

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 290**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2000 E 00936445 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1181539**

54 Título: **Sensor desechable de volumen submicrolitro**

30 Prioridad:

02.06.1999 US 324493

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

05.06.2015

73 Titular/es:

**NOVA BIOMEDICAL CORPORATION (100.0%)
200 Prospect Street Waltham
Massachusetts, 02254-9141, US**

72 Inventor/es:

**WINARTA, HANDANI;
CAI, XIAOHUA;
SETO, FUNG y
YOUNG, CHUNG, CHANG**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 537 290 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 desechable de volumen submicrolitro

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a sensores electroquímicos que pueden usarse para la cuantificación de un componente o analito específico en una muestra líquida tal como se define en las reivindicaciones. Particularmente, esta invención se refiere a un sensor electroquímico nuevo y mejorado. Más particularmente, esta invención se refiere a un sensor electroquímico desechable que es barato de fabricar. Incluso más particularmente, esta invención se refiere a un sensor electroquímico desechable que proporciona lecturas exactas y sólo requiere aproximadamente 0,2 microlitros de muestra fluida.

15 Todavía incluso más particularmente, esta invención se refiere a sensores electroquímicos desechables que se usan para realizar ensayos electroquímicos para la determinación exacta de analitos en líquidos fisiológicos.

20 **2. Descripción de la técnica anterior**

Se han usado biosensores en la determinación de concentraciones de diversos analitos en fluidos durante más de tres décadas. Es de particular interés la medición de glucosa en sangre. Se sabe bien que la concentración de glucosa en sangre es extremadamente importante para mantener la homeostasis. Los productos que miden las fluctuaciones en los niveles de glucosa, o azúcar en sangre, de una persona, se han convertido en artículos de primera necesidad para los millones de diabéticos del país. Debido a que este trastorno puede producir anomalías peligrosas en la bioquímica sanguínea y a que se cree que contribuye a la pérdida de visión e insuficiencia renal, la mayor parte de los diabéticos necesitan hacerse análisis por sí mismos periódicamente y ajustar su nivel de glucosa en consecuencia, habitualmente con inyecciones de insulina. Si la concentración de glucosa en sangre está por debajo del intervalo normal, los pacientes pueden experimentar pérdida de conocimiento y disminución de la tensión arterial que pueden incluso dar como resultado la muerte. Si la concentración de glucosa en sangre es mayor que el intervalo normal, el exceso de glucosa en sangre puede dar como resultado la síntesis de ácidos grasos y colesterol y, en diabéticos, coma. Por tanto, la medición de los niveles de glucosa en sangre se ha convertido en una necesidad diaria para los individuos diabéticos que controlan su nivel de glucosa en sangre mediante insulino terapia.

35 Los médicos enseñan a los pacientes que son insulino dependientes a que comprueben sus niveles de azúcar en sangre con una frecuencia de cuatro veces al día. Para adaptar un estilo de vida normal a la necesidad de una monitorización frecuente de los niveles de glucosa, se puso a disposición los análisis de glucosa en sangre en el domicilio con el desarrollo de tiras con reactivos para análisis de sangre completa.

40 Un tipo de biosensores de glucosa en sangre es un electrodo de enzima combinado con un compuesto mediador que transporta electrones entre la enzima y el electrodo dando como resultado una señal de corriente medible cuando está presente glucosa. Los mediadores usados más comúnmente son ferricianuro de potasio, ferroceno y sus derivados, así como otros complejos metálicos. Se han dado a conocer muchos sensores basados en este segundo tipo de electrodo. Se dan a conocer ejemplos de este tipo de dispositivo en las siguientes patentes.

45 La patente estadounidense n.º 5.628.890 (1997, Carter *et al.*) da a conocer una tira de electrodo que tiene un soporte de electrodo, un electrodo de referencia o contraelectrodo dispuesto sobre el soporte, un electrodo de trabajo separado del electrodo de referencia o contraelectrodo sobre el soporte, una capa de cobertura que define un espacio encerrado sobre los electrodos de referencia y de trabajo y que tiene una abertura para recibir una muestra en el espacio encerrado, y una pluralidad de capas de malla interpuestas en el espacio encerrado entre la capa de cobertura y el soporte. La capa de cobertura tiene una abertura de aplicación de muestra separada de los electrodos. El electrodo de trabajo incluye una enzima que puede catalizar una reacción en la que participa un sustrato para la enzima y un mediador que puede transferir electrones entre la reacción catalizada por la enzima y el electrodo de trabajo.

55 Este dispositivo propone reducir el efecto del hematocrito sobre las lecturas del sensor. Según la divulgación, esto resulta de la separación aguas abajo del electrodo de referencia con relación al electrodo de trabajo en combinación con la capa delgada de la disolución de muestra creada por las capas de malla.

60 La patente estadounidense n.º 5.708.247 (1998, McAleer *et al.*) da a conocer una tira reactiva para glucosa desechable que tiene un sustrato, un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y medios para realizar una conexión eléctrica. El electrodo de trabajo tiene una capa base conductora y una capa de recubrimiento sobre la capa base conductora. La capa de recubrimiento es un relleno que tiene regiones de superficie tanto hidrófobas como hidrófilas que forman una red, una enzima y un mediador.

65 La patente estadounidense n.º 5.682.884 (1997, Hill *et al.*) da a conocer un electrodo de tira con serigrafía. La tira

tiene un soporte alargado que incluye un primer y un segundo conductor que se extienden cada uno a lo largo del soporte. Un electrodo activo, situado para entrar en contacto con la mezcla líquida y el primer conductor, tiene un depósito de una enzima que puede catalizar una reacción y un mediador electrónico. Un electrodo de referencia está situado para entrar en contacto con la mezcla y el segundo conductor.

5 La patente estadounidense n.º 5.759.364 (1998, Charlton *et al.*) da a conocer un biosensor electroquímico que tiene una placa base aislante que porta un electrodo sobre su superficie que reacciona con un analito para producir electrones móviles. La placa base se hace coincidir con una tapa de material deformable que tiene una zona cóncava rodeada por una superficie plana de modo que cuando coincide con la placa base se forma un espacio capilar en el que puede aspirarse una muestra de prueba fluida. El lado de la tapa orientado hacia la base se recubre con un material polimérico que sirve para unir la tapa a la placa base y para aumentar la naturaleza hidrófila del espacio capilar.

10 La patente estadounidense n.º 5.762.770 (1998, Pritchard *et al.*) da a conocer una tira reactiva con biosensor electroquímico que tiene un requisito de muestra de sangre de volumen mínimo de aproximadamente 9 microlitros. La tira reactiva tiene un electrodo de trabajo y un contraelectrodo que son sustancialmente del mismo tamaño y están compuestos por el mismo material eléctricamente conductor colocado sobre un primer sustrato aislante. Recubriendo los electrodos hay un segundo sustrato aislante que incluye una porción cortada que forma un pozo de reactivo. La porción cortada deja expuesta una zona más pequeña del contraelectrodo que del electrodo de trabajo. Un reactivo para el análisis de un analito cubre sustancialmente las zonas expuestas del electrodo de trabajo y el contraelectrodo en el pozo de reactivo. Recubriendo el pozo de reactivo y fijado al segundo sustrato aislante hay una malla de extensión que se impregna con un tensioactivo.

15 La patente estadounidense n.º 5.755.953 (1998, Henning *et al.*) da a conocer un biosensor con reducción de interferencias. El dispositivo generalmente comprende un electrodo usado para medir de manera electroquímica la concentración de un analito de interés en una disolución. El dispositivo incluye una enzima peroxidasa unida covalentemente a carbono en micropartículas y retenida en una matriz en contacto íntimo con el electrodo. Según esta divulgación, es la enzima/carbono en micropartículas del dispositivo lo que proporciona una composición que presenta pequeña sensibilidad a sustancias interferentes conocidas.

20 La patente estadounidense n.º 5.120.420 (1992, Nankai *et al.*) da a conocer un biosensor con una placa base que tiene un sistema de electrodo compuesto principalmente por carbono, una capa aislante, una capa de reacción que contiene una capa de enzima sobre la misma, un espaciador y una cubierta. El espaciador crea un canal con una entrada y una salida para contener una muestra.

25 La solicitud de patente PCT n.º WO 98/35225 (1998, Heller *et al.*) da a conocer un sensor diseñado para determinar la cantidad y concentración de un analito en una muestra que tiene un volumen inferior a aproximadamente un microlitro. El sensor tiene electrodos de trabajo y de referencia enfrentados con un espaciador de material sorbente opcional. El electrodo de trabajo se recubre con una capa de reactivo que contiene un mediador redox no lixiviable y una enzima. Este dispositivo, que puede usar un volumen de muestra de prueba inferior a 1 microlitro, requiere el uso de un material sorbente dentro de la cámara de muestra para reducir el requisito de volumen e introducir un carácter hidrófilo en la cámara para que la muestra fluya al interior de tal cámara.

30 En el documento JP 09-189675, se da a conocer un biosensor que tiene una lámina metálica con dos rendijas que se extienden en paralelo entre sí para proporcionar electrodos. Sobre la película metálica se disponen elementos de cubierta que definen una zona de electrodo con aberturas en una dirección transversal a la dirección de las rendijas.

35 El documento US 5.437.999 da a conocer cómo usar un biosensor con una cubierta superior con un orificio de ventilación dispuesto en capas de sustrato formadas mediante un procedimiento de fotolitografía o serigrafía.

40 Sin embargo, la mayor parte de los dispositivos de la técnica anterior restantes requieren un volumen de muestra de prueba superior a 2 microlitros. Este volumen de muestra de prueba sólo puede obtenerse de un paciente, por ejemplo, usando una aguja y jeringa, o pinchando con lanceta una parte de la piel como la yema del dedo y "exprimiendo" la zona para obtener un volumen de muestra útil. Estos procedimientos son inconvenientes para el paciente, y a menudo dolorosos, particularmente cuando se requieren muestras frecuentes. Se conocen métodos menos dolorosos para obtener una muestra tal como pinchar con lanceta en el brazo o el muslo, que tienen una menor densidad de terminaciones nerviosas. Sin embargo, pinchar con lanceta el cuerpo en el brazo o el muslo produce normalmente volúmenes de muestra inferiores a un microlitro de sangre debido a que estas zonas no están tan abastecidas por vasos sanguíneos capilares cerca de la superficie. Dado que la presente invención tan sólo requiere 0,2 microlitros de sangre, los pacientes que deben realizarse varias mediciones de glucosa en sangre al día pueden obtener muestras de sangre de estas zonas preferidas.

45 Deficiencias adicionales de los dispositivos de la técnica anterior son que tienen un intervalo lineal más limitado, habitualmente hasta aproximadamente 600 mg/dl. Además, requieren un tiempo de espera relativamente más largo para el desarrollo de una respuesta en estado estacionario antes de poder obtener una lectura.

Debido a la importancia de obtener lecturas exactas de glucosa, sería muy deseable desarrollar un sensor electroquímico fiable y fácil de usar que no tenga todos los inconvenientes mencionados anteriormente. Por tanto, lo que se necesita es un sensor electroquímico que requiera menos volumen de muestra que el requerido previamente por la técnica anterior. Lo que se necesita además es un sensor electroquímico que tenga un amplio intervalo lineal de medición; es decir, un sensor que pueda utilizarse a lo largo de una concentración de glucosa más amplia. Lo que se necesita todavía adicionalmente es un sensor electroquímico que tenga un tiempo de espera relativamente corto para el desarrollo de una respuesta en estado estacionario.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un sensor electroquímico mejorado que combine una enzima y un mediador. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un sensor electroquímico que requiera menos volumen de muestra que el requerido previamente por la técnica anterior. Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar un sensor electroquímico que pueda medir un pequeño volumen de muestra sin el uso de una capa de malla en la trayectoria de la muestra. Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar un sensor electroquímico que tenga un amplio intervalo lineal de medición y un tiempo de espera relativamente corto para el desarrollo de una respuesta en estado estacionario.

La presente invención logra estos y otros objetivos proporcionando un sensor electroquímico que requiere un tamaño de muestra de sólo aproximadamente 0,2 microlitros y no usa una capa de malla en la trayectoria de la muestra como medio para lograr un tamaño reducido de la muestra. Además, la presente invención usa una composición de reactivos que permite que se tomen lecturas, que se correlacionan muy estrechamente con la concentración de analito en la muestra fluida, 20 segundos tras entrar la muestra fluida en el canal de muestra. La presente invención tiene un cuerpo laminado, alargado que tiene un canal de fluido de muestra conectado entre una abertura en un extremo del cuerpo laminado y un orificio de ventilación separado de la abertura. El canal de fluido de muestra se dimensiona para optimizar el flujo rápido de una muestra tal como sangre completa en el interior del canal. La captación rápida de la muestra permite que las reacciones de electrodo alcancen el estado estacionario más rápido, por tanto dando como resultado la obtención de una lectura de un analito más rápidamente. Dentro del canal de fluido se encuentra un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un pseudoelectrodo de trabajo. Esta disposición se define en las reivindicaciones. El electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el pseudoelectrodo de trabajo están cada uno en contacto eléctrico con conductos conductores independientes, respectivamente. Los conductos conductores independientes terminan y quedan expuestos para realizar una conexión eléctrica a un dispositivo de lectura en el extremo opuesto al extremo de canal abierto del cuerpo laminado.

El cuerpo laminado tiene una capa de base aislante compuesta por un material de plástico. La capa de base aislante tiene una capa conductora en un lado. La capa conductora puede depositarse sobre la capa aislante mediante serigrafía, mediante deposición en fase de vapor, o mediante cualquier método que proporcione una capa conductora que se adhiere a la capa de base aislante y cubre sustancialmente toda la capa de base aislante. La capa conductora depositada en fase de vapor se separa en conductos conductores mediante ataque químico/trazado de la capa conductora. El proceso de ataque químico puede lograrse químicamente, mediante líneas de trazado mecánico en la capa conductora, usando un láser para trazar la capa conductora y dar conductos conductores independientes, o mediante cualquier medio que provoque una rotura entre los diversos conductos conductores independientes requeridos por la presente invención. Los recubrimientos conductores preferidos son una composición/capa de película de oro o de película de oro/óxido de estaño.

Debe señalarse que la propia película de oro o película de oro/óxido de estaño no puede funcionar como electrodo de referencia. Para hacer que funcione el electrodo de referencia, debe haber una reacción redox (por ejemplo, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e^- \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) en el material eléctricamente conductor cuando se aplica un potencial. Por tanto, un mediador redox debe estar presente en el material conductor usado para el electrodo de referencia.

La característica única de la presente invención es su capacidad para medir tamaños de muestra de tan sólo 0,15 microlitros sin usar electrodos de trabajo y de referencia opuestos y una capa de sorbente/malla entre ellos para reducir el volumen de muestra requerido para la medición. Esto es posible debido a la combinación de material usado para la capa de base aislante con recubrimiento conductor, y el método único de formación de los conductos conductores en la misma.

El cuerpo laminado también tiene una capa aislante intermedia encima de la capa de base. La capa intermedia también está compuesta por un material de plástico aislante y crea el canal de fluido de muestra del cuerpo laminado. Contiene un corte en forma de U en un extremo que recubre la parte de electrodo de los conductos conductores en la capa de base, correspondiente el extremo abierto con el extremo abierto del cuerpo laminado descrito anteriormente.

El grosor de la capa intermedia debe ser de grosor suficiente para cargar una cantidad suficiente de reactivo químico para su uso como sensor electroquímico mientras se mantienen unas dimensiones del canal de flujo con unas características de flujo de sangre óptimas. El corte en forma de U contiene reactivo químico. El reactivo químico tiene un mediador redox con al menos uno de un estabilizador, un aglutinante, un tensioactivo, un tampón, tal como

se define en las reivindicaciones, y una enzima que puede catalizar una reacción en la que participa un sustrato para la enzima. El mediador redox puede transferir electrones entre la reacción catalizada por la enzima y el electrodo de trabajo. También hace que funcione el electrodo de referencia.

5 El cuerpo laminado de la presente invención tiene una capa superior con un orificio de ventilación. El orificio de ventilación está ubicado de tal manera que al menos una parte del orificio de ventilación recubre la parte inferior del corte en forma de U dejando expuesta una parte del reactivo químico de la capa intermedia aislante. El orificio de ventilación permite que se escape el aire dentro del canal de fluido de muestra a medida que entra el fluido de muestra en el extremo abierto del cuerpo laminado. El fluido de muestra llena generalmente el canal de fluido de muestra por acción capilar. En situaciones de pequeño volumen, el grado de acción capilar depende de la naturaleza hidrófoba/hidrófila de las superficies en contacto con el fluido que está experimentando la acción capilar. Esto también se conoce como la humectabilidad del material. Las fuerzas capilares se potencian o bien usando un material aislante hidrófilo para formar la capa superior, o bien recubriendo al menos una parte de un lado de un material aislante hidrófobo con una sustancia hidrófila en la zona de la capa superior que está orientada hacia el canal de fluido de muestra entre el extremo abierto del cuerpo laminado y el orificio de ventilación de la capa superior. Debe entenderse que un lado completo de la capa superior puede recubrirse con la sustancia hidrófila y luego unirse a la segunda capa intermedia.

20 Las tres capas del cuerpo laminado pueden estar compuestas por cualquier material dieléctrico. El material preferido es un material de plástico. Ejemplos de composiciones aceptables para su uso como material dieléctrico son poli(cloruro de vinilo), policarbonato, polisulfona, nailon, poliuretano, nitrato de celulosa, propionato de celulosa, acetato de celulosa, acetato-butilato de celulosa, poliéster, material acrílico y poliestireno.

25 Las partes de electrodo, ubicadas dentro del canal de fluido de muestra, contienen material de reactivos para el electrodo de trabajo (W), el electrodo de referencia (R) y el pseudoelectrodo de trabajo (W_0). Se dispone una mezcla de reactivos en el canal de fluido cubriendo así las partes de electrodo de la capa de base aislante y los conductos conductores. Se deposita una cantidad suficiente de mezcla de reactivos dentro del corte en forma de U de la capa intermedia aislante para cubrir sustancialmente toda la superficie conductora delineada por el corte en forma de U. La cantidad de la mezcla de reactivos usada es tal que la matriz de reactivos creada tras secado es suficiente para su uso como sensor electroquímico aunque proporciona suficiente espacio vacío por encima de la matriz de reactivos para permitir un rápido flujo de sangre a través del canal de fluido. La matriz de reactivos tiene un mediador redox con al menos uno de un estabilizador, un aglutinante, un tensioactivo, un tampón, tal como se define en las reivindicaciones, y una enzima que puede catalizar una reacción en la que participa un sustrato para la enzima.

35 La disposición de electrodos dentro del canal de fluido de muestra es R-W- W_0 con la disposición enumerada como la disposición de electrodos que aparecería desde el extremo abierto del cuerpo laminado hasta el orificio de ventilación; es decir, a medida que el fluido de muestra entra en el extremo abierto del cuerpo laminado, el fluido cubriría R en primer lugar, luego W, después W_0 .

40 El pseudoelectrodo de trabajo, W_0 , está situado de modo que el fluido de muestra llega al mismo en último lugar. La corriente resultante en W_0 desencadena por tanto que el medidor de lectura comience el procedimiento de medición y de determinación de la concentración de analito. Una disposición de este tipo obvia los problemas de fiabilidad y exactitud debidos a un tamaño de fluido de muestra insuficiente. Debe señalarse que W_0 también puede usarse como contraelectrodo. El sistema de tres electrodos resultante (es decir, electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contraelectrodo) se usaría en el caso de un fluido de muestra que tuviera una gran disminución de IR. También debe señalarse que W_0 , combinado con R, puede usarse para medir la resistencia del fluido de muestra. La resistencia resultante podría usarse para estimar el hematocrito de una muestra de sangre y por tanto corregir la interferencia del hematocrito.

50 Todas las ventajas de la presente invención resultarán más claras con la revisión de la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es una vista en perspectiva de la presente invención que muestra el extremo abierto, el orificio de ventilación y los puntos de contacto eléctrico del cuerpo laminado.

60 La figura 2 es una vista en perspectiva, en despiece ordenado de la presente invención que muestra las diversas capas del cuerpo laminado.

La figura 3 es una vista en sección transversal de la presente invención de la figura 1

65 Las figuras 4A, 4B y 4C son vistas desde arriba de un segmento de una tira de cada capa de la presente invención que muestra los patrones para realizar múltiples sensores de la presente invención.

La figura 4D es una vista desde arriba de un segmento de la tira laminada de la presente invención que muestra los patrones para realizar múltiples sensores de la presente invención.

La figura 5 es una correlación de volumen de muestra con la respuesta de concentración de la presente invención.

La figura 6 es una curva de correlación de las lecturas de concentración usando sensores de la presente invención frente a las lecturas de concentración obtenidas con las mismas muestras usando un analizador de glucosa YSI.

Descripción detallada de la realización preferida

La realización preferida de la presente invención se ilustra en las figuras 1-6. La figura 1 muestra un sensor 10 de la presente invención. El sensor 10 tiene un cuerpo laminado 100, un extremo de toma de muestras de fluido 110, un extremo de contacto eléctrico 120 y un orificio de ventilación 42. El extremo de toma de muestras de fluido 110 incluye un canal de fluido de muestra 112 entre una abertura de extremo de toma de muestras 114 y el orificio de ventilación 42. El extremo de contacto eléctrico 120 tiene tres contactos conductores discretos 122, 123 y 124.

Haciendo referencia a continuación a la figura 2, el cuerpo laminado 100 se compone de una capa de base aislante 20, una capa intermedia 30 y una capa superior 40. Todas las capas están compuestas por un material dieléctrico, preferiblemente plástico. Ejemplos de un material dieléctrico preferido son poli(cloruro de vinilo), policarbonato, polisulfona, nailon, poliuretano, nitrato de celulosa, propionato de celulosa, acetato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, poliéster, material acrílico y poliestireno. La capa de base aislante 20 tiene una capa conductora 21 sobre la que se delinea un primer conducto conductor 22, un segundo conducto conductor 23 y un tercer conducto conductor 24. Los conductos conductores 22, 23 y 24 pueden formarse mediante trazado o ranurado de la capa conductora 21 tal como se ilustra en la figura 2 y se muestra como línea de trazado 27 y 28 o mediante serigrafía de los conductos conductores 22, 23 y 24 sobre la capa de base 20. El trazado o ranurado de la capa conductora 21 puede realizarse mediante trazado mecánico de la capa conductora 21 suficientemente como para crear los tres conductos conductores independientes 22, 23 y 24. El método de trazado o ranurado preferido de la presente invención se realiza usando un láser de dióxido de carbono (CO₂), un láser de YAG o un láser de excímero. Puede realizarse una línea de ranurado adicional 29 (ampliada y no a escala; para fines ilustrativos sólo), pero no es necesario para la funcionalidad del sensor 10, a lo largo del borde externo de la capa de base 20 para evitar problemas de estática potenciales que darían lugar a una señal con ruido. La capa conductora 21 puede estar compuesta por cualquier material eléctricamente conductor, preferiblemente oro u oro/óxido de estaño. Un material que puede utilizarse para la capa de base 20 es una película de poliéster con oro/óxido de estaño (n.º de cat. FM-1) o una película de poliéster con oro (n.º de cat. FM-2) vendida por Courtaulds Performance Films, Canoga Park, California.

La capa intermedia 30 tiene un corte de canal en forma de U 32 ubicado en el extremo del sensor de capa intermedia 31. La longitud del corte de canal 32 es tal que cuando la capa intermedia 30 se estratifica encima de la capa de base 20, las zonas de electrodo W, R y W₀ están dentro del espacio definido por el corte de canal 32. Se encontró que el grosor de la capa intermedia 30 era crítico para la velocidad del flujo de fluido de muestra en el interior del canal de fluido de muestra 112, que se llena por acción capilar del fluido de muestra. El corte de canal 32 contiene la matriz de reactivos 50, mostrada más claramente en la figura 3, formando el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el pseudoelectrodo de trabajo. Normalmente, la matriz de reactivos 50 debe cargarse con un mediador redox para hacer que funcione el electrodo de referencia. Si no se carga R con un reactivo o mediador redox, el electrodo de trabajo W y W₀ no funcionarán. Las zonas de electrodo W, W₀ y R se cargan preferiblemente con el mismo reactivo químico. Los reactivos contienen una forma oxidada de un mediador redox, un estabilizador, un aglutinante, un tensioactivo, un tampón, tal como se define en las reivindicaciones, y una enzima.

Normalmente, el mediador redox puede ser al menos uno de ferroceno, ferricianuro de potasio, otros derivados de ferroceno, u otros mediadores redox orgánicos e inorgánicos. El estabilizador es polietilenglicol, el aglutinante es metilcelulosa, el tensioactivo es t-octilfenoxipolietoxietanol y el tampón es un tampón citrato. La enzima puede catalizar una reacción en la que participa un sustrato para la enzima o un sustrato catalíticamente reactivo con una enzima y un mediador que puede transferir electrones transferidos entre la reacción catalizada por la enzima y el electrodo de trabajo para crear una corriente representativa de la actividad de la enzima o el sustrato y representativa del compuesto. Un ejemplo de una enzima de este tipo es glucosa oxidasa.

La capa superior 40, que está colocada sobre y es coextensiva con la capa intermedia 30, tiene un orificio de ventilación 42 separado del extremo de muestra fluida 110 del sensor 10 para garantizar que el fluido de muestra en el canal de fluido 112 cubrirá por completo las zonas de electrodo W, R y W₀. El orificio de ventilación 42 está colocado en la capa superior 40 de modo que se alineará en cierta medida con la parte inferior del corte de canal 32 de la capa intermedia 30, significando la parte inferior el corte de canal 32 ubicado más alejado del extremo de sensor 31. Preferiblemente, el orificio de ventilación 42 dejará expuesta una parte de y recubrirá parcialmente la parte inferior del corte en forma de U 32 de la capa intermedia 30. La figura 3 muestra una vista en sección transversal ampliada de las diversas capas de la presente invención. Las capas no están a escala para que la relación de cada componente de la presente invención pueda entenderse mejor por los expertos en la técnica, especialmente las líneas de trazado 27 y 28.

Preparación de la matriz de reactivos de electrodo

La matriz de reactivos de electrodo comprende la forma oxidada de un mediador redox, un estabilizador, un aglutinante, un tensioactivo, un tampón y una enzima. Se encontró que la forma oxidada del mediador redox, ferricianuro de potasio, era estable en la matriz. Está disponible ferricianuro de potasio adecuado de Sigma Chemical, St. Louis, MO (n.º de cat. P3667). La cantidad usada en la formulación debe ser suficiente para obtener un intervalo lineal en que se pueda trabajar. La enzima también debe tener suficiente actividad, pureza y estabilidad. Puede obtenerse una glucosa oxidasa disponible comercialmente de Biozyme, San Diego, California como el n.º de cat. G03A, aproximadamente 270 U/mg. El estabilizador debe ser suficientemente soluble en agua y poder estabilizar tanto el mediador como la enzima. El estabilizador es polietilenglicol (n.º de cat. P4338, Sigma Chemicals, St. Louis, MO). El aglutinante debe poder unir todos los demás productos químicos en la matriz de reactivos en las zonas de electrodo W, R y W₀ a la superficie/capa conductora 21 de capa de base 20.

El aglutinante preferido es Methocel 60 HG (n.º de cat. 64655, Fluka Chemical, Milwaukee, WI). La disolución tampón debe tener suficiente capacidad tamponante y un valor de pH para optimizar la reacción enzimática. Se prefiere tampón citrato 0,05 M. El ácido cítrico y el citrato de sodio usados en la preparación del tampón citrato pueden obtenerse de Sigma Chemical. El tensioactivo es necesario para facilitar la dispensación de la matriz de reacción de electrodo en el corte de canal 32 así como para disolver rápidamente los reactivos químicos secos que participan en la formación de la matriz de reactivos. La cantidad y el tipo de tensioactivo se seleccionan para garantizar las funciones mencionadas previamente y para evitar un efecto de desnaturalización en la enzima. El tensioactivo preferido es Triton X-100 disponible de Fluka Chemical, Milwaukee, WI (n.º de cat. 94443). La matriz de reactivos se obtiene preparando una mezcla de reactivos de la siguiente manera:

Etapa 1: Preparar tampón citrato 50 mM (pH 5,7) disolviendo 0,1512 gramos de ácido cítrico y 1,2580 gramos de citrato de sodio en 100 ml de agua desionizada.

Etapa 2: Preparar una disolución de Methocel 60HG al 1% agitando 1 gramo de Methocel en 100 ml de tampón citrato de la etapa 1 durante 12 horas.

Etapa 3: Añadir 0,3 ml de Triton X-100 al 10% a la disolución de Methocel.

Etapa 4: Añadir 2,5 gramos de polietilenglicol a la disolución de la etapa 3.

Etapa 5: Mientras se agita, añadir 6,5 gramos de ferricianuro de potasio a la disolución de la etapa 4.

Etapa 6: Añadir 1,0 gramo de glucosa oxidasa a la disolución de la etapa 5 y agitar durante 10 minutos o hasta que se hayan disuelto por completo todos los materiales sólidos.

Construcción de electrodo

Se corta hasta la forma deseada un trozo de película de poliéster con oro u oro/óxido de estaño disponible de Courtaulds Performance Films, tal como se ilustra en la figura 2, formando la capa de base 20 del sensor 10. Se usa un láser de CO₂ para ranurar la película de poliéster con oro u oro/óxido de estaño (láser de 25 W disponible de Synrad, Inc., San Diego, CA). Tal como se ilustra en la figura 2, se ranura la película mediante el láser que crea la línea de ranurado 27 y 28 de manera que se formaron dos electrodos en el extremo de fluido de muestra 110 y tres puntos de contacto 122, 123 y 124 en el extremo de contacto eléctrico 120. La línea de ranurado es muy delgada pero suficiente para crear dos conductores eléctricos independientes. Puede realizarse una línea de ranurado adicional 29, pero no es necesario, a lo largo del borde externo de la capa de base 20 para evitar problemas de estática potenciales que darían lugar a una señal con ruido desde el sensor 10 terminado.

Se corta hasta el tamaño y la forma adecuados un trozo de cinta de doble cara (Arcare® 7840) disponible de Adhesive Research, Glen Rock, PA, formando la capa intermedia 30 con el canal en forma de U 32 de modo que cubrirá la mayoría de la capa conductora 21 de la capa de base 20 excepto porque deja expuesta una pequeña zona de contacto eléctrico en el extremo de contacto eléctrico 120 ilustrado en la figura 1. El canal en forma de U 32 se corta usando el láser de CO₂. La capa intermedia 30 se estratifica entonces sobre la capa de base 20. Tal como se mencionó anteriormente, esta capa intermedia 30 sirve como espaciador y define el tamaño del canal de muestra fluida 112. También define la zona de electrodo 26 que contiene la matriz de reactivos de electrodo 50. Se optimizan su anchura y altura para proporcionar una muestra fluida de movimiento relativamente rápido. El tamaño preferido del canal en forma de U 32 es de aproximadamente 0,039 pulgadas (1,0 mm) de ancho por aproximadamente 0,134 pulgadas (3,4 mm) de largo.

Se dispensan 1,0 microlitros de mezcla de reactivos en el canal 32 para formar los electrodos W, R y W₀. La mezcla de reactivos es una mezcla de un mediador redox, un estabilizador, un aglutinante, un tensioactivo, un tampón y una enzima. La composición preferida para la mezcla de reactivos se prepara mezclando los siguientes porcentajes (%p/p) de los siguientes componentes: aproximadamente el 6,5% de ferricianuro de potasio, aproximadamente el 2,5% de polietilenglicol, aproximadamente el 1% de Methocel 60 HG, aproximadamente el 0,03% de Triton X-100, tampón citrato aproximadamente 0,05 M (pH 5,7) y aproximadamente el 1% de glucosa oxidasa. Tras la adición de la mezcla de reactivos, se secó el dispositivo en un horno a 55°C durante aproximadamente 2 minutos.

Tras el secado, se forma un trozo de una película transparente (n.º de cat. PP2200 o PP2500 disponible de 3M)

como la capa superior 40. Se realiza un orificio de ventilación rectangular 42 usando el láser de CO₂ mencionado previamente. El tamaño preferido del orificio de ventilación 42 es de aproximadamente 0,039 pulgadas (1,0 mm) por aproximadamente 0,051 pulgadas (1,30 mm). El orificio de ventilación 42 está ubicado a aproximadamente 0,087 pulgadas (2,2 mm) desde el extremo de fluido 110 del sensor 10. La capa superior 40 se alinea y estratifica sobre la capa intermedia 30 para completar el conjunto, tal como se ilustra en la figura 1, del sensor 10.

Aunque la descripción de la construcción de electrodo anterior describe la construcción para un solo sensor, el diseño y los materiales usados son ideales para realizar múltiples sensores a partir de un trozo de cada material de capa tal como se muestra en las figuras 4A-4C. Esto se logra partiendo de un trozo relativamente grande de la capa de base 20 que tiene la capa conductora 21 sobre la misma. Una pluralidad de líneas ranuradas 27 y 28 se realizan en la capa conductora 21 de manera que se crea un patrón repetitivo, tal como se ilustra en la figura 4A, usando el método de trazado preferido descrito previamente mediante el cual cada patrón definirá eventualmente las tres trayectorias de conductor 22, 23 y 24 para cada sensor. De manera similar, se estratifica un gran trozo de la capa intermedia 30 que tiene una pluralidad de cortes alargados 32 en un patrón repetitivo e ilustrado en la figura 4B sobre la capa de base 20. El trozo grande de la capa intermedia 30 se dimensiona para que se ajuste sobre la capa de base 20 de tal manera que la pluralidad de cortes alargados 32 se alineen sobre las zonas en las que las líneas de trazado 27 y 28 se cortan dejando expuestas tres zonas de electrodo distintas W, R y W₀, y dejando expuesta la pluralidad de contactos conductores 122, 123 y 124 ubicados en el borde opuesto de la tira. El tamaño de cada corte y la cantidad de mezcla de reactivos dispuesta en cada canal 32 son similares a los dados a conocer anteriormente. Tras dispensar la mezcla de reactivos en los cortes respectivos, se seca la mezcla de reactivos de manera que cada corte alargado 32 de la capa intermedia 30 contiene una capa delgada de la matriz de reactivos. Se estratifica una capa superior 40 dimensionada de manera comparable a y coextensiva con la capa intermedia 30 que tiene una pluralidad de orificios de ventilación 42 en un patrón repetitivo, tal como se muestra en la figura 4C, sobre la capa intermedia 30. La figura 4D es una vista desde arriba de las capas combinadas. La tira laminada creada por las tres capas 20, 30 y 40 tiene una pluralidad de sensores 10 que pueden cortarse de la tira laminada. La tira laminada se corta longitudinalmente a lo largo de la línea A-A' en el extremo de toma de muestras de fluido 210 para formar una pluralidad de aberturas de toma de muestras 114 y longitudinalmente a lo largo de la línea B-B' en el extremo de contacto eléctrico 220 para formar una pluralidad de contactos conductores 122, 123 y 124. La tira laminada se corta en intervalos predeterminados a lo largo de las líneas C-C' formando una pluralidad de sensores individuales 10. Si se desea, puede realizarse la conformación del extremo de toma de muestras de fluido 120 de cada sensor 10, tal como se ilustra en la figura 1. Los expertos en la técnica deben entender que el orden en el que puede cortarse la tira laminada no es importante. Por ejemplo, la tira laminada puede cortarse en los intervalos predeterminados (C-C') y luego pueden realizarse los cortes a lo largo de A-A' y B-B' para completar el proceso.

Los siguientes ejemplos ilustran las características únicas de la presente invención. Todos los sensores de la presente invención se sometieron a prueba en un glucosímetro experimental fabricado por Nova Biomedical Corporation de Waltham, MA. Se aplicó un potencial de 0,35 voltios a través del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y se convirtieron las señales de corriente resultantes en concentraciones de glucosa. Se compararon las lecturas con lecturas (lecturas de control) obtenidas con las mismas muestras usando un analizador de glucosa YSI (modelo 2300) disponible de Yellow Springs Instruments, Inc., Yellow Springs, OH.

Ejemplo 1

Demostración de la característica de volúmenes mínimos de muestra

El diseño único de la presente invención permite la medición de tamaños de muestra menores que los que han sido posibles hasta la fecha. Se aplican muestras de sangre a los sensores y las muestras se desplazan a lo largo del canal de muestra fluida hasta el orificio de ventilación. Se determina el volumen de sangre requerido para la medición de glucosa en sangre mediante el volumen de canal. El volumen calculado para la presente invención es de 0,22 microlitros. Para someter a prueba el efecto del volumen sobre la respuesta del sensor, se aplicaron diferentes volúmenes de muestra de sangre a los sensores y se representaron gráficamente las lecturas de concentración resultantes frente al volumen. Se muestran los datos de prueba en la figura 5.

Los sensores de la presente invención no muestran dependencia de la respuesta con el volumen de muestra hasta un volumen inferior a 0,22 microlitros. Se encontró que los sensores de la presente invención todavía proporcionaban lecturas razonables con tamaños de muestra de tan sólo 0,15 microlitros. Esto es posible debido a que el carácter hidrófilo de la matriz de reactivos aplicado a W, R y W₀ permitió que la muestra cubriese las zonas de electrodo incluso cuando el volumen de sangre no llenaba todo el canal de muestra.

Ejemplo 2

Demostración de la característica de amplio intervalo lineal y precisión

Se extrajo una muestra de sangre venosa y se separó en varias alícuotas. A cada una se le añadieron cantidades conocidas con diferentes concentraciones de glucosa que oscilaban entre 35 y 1000 mg/dl. Se midieron cada una de las alícuotas con un analizador de glucosa YSI y luego con sensores de la presente invención usando el

glucosímetro de Nova. Los sensores de la presente invención muestran una relación lineal de la respuesta de corriente frente a la concentración de glucosa desde 35 hasta 1000 mg/dl. Se representaron gráficamente las lecturas de concentración frente a los valores de concentración obtenidos usando el medidor YSI (el control) y se ilustran en la figura 6.

5 Un coeficiente de regresión de 0,9976 indicó una coincidencia casi perfecta con las lecturas obtenidas con el analizador de glucosa en sangre YSI. Se sometieron a prueba las mismas alícuotas usando cuatro sensores disponibles comercialmente diferentes con sus medidores adjuntos. Los sensores disponibles comercialmente mostraron una respuesta lineal sólo hasta aproximadamente 600 mg/dl. Por encima del intervalo de 500-600 mg/dl, todos los sensores disponibles comercialmente presentaron "Hi" como resultado de prueba.

10 Se investigó la precisión de los sensores de la presente invención en el mismo intervalo de nivel de glucosa de desde aproximadamente 35 hasta 1000 mg/dl. Se usaron cuatro lotes diferentes de sensores de la presente invención en las pruebas de precisión. Normalmente, la desviación estándar relativa fue de aproximadamente el 5,0% y el 3,6% para muestras que contenían niveles de glucosa de 100 y 300 mg/dl, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Tira de electrodo desechable (10) para someter a prueba una muestra fluida que comprende:
 - 5 una tira laminada (100) que tiene un primer extremo de tira (110) y un segundo extremo de tira (120), comprendiendo dicha tira laminada (100) una capa de base (20) que tiene una capa conductora (21) dispuesta sobre la misma y trazada para delinear tres trayectorias de electrodo (22, 23, 24), una capa de formación de canal (30) portada sobre dicha capa de base, y una cubierta (40),
 - 10 en la que dicha tira laminada tiene un orificio de ventilación (42) en una superficie superior de dicha tira laminada (100) y separada de dicho primer extremo de tira (110);
 - un canal encerrado (112) entre dicho primer extremo de tira (110) y dicho orificio de ventilación (42), en la que el volumen de dicho canal encerrado es inferior a un microlitro, y dicho canal encerrado contiene un electrodo de trabajo (W), un pseudoelectrodo de trabajo (W_0) y un electrodo de referencia (R), siendo la
 - 15 disposición de los electrodos W, W_0 y R dentro de dicho canal encerrado, R-W- W_0 en la dirección desde dicho extremo de la primera tira (110) hasta dicho orificio de ventilación (42);
 - una matriz de reactivos (50), que contiene al menos una enzima, un mediador redox, un estabilizador, un aglutinante, un tensioactivo y un tampón, dispuesta sobre dicha capa de base en dicho canal encerrado, en la que dicho estabilizador es polialquilenglicol, dicho aglutinante es metilcelulosa, dicho tensioactivo es t-octilfenoxipolietoxietanol y dicho tampón es un tampón citrato;
 - 20 contactos conductores en dicho segundo extremo de tira y aislados de dicho canal encerrado.
 2. Tira de electrodo según la reivindicación 1, en la que dicha enzima es glucosa oxidasa.
 3. Tira de electrodo según la reivindicación 1, en la que dicho redox mediador es ferricianuro de potasio y
 - 25 otros mediadores redox inorgánicos y orgánicos.
 4. Tira de electrodo según la reivindicación 1, en la que dicho recubrimiento conductor es oro o dicho recubrimiento conductor comprende oro y óxido de estaño.
 5. Tira de electrodo según la reivindicación 1, en la que dicha capa de base, dicha capa de formación de canal
 - 30 y dicha cubierta están compuestos por un material de plástico dieléctrico.
 6. Tira de electrodo según la reivindicación 7, en la que dicho material de plástico se selecciona del grupo que
 - 35 consiste en poli(cloruro de vinilo), policarbonato, polisulfona, nailon, poliuretano, nitrato de celulosa, propionato de celulosa, acetato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, poliéster, material acrílico y poliestireno.
 7. Tira de electrodo según la reivindicación 1, en la que dicha cubierta tiene un recubrimiento hidrófilo en al
 - 40 menos un lado.
 8. Tira de electrodo según la reivindicación 1, en la que dicho pseudoelectrodo de trabajo (W_0) y dicho electrodo de referencia (R) son un par de electrodos de medición de resistencia.

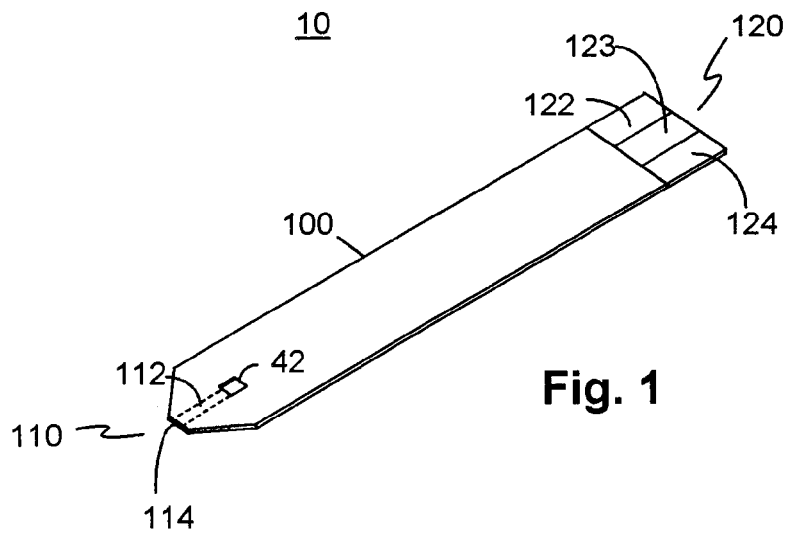


Fig. 1

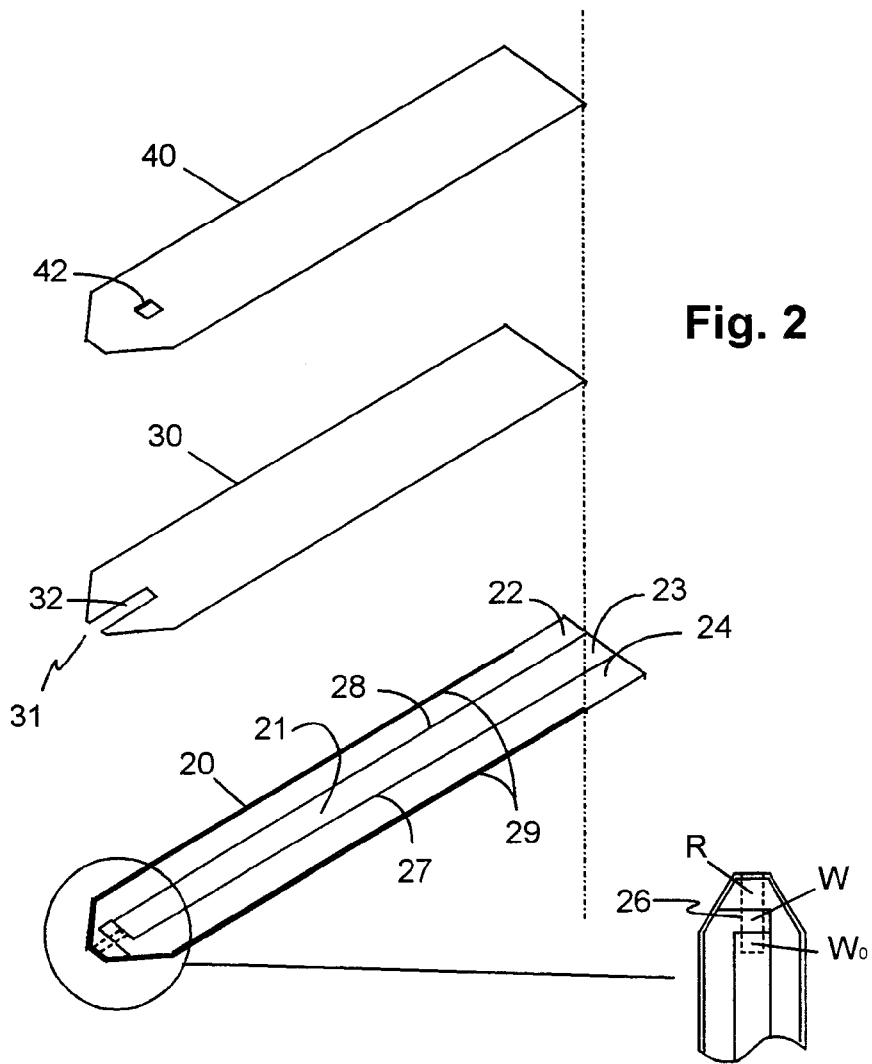


Fig. 2

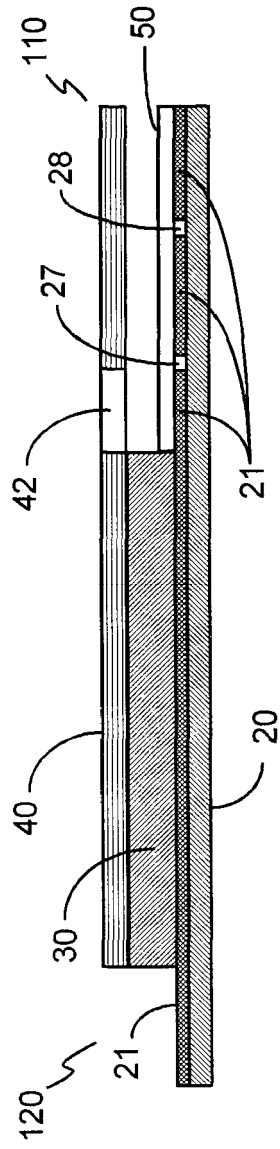


Fig. 3

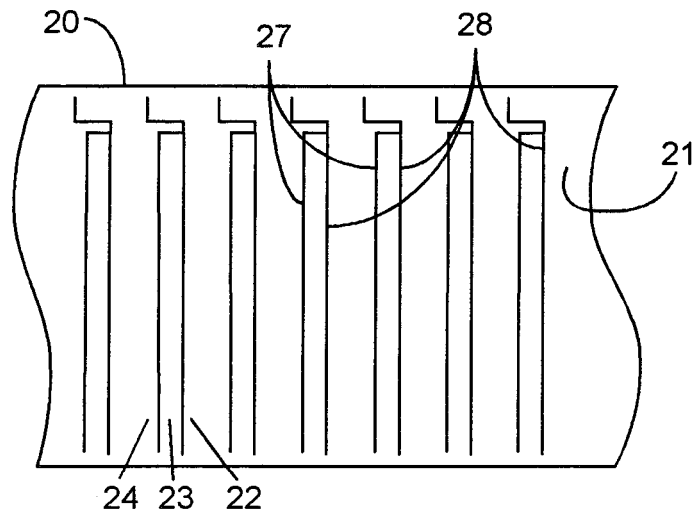


Fig. 4 A

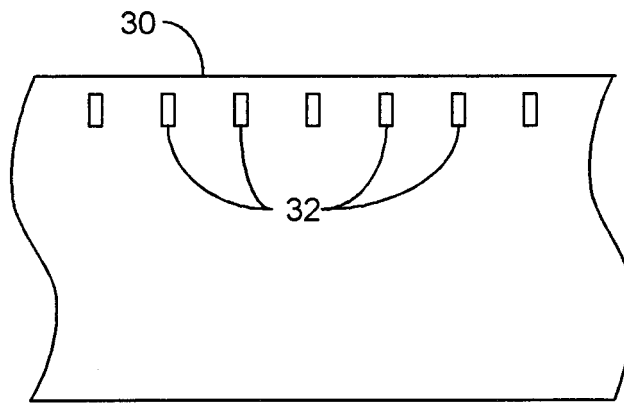


Fig. 4 B

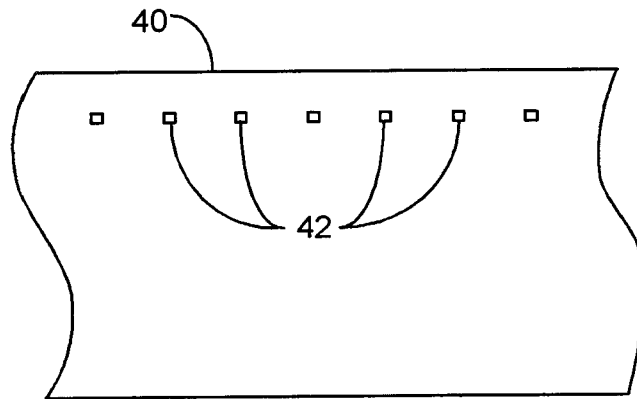


Fig. 4 C

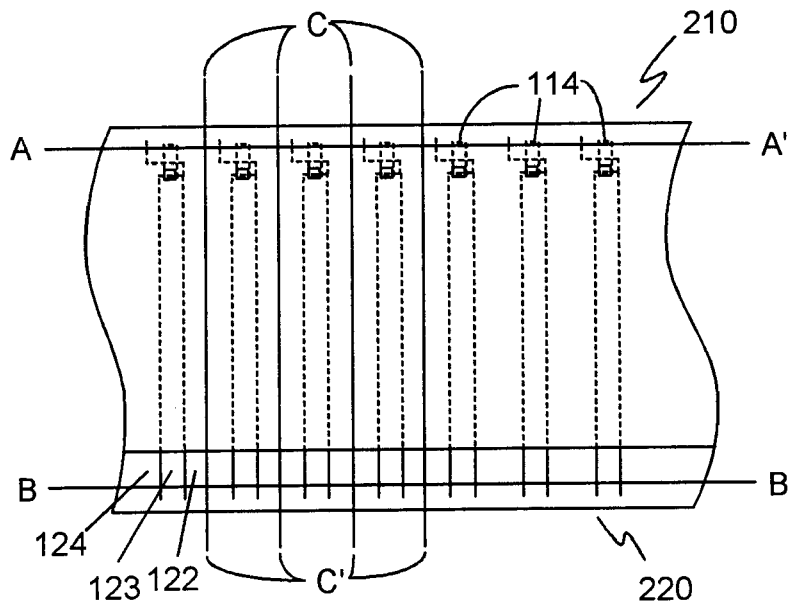


Fig. 4 D

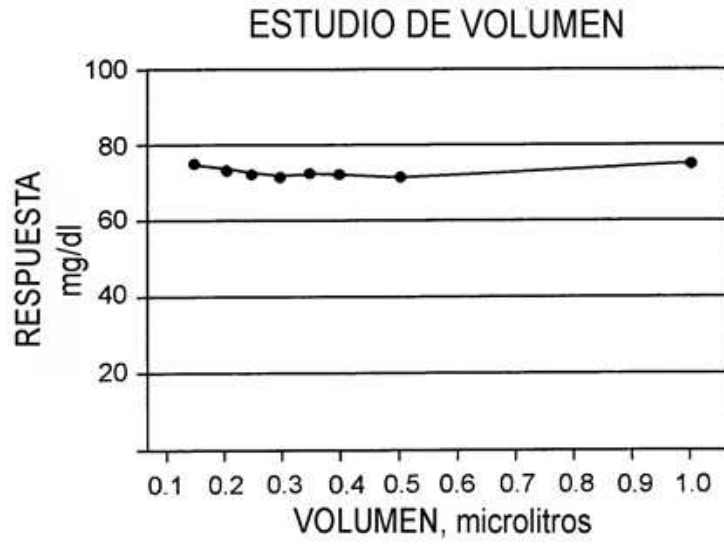


Fig. 5

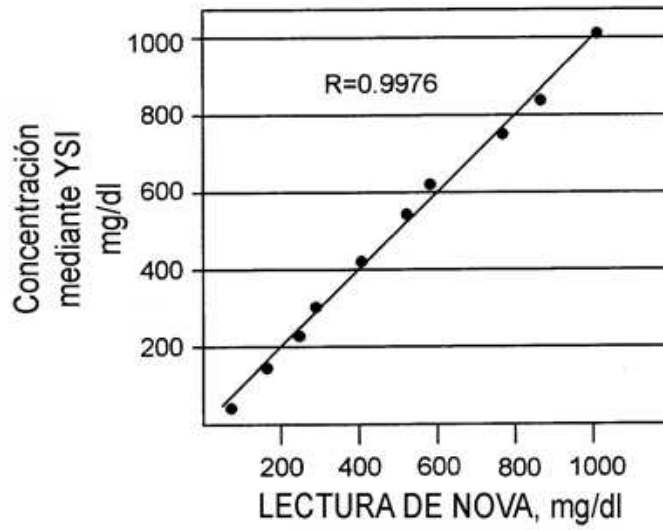


Fig. 6