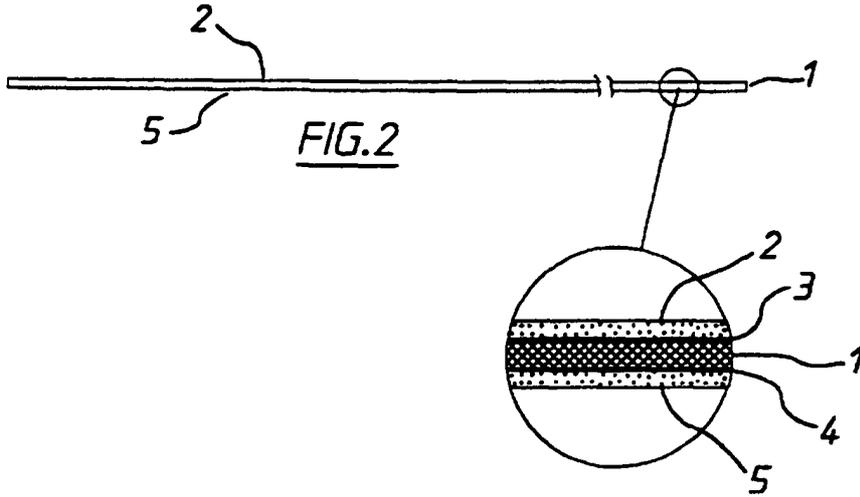
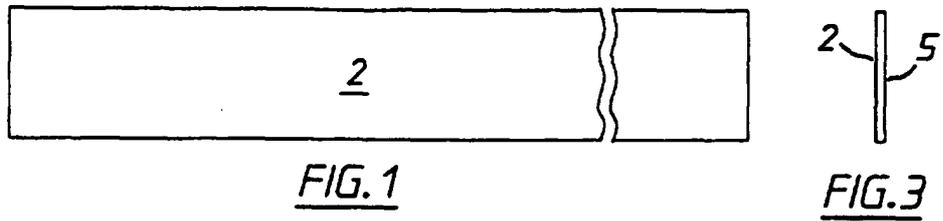
5 Las formas preferidas de la invención en las que los electrodos cubren los orificios de la celda 11 tienen la ventaja de que el área de electrodo se define de manera precisa simplemente perforando el agujero 11. Además, los electrodos proporcionados de esta manera son paralelos, se solapan, tienen sustancialmente el mismo área y están desprovistos sustancial o completamente de efectos "de borde".

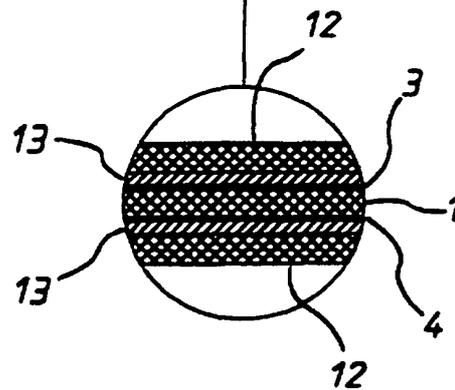
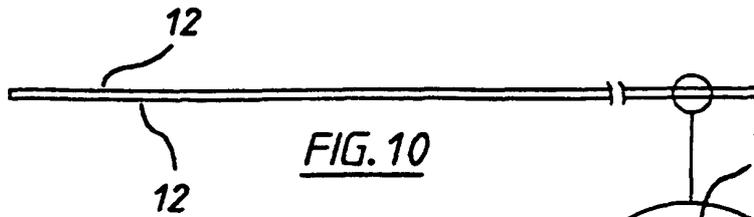
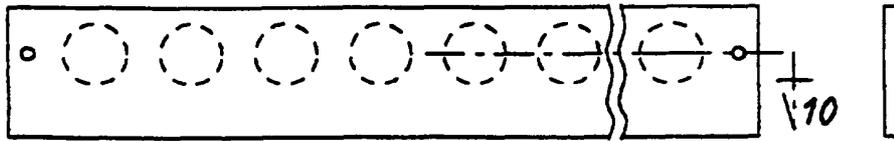
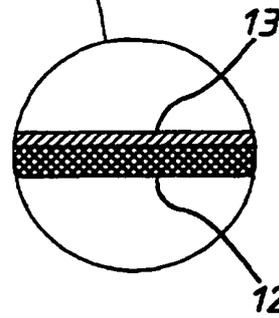
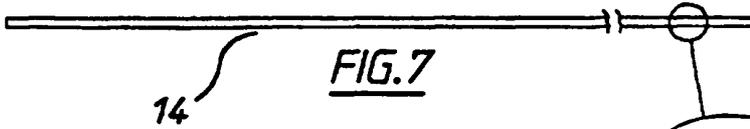
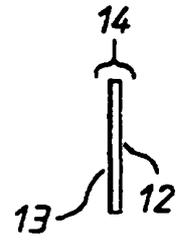
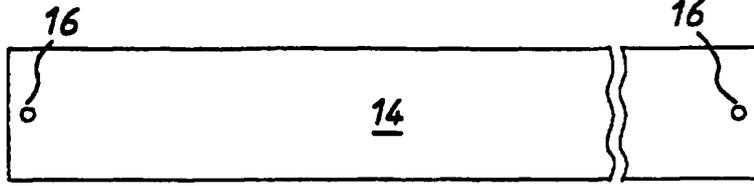
10 Aunque en la realización descrita cada sensor tiene una cavidad de celda, se pueden proporcionar sensores con dos o más cavidades. Por ejemplo, se puede proporcionar una segunda cavidad con una cantidad predeterminada del analito y puede funcionar como celda de referencia.

15 Como será evidente para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas contenidas en este documento, se puede combinar una característica de una realización que se describe en este documento con características de otras realizaciones que se describen en este documento o con otras realizaciones que se describen en la solicitud de los autores pendiente de tramitación.

REIVINDICACIONES

1. Un sensor electroquímico para la determinación analítica de glucosa en una muestra líquida de sangre, comprendiendo el sensor:
- 5 una primera hoja de material eléctricamente resistivo que define una primera pared terminal de una celda electroquímica y que tiene dispuesta sobre ella un electrodo;
- 10 una segunda hoja de material eléctricamente resistivo que define una segunda pared terminal de una celda electroquímica y que tiene dispuesta sobre ella un electrodo;
- 15 una tercera hoja de material eléctricamente resistivo que tiene un orificio que se extiende a través de la tercera hoja y que define una pared lateral de la celda electroquímica, en la que el espacio entre la primera pared terminal y la segunda pared terminal comprende un espacio capilar;
- 20 una primera muesca en un borde lateral del sensor, que se extiende a través de la primera hoja, la segunda hoja y la tercera hoja, en la que una muestra líquida de sangre en contacto con la muesca es arrastrada espontáneamente por acción capilar adentro de la celda electroquímica;
- 25 una segunda muesca en un segundo borde lateral del sensor, que se extiende a través de la primera hoja, la segunda hoja y la tercera hoja, en comunicación con la celda y adaptada para permitir que escape aire desde la celda electroquímica; y
- un sistema glucosa oxidasa / ferricianuro para medir la concentración inicial de glucosa en la muestra líquida.
2. Un sensor electroquímico según la reivindicación 1, en el que los electrodos no cubren completamente las aberturas terminales de la celda.
3. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada una de las hojas está unida mediante un adhesivo.
- 35 4. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el adhesivo es un adhesivo pegajoso de contacto.
- 35 5. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el adhesivo es una película entrelazada de fusión en caliente.
- 40 6. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un conector de borde, por lo que el sensor se puede colocar en un circuito de medición.
- 40 7. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos una de las hojas de material eléctricamente resistivo comprende poli(tereftalato de etileno).
- 45 8. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un tampón y un tensioactivo para ayudar a arrastrar una muestra líquida de sangre adentro de la celda electroquímica.
9. Un sensor electroquímico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los electrodos comprenden un revestimiento de paladio por pulverización catódica, que tiene un espesor de 100 a 1.000 angstroms.





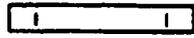


FIG. 13

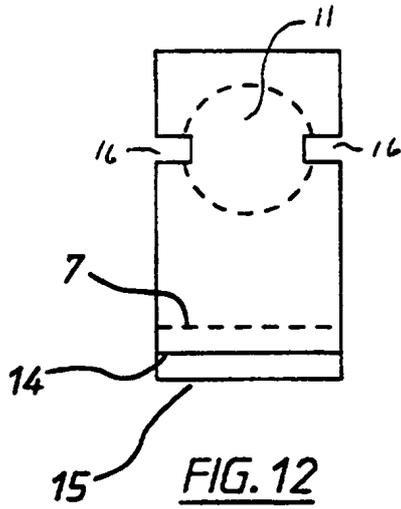


FIG. 12

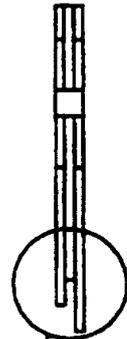


FIG. 14

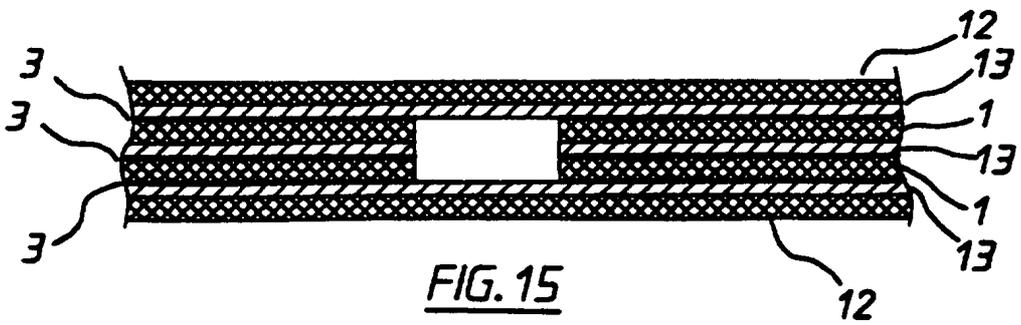
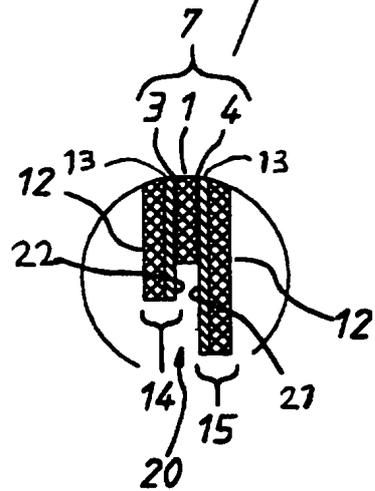


FIG. 15