

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 464**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/26** (2006.01)

**C12Q 1/32** (2006.01)

**C12Q 1/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2011 E 11743441 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2596115**

54 Título: **Composiciones que contienen tampón zwiteriónico y usos en dispositivos y métodos electroanalíticos**

30 Prioridad:

**23.07.2010 US 367243 P**

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

**29.04.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CARRINGTON, NATHAN, ALLEN;  
DUVALL, STACY HUNT y  
VAN DYKE, LEON SCOTT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 568 464 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 que contienen tampón zwitteriónico y usos en dispositivos y métodos electroanalíticos

5 La invención descrita en la presente memoria se refiere a composiciones, dispositivos y usos en la detección analítica y/o cuantificación de un analito. En particular, la invención se refiere a la detección electroanalítica y/o cuantificación de la glucosa.

10 El término "reactivo" tal como se utiliza en toda la presente descripción se refiere a un "reactivo seco".

10 El seguimiento de la concentración de compuestos biológicamente significativos para la detección y tratamiento precoces de riesgos sanitarios se ha convertido en un sólido campo de desarrollo que ha mejorado la salud de la humanidad. Los compuestos biológicamente significativos que son la diana analítica de una tecnología particular se denominan analitos. Resulta de importancia significativa para la salud humana el seguimiento de la glucosa en la sangre intravascular. El análisis de la glucosa en sangre se ha adoptado tan ampliamente y la tecnología ha avanzado tan significativamente que los individuos pueden analizar personalmente su propia sangre. La cuantificación de la concentración de glucosa en sangre se ha convertido en un componente importante del control de la propia salud de las personas. En particular, la información puede ser utilizada para ayudar a determinar las dosis apropiadas de insulina para el diabético, bajo control médico.

20 Uno de los métodos desarrollados para el seguimiento de las concentraciones de glucosa en sangre ha sido la utilización de biosensores electroquímicos. Los biosensores electroquímicos se basan principalmente en reacciones químicas catalizadas enzimáticamente que incluyen el analito de interés. En el caso del seguimiento de la glucosa, la reacción química relevante es la oxidación de la glucosa en gluconolactona. Esta oxidación está catalizada por una diversidad de enzimas, algunos de los cuales puede contener un coenzima unido, tal como la nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (NAD(P)), mientras que otros pueden contener un cofactor unido, tal como la flavin-adenina dinucleótido (FAD) o pirroloquinolin-quinona (PQQ).

25 El documento n° US 2008/0.248.514 A1 da a conocer un método para cuantificar la glucosa en una solución, que comprende medir un potencial eléctrico mediante potenciometría utilizando una glucosa deshidrogenasa que requiere un compuesto flavina como coenzima.

35 Un tipo de biosensor electroquímico utiliza una tira de ensayo desechable que incluye la celda eléctrica (electrodo) requerido, los reactivos químicos y una cámara para depositar una muestra. Se utiliza una diversidad de tiras de ensayo para medir las concentraciones de glucosa en sangre para el seguimiento del nivel de azúcar en la sangre de las personas diabéticas. Más concretamente, dichas tiras de ensayo incluyen una cámara de reacción en la que se deposita una composición de reactivo. Las composiciones de reactivo utilizadas dentro de la tira de ensayo pueden variar, y han variado, sustancialmente. En una clase de tiras de ensayo, los reactivos se depositan dentro de la tira de ensayo en forma de una película o capa delgada, uniforme y seca. Al introducir una muestra en la cámara de la tira de ensayo, la composición de reactivo se rehidrata en la muestra de manera que los reactivos puedan reaccionar con el analito. Las reacciones entre los reactivos y el analito resultan en que varían las propiedades electroquímicas de la solución. Esta variación de propiedades puede seguirse utilizando un dispositivo electrónico que está diseñado para leer la tira de ensayo. Debe entenderse que puede utilizarse una amplia diversidad de dispositivos convencionales para leer las tiras de ensayo indicadas en la presente memoria.

45 Inesperadamente se ha descubierto en la presente invención que los tampones zwitteriónicos pueden incluirse en una amplia diversidad de sistemas de reactivos y mejorar la cinética de la detección y/o la medición de la glucosa. En particular, se ha descubierto que los tampones zwitteriónicos pueden mejorar el tiempo hasta la señal máxima y/o mejorar la magnitud de la señal máxima en comparación con otros tampones. Se apreciará que dicho tiempo más corto hasta la señal máxima puede permitir que la respuesta de DC se establezca más rápidamente y conduzca a una mayor precisión en comparación con otros tampones que alcanzan más lentamente el máximo de respuesta de DC. Sin respaldo teórico se cree en la presente memoria que los tampones zwitteriónicos pueden incrementar la tasa global de la reacción enzimática con la glucosa. Sin respaldo teórico se cree en la presente memoria que la tasa de reacción incrementada de FAD-GDH con la glucosa podría permitir la utilización de secuencias de ensayo con tiempos de incubación más cortos.

50 También se ha descubierto inesperadamente en la presente memoria que los tampones zwitteriónicos pueden mejorar la estabilidad, tal como la estabilidad de almacenamiento, de las composiciones de reactivo que resultan útiles para la detección y/o la medición de la glucosa. En particular, se ha descubierto que los tampones zwitteriónicos pueden mejorar la estabilidad frente a la temperatura de la composición de reactivo. Además, se ha descubierto inesperadamente en la presente memoria que los tampones zwitteriónicos pueden conducir a una reducción global de la interferencia del sodio.

65 En una realización ilustrativa de la invención, se describe una composición de reactivo. En un aspecto, la composición de reactivo resulta útil para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. En otro aspecto, la composición de reactivo incluye uno o más enzimas para detectar la glucosa, tal como una o más glucosa

- deshidrogenasas, una o más glucosa oxidorreductasas y combinaciones de las mismas. En otro aspecto, la composición de reactivo incluye uno o más cofactores, coenzimas o una combinación de los mismos para el enzima o enzimas. En otro aspecto, la composición de reactivo incluye uno o más mediadores, precursores de mediador o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la composición de reactivo incluye uno o más tampones zwitteriónicos. En otra realización, la composición de reactivo incluye además uno o más adyuvantes. Debe entenderse que la composición de reactivo puede configurarse en cualquiera de entre una diversidad de formatos, incluyendo los formatos indicados en la presente memoria, tales como una composición de reactivo seca sobre una tira de ensayo.
- En otra realización, se describen métodos para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. Los métodos incluyen la etapa de poner en contacto una muestra que contiene glucosa con una composición de reactivo descrita en la presente memoria.
- En otra realización, se describen sensores electroquímicos para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. Entre los sensores electroquímicos se incluye una composición de reactivo indicada en la presente memoria.
- En otra realización, se describen dispositivos para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. Los dispositivos incluyen un componente que comprende una composición de reactivo indicada en la presente memoria.
- La fig. 1 muestra las curvas cinéticas de la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) para tres sensores ilustrativos basados en un enzima PQQ-GDH utilizando reactivos, entre ellos: (A) un tampón PIPES, (b) un tampón de  $\beta$ -glicerofosfato y (C) un tampón de fosfato.
- La fig. 2 muestra las curvas cinéticas de la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) para dos sensores ilustrativos basados en un enzima FAD-GDH utilizando reactivos, entre ellos: (A) un tampón PIPES y (b) un tampón de fosfato.
- La fig. 3 muestra las curvas cinéticas de la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) para tres sensores ilustrativos utilizando reactivos que incluían: (A) un tampón MOPS a un pH de 7,5, (b) un tampón de  $\beta$ -glicerofosfato a un pH de 7,5 y (C) un tampón de  $\beta$ -glicerofosfato a un pH de 7,0.
- La fig. 4 muestra las curvas cinéticas para la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) a 500 mg/dl de glucosa en una muestra acuosa para diez sensores ilustrativos, basadas en FAD-GDH utilizando reactivos que incluían: (A1) un tampón PIPES operando a 42°C, (A2) un tampón de fosfato operando a 42°C, (B1) un tampón PIPES operando a 30°C, (B2) un tampón de fosfato operando a 30°C, (C1) un tampón PIPES operando a 24°C, (C2) un tampón de fosfato operando a 24°C, (D1) un tampón PIPES operando a 12°C, (D2) un tampón de fosfato operando a 12°C, (E1) un tampón PIPES operando a 6°C, (E2) un tampón de fosfato operando a 6°C.
- La fig. 5 muestra las curvas cinéticas para la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) a -200 mg/dl de glucosa en una muestra de sangre humana estabilizada para seis sensores ilustrativos, basadas en FAD-GDH utilizando reactivos que incluían: (F1) un tampón PIPES operando a 24°C, (F2) un tampón de fosfato operando a 24°C, (G1) un tampón PIPES operando a 18°C, (G2) un tampón de fosfato operando a 18°C, (H1) un tampón PIPES operando a 6°C, (H2) un tampón de fosfato operando a 6°C.
- La fig. 6 muestra una comparación entre los CV de las respuestas de DC de los viales para sensores ilustrativos que incluían un tampón PIPES (columnas negras) o un tampón de fosfato (columnas blancas).
- La fig. 7 muestra la respuesta elevada de estabilidad de la glucosa frente al tiempo de exposición de sensores ilustrativos basada en tiras de FAD-GDH que incluían un tampón PIPES (cuadrados) o un tampón de fosfato (rombos).
- En otra realización, se describe en la presente memoria una composición de reactivo. En un aspecto, la composición de reactivo puede utilizarse para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. La composición de reactivo comprende uno o más enzimas, tales como una o más glucosa deshidrogenasas, una o más glucosa oxidorreductasas, y combinaciones de los mismos, (b) uno o más cofactores, coenzimas o una combinación de los mismos para el enzima o enzimas, (c) uno o más mediadores, precursores de mediadores o una combinación de los mismos, y (d) uno o más tampones zwitteriónicos.
- En otra realización, el tampón zwitteriónico es un tampón de ácido aminoalcanoico. En otra realización, el tampón zwitteriónico es un tampón de ácido aminoalquilsulfónico. Entre los tampones zwitteriónicos ilustrativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), el ácido piperazín-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), el ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), el ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazín-etanosulfónico) (HEPES), la N-(tri(hidroximetil)metil)glicina (tricina), la N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (bicina), el ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), el ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), el ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES) y el ácido N-(hidroxietil)piperazín-N'-2-hidroxiopropanosulfónico (HEPPSO). En otra realización, el tampón zwitteriónico es PIPES. En otra realización, el tampón zwitteriónico es MOPS.
- Entre los cofactores y coenzimas ilustrativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, pirroloquinolín-quinona (PQQ), nicotín-adenina dinucleótido (NAD, tal como en la glucosa deshidrogenasa con nicotín-adenina dinucleótido (GDH-NAD), el dinucleótido flavín-adenina (FAD), tal como en la glucosa deshidrogenasa con flavín-adenina dinucleótido (FAD-GDH) y similares. Se apreciará que las formas de tipo salvaje (incluyendo las formas naturales) y las formas



Se indican mediadores y precursores de mediadores ilustrativos adicionales en las patentes US nº <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu>

5 [m.htm&r=1&f=G&l=50&s1=5,122,244.PN.&OS=PN/5,122,244&RS=PN/5,122,244](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu) -h0#h0<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu>

10 [m.htm&r=1&f=G&l=50&s1=5,122,244.PN.&OS=PN/5,122,244&RS=PN/5,122,244](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu) -h2#h27,163,616, y en el documento nº WO 98/35225. Los procedimientos para preparar mediadores indicados en la presente memoria también se indican en la

15 <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu> [m.htm&r=1&f=G&l=50&s1=5,122,244.PN.&OS=PN/5,122,244&RS=PN/5,122,244](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu) -h0#h0<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu> [m.htm&r=1&f=G&l=50&s1=5,122,244.PN.&OS=PN/5,122,244&RS=PN/5,122,244](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnu) -h2#h25,122,244.

20 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria incluyen uno o más tampones adicionales. Entre los tampones ilustrativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el ácido fosfórico, el ácido beta-glicerofosfórico, y similares, e incluyendo sales, hidratos y/o solvatos de los anteriormente indicados.

25 La composición de reactivo puede incluir además una diversidad de adyuvantes para incrementar las propiedades o características de los reactivos. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales complementarios para facilitar la aplicación de la composición de reactivo sobre la tira de ensayo y para mejorar su adherencia a la tira. La composición puede incluir además materiales que incrementen su tasa de hidratación y/o que incrementen su influencia sobre la acción capilar para llenar la cámara con la muestra de ensayo. Además, la composición de

30 reactivo puede incluir componentes seleccionados para potenciar las propiedades físicas de la composición de reactivo seca resultante y la incorporación de una muestra de ensayo líquida para el análisis. Entre los ejemplos de materiales adyuvantes para la utilización con la composición de reactivo se incluyen espesantes, moduladores de la viscosidad, formadores de película, estabilizadores, tampones, detergentes, agentes gelificantes, rellenos, agentes de apertura de película, agentes colorantes y agentes que proporcionan tixotropía. Los materiales o componentes

35 adyuvantes pueden impactar sobre la aplicación, reproducibilidad y propiedades físicas de la composición de reactivo.

40 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria incluyen uno o más agentes formadores de película y/o tixotrópicos, y/o dispersantes. Entre los agentes formadores de película y/o tixotrópicos y/o dispersantes ilustrativos se incluyen, aunque sin limitación, sílices, tales como Kieselsure Sipemate FK 320 DS de Degussa AG, polivinilpirrolidonas, dispersión de propionato de polivinilo y similares, e incluyendo sales, hidratos y/o solvatos de los anteriormente indicados.

45 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria incluyen uno o más moduladores de la viscosidad o agentes de ajuste de la viscosidad. Entre los agentes ilustrativos de ajuste de la viscosidad se incluyen, aunque sin limitación, polisacáridos, almidones y gomas, tales como pectina, goma guar, goma garrofín (semilla de algarrobo), goma konjac, goma xantano, alginatos y agar), caseína, gelatina y ficocoloides, celulosa y derivados semisintéticos de celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa), tales como gomas xantano, tales como Keltrol F. de CP Kelco US, Inc., carboximetilcelulosa, tales como Aqualon.RTM, CMC 7F PH de Hercules Inc., Aqualon Division, alcohol polivinílico y carboxi-vinilatos, bentonita, silicatos y sílice coloidal, y similares, e incluyendo sales, hidratos y/o solvatos de los

50 anteriormente indicados.

55 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria incluyen uno o más estabilizadores. Entre los estabilizadores ilustrativos se incluyen, aunque sin limitación, cloruro de calcio, sacáridos, tales como trehalosa, tales como dihidrato de D-(+)-trehalosa, de Sigma Chemical Co., ácidos grasos mono- o diinsaturados, ácidos policarboxílicos, tales como succinato sódico, y similares, e incluyendo sales, hidratos y/o solvatos de los anteriormente indicados.

60 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria incluyen uno o más detergentes y/o surfactantes. Entre los detergentes y/o surfactantes ilustrativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, jabones solubles en agua, así como compuestos activos en superficie sintéticos solubles en agua, tales como álcali, alcalino-térricos o sales amónicas sustituidos opcionalmente de ácidos grasos superiores, por ejemplo ácido oleico o esteárico, mezclas de ácidos grasos naturales, por ejemplo de aceite de coco o de sebo, sulfatos grasos, ésteres de ácidos sulfónicos, sales de ácidos alquilsulfónicos, sales de taurina de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos y esteramidas. Entre los detergentes ilustrativos para la presente invención se incluyen una esteramida, n-octanoil-N-

65

metilglucamida, comercializados bajo el nombre comercial Mega-8 de Dojindo Molecular Technologies, Inc., y una sal de ácido graso, sal sódica de N-metil-oleil-aurato, tal como Gerocon T77 de Rhodia HPCII (Home, Personal Care and Industrial Ingredients).

- 5 En otra realización, entre las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria se incluyen uno o más agentes de ajuste del pH. Entre los agentes ilustrativos de ajuste del pH se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ácidos tales como ácidos minerales, incluyendo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y similares; bases, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, bicarbonato sódico, carbonato sódico, carbonato potásico y similares.
- 10 Debe entenderse que todas las posibles combinaciones de cada una de las realizaciones anteriores se describen en la presente memoria aunque sin limitación. Por ejemplo, la descripción anteriormente proporcionada debe entenderse que incluye composiciones de reactivo ilustrativos que comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes y PIPES. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, PIPES, y uno o más mediadores o precursores de
- 15 mediadores, tales como una o más nitrosoanilinas, y similares. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, PIPES, y uno o más reactivos formadores de película, tales como uno o más copolímeros de acetato de polivinilo-propionato, dispersiones de propionato de polivinilo, polivinilpirrolidonas y similares. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, PIPES, y uno o más agentes
- 20 modificadores de la viscosidad, tales como uno o más derivados semisintéticos de celulosa, tales como hidroxietilcelulosa y similares. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, PIPES, y uno o más reactivos formadores de película, tales como uno o más copolímeros de acetato de polivinilo-propionato, dispersiones de propionato de polivinilo, polivinilpirrolidonas y similares, y uno o más agentes modificadores de la viscosidad, tales como uno o más
- 25 derivados semisintéticos de celulosa, tales como hidroxietilcelulosa y similares. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo los enzimas PQQ-GDH mutantes y MOPS. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, MOPS y uno o más mediadores o precursores de mediadores, tales como una o más nitrosoanilinas, y similares. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, MOPS y uno o más reactivos formadores de película, tales como uno o
- 30 más copolímeros de acetato de polivinilo-propionato, dispersiones de propionato de polivinilo, polivinilpirrolidonas y similares. Las composiciones ilustrativas adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, MOPS, y uno o más agentes modificadores de la viscosidad, tales como uno o más derivados semisintéticos de celulosa, tales como hidroxietilcelulosa y similares. Las composiciones ilustrativas
- 35 adicionales de reactivos comprenden enzimas PQQ-GDH, incluyendo enzimas PQQ-GDH mutantes, MOPS, y uno o más reactivos formadores de película, tales como uno o más copolímeros de acetato de polivinilo-propionato, dispersiones de propionato de polivinilo, polivinilpirrolidonas y similares, y uno o más agentes modificadores de la viscosidad, tales como uno o más derivados semisintéticos de celulosa, tales como hidroxietilcelulosa y similares. Los anteriormente indicados son ilustrativos de las combinaciones indicadas en la presente memoria.
- 40 Debe entenderse que uno o más de los aditivos específicos indicados en la presente memoria puede mostrar propiedades adicionales y en consecuencia puede clasificarse en una o más de las clases indicadas en la presente memoria.
- 45 Los reactivos indicados en la presente memoria se preparan y se incorporan en cualquiera de entre una amplia diversidad de sensores electroquímicos, tales como tiras de ensayo, utilizando métodos convencionales, incluyendo, tal como se indica en la solicitud publicada de patente US nº 2005/0016844.
- 50 En otra realización, se describen sensores electroquímicos para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. Entre los sensores electroquímicos se incluye una composición de reactivo indicada en la presente memoria.
- Los componentes ilustrativos adicionales que están opcionalmente incluidos en las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria se describen en la patente US nº 5.122.244.
- 55 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria se encuentran incluidas en un sensor electroquímico. Los sensores electroquímicos ilustrativos presentan la forma de tiras de ensayo desechables, tales como las tiras de ensayo indicadas en las patentes US nº 7.276.146 y nº 7.276.147, y en las solicitudes publicadas de patente US nº 2005/0016844, nº 2005/0013731 y nº 2005/0019212.
- 60 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria se encuentran incluidas en un sensor electroquímico. Entre los sensores electroquímicos ilustrativos se incluyen una cámara receptora de muestras para una muestra líquida y una composición de reactivo indicada en la presente memoria para producir una señal electroquímica en presencia de glucosa. En una variación, el sensor comprende una tira de ensayo desechable, tal como una tira de ensayo que presenta una construcción laminar que proporciona una abertura en el
- 65 borde que comunica con la cámara receptora de muestras. El reactivo se dispone dentro de la cámara receptora de

muestras en posición para proporcionar la señal electroquímica a un electrodo de trabajo también posicionado dentro de la cámara.

5 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria están incluidas en un sensor que se utiliza en combinación con un medidor para detectar y/o medir la glucosa en el líquido de muestra. En un aspecto, el medidor incluye una conexión con los electrodos del sensor y circuitos para evaluar la señal electroquímica correspondiente a la presencia y/o concentración de la glucosa. En variaciones opcionales, el medidor puede incluir además medios para determinar que el líquido de muestra ha sido recibido por el sensor y/o que la cantidad de líquido de muestra es suficiente para el ensayo. En otro aspecto, el medidor puede almacenar y mostrar los resultados del análisis, o alternativamente puede proporcionar los datos a un dispositivo separado.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sensor electroquímico" se refiere de manera general a un dispositivo configurado para detectar la presencia y/o medir la concentración de un analito mediante las reacciones electroquímicas de oxidación y reducción dentro del sensor. Dichas reacciones se transducen en una señal eléctrica que puede correlacionarse con la presencia y/o una cantidad o concentración del analito.

15 El sensor electroquímico puede presentar la forma de una tira de ensayo. La tira de ensayo incluye un sistema de electrodos que comprende un grupo de electrodos de medición, por ejemplo por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, dentro de una cámara receptora de muestras. La cámara receptora de muestras está configurada de manera que el líquido de muestra que entra en la cámara se ponga en contacto electrolítico tanto con el electrodo de trabajo como con el contraelectrodo. Lo anterior permite que fluya una corriente eléctrica entre los electrodos medidores, realizando la electrooxidación o electrorreducción del analito.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "electrodo de trabajo" es generalmente un electrodo en el que el analito se electrooxida o electrorreduce con o sin la intervención de un mediador redox. El término "contraelectrodo" se refiere de manera general a un electrodo que se empareja con el electrodo de trabajo y a través del cual pasa una corriente electroquímica igual en magnitud y de signo contrario a la corriente que pasa a través del electrodo de trabajo. El término "contraelectrodo" pretende incluir de manera general contraelectrodos que también funcionan como electrodos de referencia (es decir, contraelectrodos/electrodos de referencia).

25 El electrodo de trabajo y contraelectrodo, y las partes restantes del sistema de electrodos pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tal como es conocido de la técnica. Los electrodos deberían presentar una resistencia eléctrica relativamente baja y deberían ser electroquímicamente inertes en el intervalo operativo de la tira de ensayo. Entre los conductores adecuados para el electrodo de trabajo se incluyen oro, paladio, platino, carbono, titanio, dióxido de rutenio y óxido de indio-estaño, e iridio, así como otros. El contraelectrodo puede prepararse de los mismos materiales o de materiales diferentes, por ejemplo plata/cloruro de plata. En una realización ilustrativa, el electrodo de trabajo y contraelectrodo son ambos electrodos de oro.

30 Los electrodos pueden aplicarse al sustrato base de cualquier manera que rinda electrodos de conductividad e integridad adecuadas. Los procedimientos ejemplares son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la pulverización, la impresión, etc. En una realización ilustrativa, se proporcionan electrodos de oro mediante recubrimiento del sustrato base seguido de la eliminación selectiva de partes del recubrimiento para rendir el sistema de electrodos. Un método de eliminación ilustrativo es la ablación láser, incluyendo la ablación láser de campo ancho, tal como se da a conocer en la patente US nº 7.073.246, titulada "Method of Making a Biosensor" [Método de fabricación de un biosensor].

35 El sistema de electrodos puede presentar una diversidad de configuraciones adecuadas al funcionamiento de la tira de ensayo y el medidor. Para cualquier realización, el electrodo de trabajo y el contraelectrodo pueden posicionarse y dimensionarse para minimizar el volumen de líquido de muestra requerido para cubrirlos. También resulta preferible que los electrodos se configuren para mantener un flujo de corriente de suficiente magnitud para que resulte medible utilizando un medidor manual relativamente económico.

40 A título de ejemplo adicional, una realización ilustrativa incluye un contraelectrodo que se extiende en torno a ambos lados del electrodo de trabajo. Por lo tanto, el contraelectrodo presenta dos elementos, uno delante del electrodo de trabajo y el otro, detrás del electrodo de trabajo, ya que el líquido de muestra entra en la cámara receptora de muestras. Más concretamente, el contraelectrodo incluye dos elementos que se extienden a través de la cámara receptora de muestras. Cada uno de dichos elementos presenta una anchura de 250 µm. El elemento electrodo de trabajo presenta una anchura de aproximadamente 250 µm y se encuentra espaciado respecto a cada uno de los dos elementos contraelectrodos por aproximadamente 255 µm. Se apreciará que ésta es sólo una de varias configuraciones para los electrodos de medición.

45 En otra realización, el sensor electroquímico incluye trazos y contactos como parte del sistema de electrodos. Los trazos y las placas de contacto pueden proporcionarse de diversas maneras consistentes con su función deseada respecto a la tira de ensayo. Dichos componentes del sistema de electrodos pueden estar compuestos del mismo material que los electrodos y pueden aplicarse en el sustrato base de la misma manera y simultáneamente a la aplicación de los electrodos. En una realización ilustrativa, los trazos y placas de contacto son de oro y se forman

mediante ablación láser, particularmente tal como se indica en la patente US nº 7.073.246. Sin embargo, pueden utilizarse materiales y métodos de aplicación alternativos.

5 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria se encuentran incluidas en una tira de ensayo. En un aspecto, la tira de ensayo incluye varios componentes básicos, incluyendo, aunque sin limitación, un cuerpo pequeño que define una cámara en la que se recibe el líquido de muestra para el ensayo. La cámara receptora de muestra puede rellenarse con el líquido de muestra por medios adecuados, tales como mediante acción capilar, aunque también opcionalmente de manera asistida por presión o vacío. En otro aspecto, la cámara receptora de muestras incluye electrodos y una composición de reactivo indicada en la presente memoria  
10 adecuada para producir una señal electroquímica indicativa de glucosa en el líquido de muestra.

La tira de ensayo incluye un reactivo químico dentro de la cámara receptora de muestras para la reacción con el analito de ensayo para producir la señal electroquímica que representa la presencia del analito en el líquido de muestra. La composición de reactivo puede incluir una diversidad de componentes activos seleccionados para determinar la presencia y/o la concentración de diversos analitos. Por lo tanto, la química del ensayo se selecciona con respecto al analito que debe evaluarse. Tal como es bien conocido de la técnica, existen numerosas reacciones disponibles para la utilización con cada uno de los diversos analitos. Por ejemplo, en una realización preferente, la tira de ensayo de la presente invención puede incluir uno o más enzimas, coenzimas y cofactores, que pueden seleccionarse para determinar la presencia de glucosa en la sangre. Por lo tanto, la selección de una reacción apropiada se encuentra perfectamente dentro de los conocimientos del experto en la materia, y no se requiere una descripción adicional en la presente memoria que permita la preparación y utilización de las tiras de ensayo con diversos analitos.  
15

En otra realización, la tira de ensayo es un dispositivo relativamente pequeño que se dimensiona para ser compacto y fácil de almacenar y utilizar. A título ilustrativo, la longitud de la tira presenta una longitud comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 mm y una anchura de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 mm, o de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 mm. En otro aspecto, la tira de ensayo incluye una ranura o abertura de ventilación con el borde del medidor, que puede dimensionarse para proporcionar un área de asidero en el que no se encuentre presente líquido de muestra y/o para reducir o prevenir la presencia de contaminación con sangre del área de contacto del medidor. Las dimensiones ilustrativas de la ranura o abertura de ventilación puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 35 mm, o de por lo menos aproximadamente 13 mm. La longitud total de la parte de tira de ensayo es, a título ilustrativo, de aproximadamente 6,0 mm o inferior, a lo largo del eje largo de la tira de ensayo.  
25

En otro aspecto, la tira de ensayo es de construcción laminar y es relativamente delgada. A título ilustrativo, el grosor total de la tira de ensayo puede ser de entre aproximadamente 500 y aproximadamente 525  $\mu\text{m}$ . En otro aspecto, el grosor de la parte de tira de ensayo que se inserta en el contacto del medidor es inferior al grosor total, tal como de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ .  
30

En otra realización, la capa de reactivo presenta un grosor de entre aproximadamente 1 y 20 micrómetros. En otra realización, la capa de reactivo presenta un grosor de entre aproximadamente 2 y 6 micrómetros. En otra realización, la cámara presenta una altura de entre aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . En otra realización, la cámara presenta una altura de entre aproximadamente 120  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 180  $\mu\text{m}$ . En otra realización, la cámara presenta un volumen inferior a 1,0  $\mu\text{l}$ . En otra realización, la cámara presenta un volumen inferior a 0,5  $\mu\text{l}$ . En otra realización, la cámara presenta un volumen de entre aproximadamente 0,15  $\mu\text{l}$  y aproximadamente 1,4  $\mu\text{l}$ . En otra realización, la cámara presenta un volumen de entre aproximadamente 0,4  $\mu\text{l}$  y aproximadamente 0,7  $\mu\text{l}$ .  
35

En otra realización, la tira de ensayo incluye un sustrato base que comprende un material de aislamiento que soporta el sistema de electrodos y otros componentes. Entre los sustratos base ilustrativos se incluyen plásticos tales como polímeros de vinilo, poliimidas, poliésteres y estirenos que pueden proporcionar propiedades eléctricas y estructurales deseables. Entre los sustratos base ilustrativos se incluyen plásticos tales como un material polimérico flexible, incluyendo, aunque sin limitación, el poliéster, tal como materiales de poliéster de alta temperatura, naftalato de polietileno (PEN) y poliimida, o mezclas de dos o más de los anteriormente indicados. Se encuentran disponibles comercialmente poliimidas adecuados por ejemplo bajo el nombre comercial Kapton, Melinex 329, de E.I. duPont de Nemours and Company, de Wilmington, Del. (duPont), y similares.  
40

La composición de reactivo puede depositarse sobre la superficie de la tira de ensayo utilizando una diversidad de métodos de recubrimiento convencionales, incluyendo las técnicas de recubrimiento por cortina, el recubrimiento de fundido en caliente, el recubrimiento de pantalla giratoria, cuchilla 'Doctor Blade' o recubrimiento por cuchilla al aire, recubrimiento con barra de Meyer y recubrimiento de rodillo inverso. A título ilustrativo, la composición de reactivo se aplica a la malla mediante un procedimiento de recubrimiento con boquilla ranurada. La composición de reactivo puede depositarse sobre la malla flexible en forma de una composición húmeda de un grosor de entre aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . Alternativamente, la composición de reactivo puede depositarse en forma de una composición húmeda de un grosor de entre aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ . La composición puede aplicarse en forma de una capa uniformemente delgada de un reactivo directamente sobre los electrodos de medición y a lo largo de una longitud de una malla de múltiples tiras de  
45

5 ensayo, en forma de una banda estrecha continua. En otra realización, la banda estrecha presenta una anchura de entre aproximadamente 7 mm y 8 mm y un grosor en seco de entre aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . La composición puede aplicarse además sobre otros electrodos que pueden residir en la cámara receptora de muestras, dependiendo de la funcionalidad deseada de dichos electrodos externos. En otra realización, se fabricaron tiras de ensayo utilizando un procedimiento rodillo a rodillo.

10 En otra realización, se describen tiras de ensayo que presentan una cámara receptora de muestras pequeña de menos de 1 microlitro o de menos de 0,5 microlitros. La cámara receptora de muestras incluye una capa de reactivos uniforme que evita efectos de borde y de menisco no deseables.

15 En otra realización, se describen tiras de ensayo que presentan extremos de inserción de medidor y de receptor de muestras, primer y segundos lados, y un eje longitudinal central que se encuentra orientado de manera sustancialmente paralela a los dos lados. En otra realización, la tira de ensayo define una dirección de baja desde el extremo receptor de muestras hasta el extremo de inserción de medidor. En otra realización, la tira de ensayo incluye un sustrato base que presenta un electrodo formado sobre el mismo. Una capa espaciadora se encuentra sobre el sustrato base y presenta un hueco o cavidad que define por lo menos parcialmente la cámara receptora de muestras. En otra realización, la capa de reactivos se encuentra dispuesta en la cámara receptora de muestras y cubre una parte del sustrato base y el electrodo. En otra realización, la capa de reactivos se encuentra interpuesta entre la capa espaciadora y el sustrato base y se extiende hasta el primer y segundo lados del sustrato base y se extiende además hasta el extremo receptor de muestras de la tira de ensayo.

20 En otra realización, la cámara receptora de muestras define un canal alineado con el eje longitudinal y presenta una abertura receptora de muestras dispuesta en el extremo receptor de muestras. En otra realización, la capa de reactivos se extiende a la abertura receptora de muestras. Se aprecia que esta disposición puede garantizar que una capa de reactivos uniforme y lisa recubre la mayor parte o la totalidad del suelo de la cámara receptora de muestras, evitando de esta manera discontinuidades del borde, efectos de menisco y otras heterogeneidades en la capa de reactivos.

25 En otra realización, la tira de ensayo incluye una capa de cubierta sobre la capa espaciadora. A título ilustrativo, la capa de cubierta incluye una abertura de ventilación que comunica con la cámara receptora de muestras, permitiendo de esta manera la salida de aire de la cámara a medida que entra líquido en la misma. En otra realización, la capa de reactivos se extiende en dirección hacia abajo hasta la abertura de ventilación, incluso ligeramente después de ella. Se apreciará que el líquido de muestra entra en la cámara receptora de muestras por acción capilar, forma una capa uniforme y delgada de reactivos hasta que se detiene en la abertura de ventilación, que se proporciona en forma de ranura siendo un lado de la misma hidrofóbico, deteniendo eficazmente de esta manera el movimiento de la muestra más allá de la misma.

30 En otra realización, los electrodos sobre el sustrato base incluyen un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, ambos cubiertos con la capa de reactivos. A título ilustrativo, la capa de reactivos se extiende en dirección de flujo más allá de los electrodos.

35 En otra realización, la capa de reactivos define primer y segundo bordes laterales de la capa de reactivos que se alinean sustancialmente con el primer y segundo lados de la tira de ensayo. A título ilustrativo, la capa de reactivos forma además un borde terminal de la capa de reactivos que está alineada con el extremo receptor de muestras de la tira de ensayo. En otra realización, los bordes de la capa de reactivos se forman como parte del procedimiento de troquelado que forma las tiras de ensayo individuales a partir de una malla de mayor tamaño, proporcionando un borde liso y uniforme que evita efectos de borde no deseables.

40 En otra realización, la tira de ensayo incluye una capa adhesiva interpuesta entre la capa espaciadora y el sustrato base. A título ilustrativo, se forma la capa adhesiva con un perfil del borde que está alineado con el borde periférico de la cámara receptora de muestras. En otra realización, el adhesivo forma un sello en torno a la periferia de la cámara receptora de muestras, evitando de esta manera que el líquido de muestra se disperse lateralmente fuera de la cámara y se extienda bajo la capa espaciadora.

45 En otra realización, la capa de reactivos no sólo puede hacerse muy delgada sino también mostrar una homogeneidad elevada en toda la malla del área de reacción. A título ilustrativo, la capa de reactivos en el área de ensayo o cámara receptora de muestras es plana y de grosor uniforme. Debe entenderse que pueden producirse variaciones del grosor en la tira recubierta, aunque se encuentran limitadas a título ilustrativo a los bordes externos de 0,2 cm (o menos) de la tira.

50 En otra realización, la tira de ensayo incluye una capa de cubierta que presenta una ranura. A título ilustrativo, la ranura divide la capa de cubierta en dos partes y proporciona una abertura de ventilación que permita la salida de aire de la cavidad o cámara receptora de muestras formada en la tira de ensayo a medida que entra líquido. En otra realización, la capa de cubierta es transparente, de manera que el usuario pueda ver a su través y la ranura sirve además como línea de llenado. De esta manera, el usuario puede observar cómo entra el líquido de muestra en la tira de ensayo, progresa por la cavidad capilar y después se detiene en la ranura o línea de llenado. Lo anterior

proporciona una confirmación positiva para el usuario de que el tamaño de muestra es suficiente y que la tira de ensayo se ha llenado correctamente.

5 En otra realización, la tira de ensayo incluye un cámara receptora de muestras que presenta una parte acampanada que termina en una abertura receptora de muestras. A título ilustrativo, la parte acampanada proporciona un reservorio del que puede llevarse líquido de muestra hasta el interior del capilar o cámara receptora de muestras, que ayuda al usuario a introducir la muestra en el dispositivo de ensayo y reduce las pausas en la dosificación. En otras realizaciones, la capa hidrofílica de reactivos se extiende hasta el extremo de dosificación o lado de la tira de ensayo y estimula además la dispersión de la muestra hasta el interior de la cámara receptora de muestras y reduce  
10 adicionalmente de esta manera las pausas en la dosificación.

Las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria pueden aplicarse a título ilustrativo en la superficie de la tira de ensayo utilizando un procedimiento descrito en la patente US nº 7.749.437.

15 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria pueden incluirse dentro o sobre un sensor electroquímico para la detección y/o la medición de la glucosa en una muestra. A título ilustrativo, la muestra puede ser una muestra acuosa, una muestra de sangre y similares. A título ilustrativo, el sensor electroquímico incluye un electrodo, tal como, aunque sin limitación, un electrodo descrito en las patentes US nº 6.662.439 y nº 7.073.246.

20 En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria pueden incluirse dentro o sobre, o utilizarse conjuntamente con un dispositivo para la detección y/o la medición de la glucosa en una muestra. A título ilustrativo, la muestra puede ser una muestra acuosa, una muestra de sangre y similares. A título ilustrativo, el dispositivo puede incluir algoritmos y métodos para el procesamiento de una señal generada directamente o indirectamente por la composición de reactivo, tales como, aunque sin limitación, los métodos y algoritmos descritos en las patentes US nº 6.645.368, nº 7.407.811, nº 7.488.601, nº 7.452.457, nº 7.597.793, nº 7.494.816 y nº 7.569.126.

30 En otra realización, se describen métodos para detectar y/o medir la glucosa en una muestra. Los métodos incluyen la etapa de poner en contacto una muestra que contiene glucosa con una composición de reactivo descrita en la presente memoria. Debe entenderse que la composición de reactivo puede configurarse en cualquiera de entre una diversidad de formatos, incluyendo los formatos indicados en la presente memoria, tales como una composición de reactivo seca sobre una tira de ensayo. En otra realización, las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria se incluyen en un sistema que resulta útil para evaluar la glucosa en un líquido de muestra. El sistema  
35 incluye dispositivos y métodos para evaluar el líquido de muestra para la glucosa. Tal como se indica en mayor detalle posteriormente, la evaluación puede ir desde la detección de la presencia de la glucosa hasta la determinación de la concentración de la misma. En otra realización, la muestra es un líquido biológico, tal como sangre o líquido intersticial.

40 En referencia a la muestra de ensayo, a título ilustrativo la mayoría de la cámara es hueca antes de ser utilizada. En la cámara para muestras, de tamaño muy pequeño, de las tiras de ensayo descritas en la presente memoria, la capa de reactivos es, a título ilustrativo, delgada y uniforme. Debido a que la cámara receptora de muestras es muy pequeña, de capacidad inferior a aproximadamente 1 µl, la profundidad o altura vertical de la cámara también es muy pequeña. En consecuencia, la capa de reactivos puede no ocupar la mayor parte de la cavidad interna de la cámara. La capa de reactivos puede ser suficientemente delgada para dejar un espacio amplio para la muestra de ensayo en la cámara. Además, la muestra de ensayo líquida hidratará o disolverá la capa delgada de reactivos más rápidamente. A título ilustrativo, el mediador, o precursor de mediador, y los productos redox del mediador se difunden a través de la capa/gradiente de reactivos y en el interior de la misma hasta los electrodos. Los componentes reactivos e intermediarios presentarán una distancia corta de difusión a través de una capa delgada de reactivos; por lo tanto, la difusión hasta los electrodos se producirá en menos tiempo. Además, la eficiencia de captura de los productos redox mediadores en un electrodo será mayor para una capa delgada de enzima que para una capa gruesa. A la inversa, una capa de reactivos gruesa requerirá más tiempo para que la muestra de ensayo líquida se hidrate o se disuelva, y una capa de reactivos gruesa incrementará el tiempo que se requiere para que el mediador/productos redox mediadores alcancen los electrodos. Este tiempo incrementado debe de retrasar el  
50 tiempo de determinación de la concentración del analito e introducirá errores en la determinación.

Se aprecia en la presente memoria que las heterogeneidades de grosor pueden conducir a variabilidad en la determinación de la concentración del analito. En otra realización, la capa de reactivos presenta un grosor uniforme en toda la cámara receptora de muestras. A título ilustrativo, la capa de reactivos no es más gruesa en el perímetro de la cámara receptora de muestras contiguo a las paredes laterales verticales que definen la cámara que en la parte central de la cámara. En consecuencia, la capa de reactivos no muestra un perfil de menisco.

60 En otra realización, la composición de reactivo se formula como solución viscosa que puede depositarse como una capa uniforme delgada sobre la capa base. A título ilustrativo, la composición de reactivo incluye espesantes y agentes tixotrópicos que potencian las propiedades físicas de la capa de reactivos. Los espesantes se seleccionan para proporcionar una matriz líquida espesa que presenta los componentes restantes dispersados homogéneamente

en la misma. Los agentes espesantes y tixotrópicos inhiben además que el material líquido o semipastoso se deslice o se extienda sobre la superficie de la capa base después de depositarlo y antes de que se seque. Tras depositar la composición de reactivo, se seca rápidamente hasta formar una matriz fácilmente hidratable.

- 5 La composición de reactivo ventajosamente se seca con rapidez secando al aire o por calor. Tras el secado, la capa de reactivos depositada a título ilustrativo muestra un grosor de entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 20 micrómetros. En otra realización, la capa de reactivos seca muestra un grosor de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 6 micrómetros.

## 10 Ejemplos

Preparación de composiciones de reactivo. Los componentes de la composición de reactivo a título ilustrativo se mezclaron con agua, proporcionando una suspensión viscosa homogénea. El orden de adición no es esencial. Se añadió una cantidad suficiente de la solución tampón para mantener la composición de reactivo al pH deseado, tal como un pH de aproximadamente 7. A título ilustrativo, los componentes seleccionados se premezclaron con agua, proporcionando una diversidad de soluciones madre que podían combinarse para rendir la composición de reactivo final. Por ejemplo, puede prepararse una solución tampón mediante la combinación de las sales fosfato y, opcionalmente, el succinato sódico. Entre otras soluciones madre se incluyen: agentes espesantes, es decir KeltrolF y carboximetilcelulosa; surfactantes, es decir Geropon T77 y Mega 8; el enzima y el coenzima o cofactor, y el mediador.

En referencia a la fig. 1, se muestra el rendimiento cinético del enzima PQQ-GDH utilizado en el reactivo en el caso de que los tampones sean PIPES,  $\beta$ -glicerofosfato y fosfato. Las tiras de ensayo fabricadas utilizando las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria recibieron una solución acuosa de control que contenía aproximadamente 500 mg/dl de glucosa. Se aplicó un potencial de 450 mV a los electrodos de la tira. Tal como se muestra en la fig. 1, se realizó un seguimiento durante el tiempo de la respuesta de DC. En particular, se registró para cada tira de ensayo el tiempo requerido para que la respuesta alcanzase el máximo. El tiempo requerido para que la respuesta de DC alcanzase el máximo es indicativo de la cinética de la reacción enzimática de la glucosa. En el caso de que el tiempo requerido para que la respuesta de DC alcance su máximo sea corto, la cinética puede describirse como rápida. A la inversa, en el caso de que el tiempo requerido para que la respuesta de DC alcance su máximo sea largo, la cinética puede describirse como lenta. Tal como puede observarse en la fig. 1, en referencia específicamente al trazo A, la tira de ensayo con un reactivo a base de PIPES alcanzó el máximo del pico de DC aproximadamente tras 2.300 ms. En referencia a los trazos B y C, las tiras de ensayo con un reactivo a base de tampón de fosfato o un tampón de  $\beta$ -glicerofosfato alcanzan los máximos de pico de DC aproximadamente tras 4.000 ms.

Se llevaron a cabo estudios acelerados de estabilidad para evaluar la diferencia de estabilidad entre un enzima PQQ-GDH en combinación con un tampón PIPES ejemplar y un enzima PQQ-GDH en combinación con un tampón fosfato comparativo. Se almacenaron durante cuatro semanas tiras de ensayo fabricadas con las composiciones de reactivo ejemplares y comparativas, una se almacenó a 4°C y la otra, a 45°C. A continuación las tiras se sometieron a ensayo utilizando soluciones de linealidad con niveles diana de glucosa de 45 mg/dl (LIN 2), 307 mg/dl (LIN 4) y 559 mg/dl (LIN 6). Se determinó la respuesta media de DC de las tiras mantenidas a 45°C para cada nivel de glucosa y esta respuesta seguidamente se comparó con la respuesta de DC de las tiras mantenidas a 4°C. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 1, posteriormente. Las tiras de ensayo que contenían un reactivo, incluyendo un tampón PIPES, mostraban una estabilidad incrementada en comparación con tanto el reactivo que incluía el tampón  $\beta$ -glicerofosfato como el reactivo que incluía el tampón fosfato. Concretamente, para niveles de glucosa bajos (45 mg/dl, LIN 2), la diferencia de sesgo entre las tiras almacenadas a 4°C y las tiras almacenadas a 45°C era 12% más baja que las tiras con el reactivo con tampón  $\beta$ -glicerofosfato y 18% más baja que las tiras con el reactivo con tampón fosfato. Para niveles de glucosa intermedios (307 mg/dl, LIN 4), la diferencia de sesgo entre las tiras almacenadas a 4°C y las tiras almacenadas a 45°C era 8% más baja que las tiras con el reactivo con tampón  $\beta$ -glicerofosfato y 23% más baja que las tiras con el reactivo con tampón fosfato. Para niveles de glucosa elevados (559 mg/dl, LIN 6), la diferencia de sesgo entre las tiras almacenadas a 4°C y las tiras almacenadas a 45°C era 7% más baja que las tiras con el reactivo con tampón  $\beta$ -glicerofosfato y 21% más baja que las tiras con el reactivo con tampón fosfato. Estos datos indican que el tampón PIPES ayuda a estabilizar el enzima, permitiendo que sea menos susceptible a la degradación durante periodos prolongados de tiempo a temperaturas altas.

Tabla 1. Respuesta de estabilidad de tiras de enzima PQQ-GDH que contienen diversos tampones

Tampón	Glucosa diana (mg/dl)	Temperatura	Punto temporal (semanas)	% de sesgo medio a 4°C
PIPES	45	45°C	4	-3,39
	307	45°C	4	-10,81
	559	45°C	4	-9,74
Fosfato	45	45°C	4	-21,47
	307	45°C	4	-33,53

	559	45°C	4	-30,83
β-glicerofosfato	45	45°C	4	-15,72
	307	45°C	4	-18,64
	559	45°C	4	-16,26

5 Sin respaldo teórico, se cree en la presente memoria que la respuesta de DC influye directamente en el rendimiento de la tira, en la que los sesgos más pequeños son indicativos de tiras de ensayo más precisas y exactas. La Tabla 1 muestra que el sesgo de DC que resultaba de las tiras de ensayo que presentaban los reactivos comparativos y  
 10 ejemplares perturbadas a 45°C durante cuatro semanas en comparación con la DC de tiras que habían sido almacenadas a 4°C durante cuatro semanas. Cuanto más se degrada la respuesta de DC, se observa un sesgo más negativo con la respuesta de fondo. El sesgo negativo en términos de DC habitualmente está asociado a la degradación del enzima. La Tabla 1 muestra que el reactivo que contiene tampón PIPES muestra un sesgo de DC menos negativo, indicando que el enzima es más estable al mantenerlo a dicha temperatura elevada durante  
 15 periodos de tiempo prolongados en presencia de las composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria. Los sesgos observados con tampón fosfato y tampón β-glicerofosfato son más negativos, indicando que el enzima es menos estable en dichos tampones. Los valores en la Tabla 1 también pueden expresarse como diferencia de sesgos (12%, 8% y 6,5%) correspondiente a las mejoras de sesgo que proporcionan los tampones zwitteriónicos, tales como PIPES, respecto al β-glicerofosfato. Por ejemplo, con 45 mg/dl de glucosa, el sesgo de DC con PIPES es de -3,39%, mientras que el sesgo es de -15,72% con β-glicerofosfato. Lo anterior es una diferencia de ~12%. A 307 mg/dl, el sesgo era de -10,81% vs. -18,64%, para una diferencia de ~8%, etc. Se observaron mejoras de rendimiento similares en tiras de ensayo que contenían FAD-GDH y tampones zwitteriónicos, tales como PIPES, en comparación con tampones no zwitteriónicos.

20 La Tabla 2 muestra datos análogos los recogidos e indicados en la Tabla 1, excepto en que se comparan tiras de ensayo que incluían el tampón MOPS con tiras de ensayo que incluían tampones de β-glicerofosfato (B-GPO4) a dos valores de pH diferentes. Las observadas realizadas en la presente memoria con respecto a la estabilidad del enzima incluido en la tira de ensayo con el tampón PIPES son cualitativamente iguales a las observadas para las tiras de ensayo que incluían el tampón MOPS. Dicha observación indica que el enzima es más estable en las tiras de ensayo que incluyen un tampón MOPS. Para evaluar el impacto de los diferentes valores de pH del tampón β-glicerofosfato convencional y el tampón MOPS, se preparó un grupo de tiras de ensayo con un tampón β-glicerofosfato a pH=7,5 y se sometió a ensayo concurrentemente con el tampón MOPS y un tampón de β-glicerofosfato, a pH=7,0.

30 Tabla 2. Respuesta de estabilidad de tiras de enzima PQQ-GDH que contienen diversos tampones

Tampón	Glucosa diana (mg/dl)	Temperatura	Punto temporal (semanas)	% de sesgo medio a 4°C
pH=7,0 B-GP04	45	45°C	4	-11,01
	307	45°C	4	-13,75
	559	45°C	4	-14,16
pH = 7,5 B-GP04	45	45°C	4	-9,46
	307	45°C	4	-13,95
	559	45°C	4	-14,36
pH = 7,5 MOPS	45	45°C	4	3,26
	307	45°C	4	-2,81
	559	45°C	4	-3,15

35 En referencia a la fig. 2, los trazos A y B muestran el rendimiento cinético de dos reactivos ejemplares que utilizan el enzima FAD-GDH en una tira de ensayo con composiciones de reactivo indicadas en la presente memoria. La fig. 2 muestra las curvas cinéticas de la respuesta de DC (μA) frente al tiempo (ms) para dos sensores equivalentes basados en FAD-GDH utilizando reactivos que incluían un tampón PIPES (A) y un tampón fosfato (B). De manera similar, la fig. 3 muestra las curvas cinéticas de la respuesta de DC (μA) frente al tiempo (ms) para tres sensores equivalentes utilizando reactivos que incluían (A) un tampón MOPS a un pH de 7,5, (B) un tampón de β-glicerofosfato a un pH de 7,5 y (C) un tampón de β-glicerofosfato a un pH de 7,0. Tal como se indica en la presente memoria en la fig. 1 con respecto al enzima PQQ-GDH, las tiras utilizadas para generar las figs. 2 y 3 recibieron una  
 40 solución de control que contenía aproximadamente 500 mg/dl de glucosa y se realizó un seguimiento de la corriente de DC durante el tiempo. Para las tiras con tampón PIPES, la corriente de DC alcanzó un valor máximo a los 1,43 segundos, en comparación 1,72 segundos las tiras con fosfato como tampón, tal como se muestra en la fig. 2. La reducción de tiempo hasta la corriente máxima indica que la reacción del enzima con la glucosa se incrementa y/o se conserva utilizando tampones zwitteriónicos tales como el tampón PIPES y/o el tampón MOPS, tal como se muestra en la fig. 3.

45 En referencia a la fig. 4, se muestran las curvas cinéticas de respuesta a la glucosa de las tiras de ensayo con enzima FAD-GDH comparando las tiras que incluían tampón PIPES y tampón fosfato. Concretamente la fig. 4

muestra las curvas cinéticas para la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) para diez sensores de otro modo equivalentes basados en FAD-GDH utilizando reactivos que incluían un tampón PIPES operando a  $42^\circ\text{C}$  (A1), un tampón de fosfato operando a  $42^\circ\text{C}$  (A2), un tampón PIPES operando a  $30^\circ\text{C}$  (B1), un tampón fosfato operando a  $30^\circ\text{C}$  (B2), un tampón PIPES operando a  $24^\circ\text{C}$  (C1), un tampón de fosfato operando a  $24^\circ\text{C}$  (C2), un tampón PIPES operando a  $12^\circ\text{C}$  (D1), un tampón de fosfato operando a  $12^\circ\text{C}$  (D2), un tampón PIPES operando a  $6^\circ\text{C}$  (E1) y un tampón de fosfato operando a  $6^\circ\text{C}$  (E2), mostrando una respuesta de  $\sim 500$  mg/dl de glucosa en una muestra acuosa. Las tiras que incluían un tampón PIPES mostraban una cinética de reacción incrementada a temperatura baja y alta en comparación con las tiras con tampón de fosfato. El incremento de la cinética de reacción se observó utilizando tanto una solución acuosa de control con una concentración de glucosa de aproximadamente 500 mg/dl (fig. 4) como una solución de control de sangre humana estabilizada con una concentración de glucosa de aproximadamente 200 mg/dl (fig. 5). Sin respaldo teórico se cree en la presente memoria que al permitir que la respuesta de DC se establezca más rápidamente a temperaturas bajas, se incrementa la precisión y el rango de temperaturas de las tiras de ensayo que incluyen un reactivo que incluye un tampón zwitteriónico, tal como tampón PIPES, y FAD-GDH.

En referencia a la fig. 5, se muestran las curvas cinéticas para la respuesta de DC ( $\mu\text{A}$ ) frente al tiempo (ms) para seis sensores de otro modo equivalentes basados en FAD-GDH utilizando reactivos que incluían: un tampón PIPES operando a  $24^\circ\text{C}$  (F2), un tampón PIPES operando a  $24^\circ\text{C}$  (G1), un tampón de fosfato operando a  $18^\circ\text{C}$  (G2), un tampón PIPES operando a  $6^\circ\text{C}$  (H1) y un tampón de fosfato operando a  $6^\circ\text{C}$  (H2), mostrando una respuesta de  $\sim 200$  mg/dl de glucosa en una muestra de sangre humana estabilizada. Tal como se muestra en la fig. 4, se observa un incremento de la cinética de reacción. Sin respaldo teórico se cree en la presente memoria que al permitir que la respuesta de DC se establezca más rápidamente a temperaturas bajas, se incrementa la precisión y el rango de temperaturas de las tiras de ensayo que incluyen un reactivo que incluye un tampón zwitteriónico, tal como tampón PIPES, y FAD-GDH.

La fig. 6 muestra un histograma del CV de la respuesta de DC de los viales. Se muestra una comparación de la precisión de las tiras de ensayo que incluían un tampón zwitteriónico (columnas negras) y un tampón fosfato (columnas blancas). Los datos indican que la precisión de la respuesta de DC se mejora al utilizar un tampón PIPES en comparación con un tampón de fosfato. Se muestrearon los viales uniformemente en un rodillo recubierto y se sometieron a ensayo ocho tiras por vial con una solución de control que contenía aproximadamente 500 mg/dl de glucosa en una matriz acuosa. El histograma muestra el número de viales (frecuencia) en el eje y que presentan un intervalo coeficiente de variación dado de la respuesta de DC, mostrado en el eje x. El CV de la respuesta de DC es el coeficiente de variación de la respuesta de DC de las ocho tiras de ensayo en un vial. Se prepararon tiras de ensayo siguiendo los procedimientos descritos en la presente memoria y utilizando procedimientos convencionales, excepto en que se preparó un grupo de viales con un tampón de fosfato y un grupo de viales se preparó con un tampón PIPES. Se calculó el CV de la respuesta de DC para cada vial. La mediana de CV de la respuesta de DC de cada vial para las tiras de ensayo con un tampón PIPES fue de 1,7%, mientras que las tiras de ensayo con tampón fosfato presentaron una mediana de 2,1%. También se redujo la extensión de los valores de CV mediante la utilización de tampón PIPES, siendo los valores de CV máximo/CV mínimo de 4,2%/0,79% y de 6,3%/0,82% para las tiras de ensayo con tampón PIPES y las tiras de ensayo con tampón de fosfato, respectivamente.

La fig. 7 muestra una respuesta de elevada estabilidad de la glucosa de las tiras de FAD-GDH que contenían PIPES (cuadrados) y tampón fosfato (rombos). Se prepararon tiras de ensayo utilizando un tampón PIPES ejemplar y se prepararon otras tiras de ensayo utilizando un tampón de fosfato comparativo, ambos utilizando un enzima FAD-GDH. Brevemente, las tiras de ensayo con tampón PIPES mostraban una mejor estabilidad del enzima a temperaturas elevadas. Se evaluó la estabilidad del enzima de las tiras de ensayo, incluyendo el enzima FAD-GDH, bajo temperaturas elevadas durante periodos de tiempo prolongados en viales cerrados. Pueden utilizarse soluciones de control con una concentración elevada de glucosa con FAD-GDH con el fin de evaluar la estabilidad del enzima debido a que no se produce inhibición del enzima por parte de la glucosa a niveles elevados. La estabilidad del mediador resultaba aceptable bajo dichas condiciones; por lo tanto, se cree que la reducción de la respuesta de DC se debe a una reducción de la actividad enzimática causada por la degradación térmica de FAD-GDH. Se llevó a cabo el seguimiento del sesgo de la respuesta de DC al añadir a las tiras de ensayo una solución de control con elevada concentración de glucosa a  $45^\circ\text{C}$  vs. a  $4^\circ\text{C}$ . Las tiras de ensayo preparadas utilizando tampón de fosfato pudieron mantener la respuesta de DC con alta concentración de glucosa al almacenarlas a  $45^\circ\text{C}$  durante hasta 16 semanas; sin embargo, tras 16 semanas a  $45^\circ\text{C}$ , la respuesta se redujo significativamente. Las tiras de ensayo preparadas con tampón zwitteriónico, tal como tampón PIPES, pudieron mantener la respuesta de dosis elevada de glucosa con pocas reducciones tras el almacenamiento a  $45^\circ\text{C}$  durante la duración del estudio, indicando que la inclusión de tampón PIPES estabilizaba el enzima FAD-GDH en la composición de reactivo.

Aunque en la presente memoria se han dado a conocer realizaciones ilustrativas y ejemplares que incorporan los principios de la presente invención, debe entenderse que la invención descrita en la presente memoria no se encuentra limitada a las realizaciones dadas a conocer. Por el contrario, la presente solicitud pretende cubrir dichas realizaciones adicionales de la invención que se encuentran comprendidas dentro de la práctica conocida o habitual de la técnica a la que se refiere la presente invención y que se encuentran comprendidas dentro de los límites según las reivindicaciones, o equivalentes de las mismas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de reactivo seca que comprende (a) uno o más enzimas seleccionados de entre el grupo que consiste de glucosa deshidrogenasas (GDH), glucosa oxidorreductasas, y combinaciones de los mismos, (b) uno o más cofactores, coenzimas o una combinación de los mismos para el enzima o enzimas, (c) uno o más mediadores, precursores de mediadores o una combinación de los mismos, (d) uno o más tampones zwitteriónicos, y (e) opcionalmente uno o más adyuvantes.
- 10 2. Composición de reactivo según la reivindicación 1, en la que el enzima es una GDH de tipo salvaje o una GDH mutante.
- 15 3. Composición de reactivo según la reivindicación 1 o 2, en la que el enzima es una GDH y el coenzima es un FAD o una PQQ.
- 20 4. Composición de reactivo según la reivindicación 1, 2 o 3, en la que el enzima es una GDH mutante que muestra insensibilidad a la maltosa y/o que muestra estabilidad térmica.
- 25 5. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el tampón zwitteriónico es PIPES o MOPS.
- 30 6. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende un precursor de mediador, preferentemente en la que el precursor de mediador es una nitrosoanilina.
- 35 7. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el adyuvante o adyuvantes se seleccionan de entre el grupo que consiste de tampones adicionales, estabilizadores, agentes de ajuste de la viscosidad, agentes formadores de película, agentes tixotrópicos, dispersantes, surfactantes, detergentes, agentes de ajuste del pH y combinaciones de los mismos.
- 40 8. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que por lo menos un adyuvante es un formador de película, preferentemente en la que el formador de película es un copolímero de acetato de polivinilo-propionato, dispersiones de propionato de polivinilo o polivinilpirrolidona, o una combinación de los mismos.
- 45 9. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que por lo menos un adyuvante es un modulador de la viscosidad, preferentemente en la que el modulador de viscosidad es una hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, o goma xantano, o una combinación de los mismos.
- 50 10. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que por lo menos un adyuvante es un dispersante, preferentemente el dispersante es un sílice.
- 55 11. Composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que por lo menos un adyuvante es un tampón adicional, preferentemente en el que el tampón adicional es un beta-glicerofosfato.
- 60 12. Sensor electroquímico que comprende la composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un electrodo.
13. Tira de ensayo que comprende una cámara, la composición de reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y un electrodo, en el que la composición de reactivo y el electrodo están situados en la cámara, preferentemente en la que la cámara está formada de un sustrato base y una capa de cubierta sobre el sustrato base, y en el que la cámara está dispuesta entre el sustrato base y la capa de cubierta, y/o preferentemente en la que la cámara incluye una parte acampanada que termina en una abertura receptora de líquido y una parte alargada que se extiende hacia el interior desde la parte acampanada.
14. Tira de ensayo según la reivindicación 13, que comprende además una abertura de ventilación en comunicación con la cámara, de manera que el aire puede salir de la abertura a medida que entra líquido en la cámara.
15. Tira de ensayo según la reivindicación 13 o 14, en la que la cámara presenta un volumen inferior o igual a 1,0 ml, preferentemente en la que la cámara presenta un volumen inferior o igual a 0,5 µl.

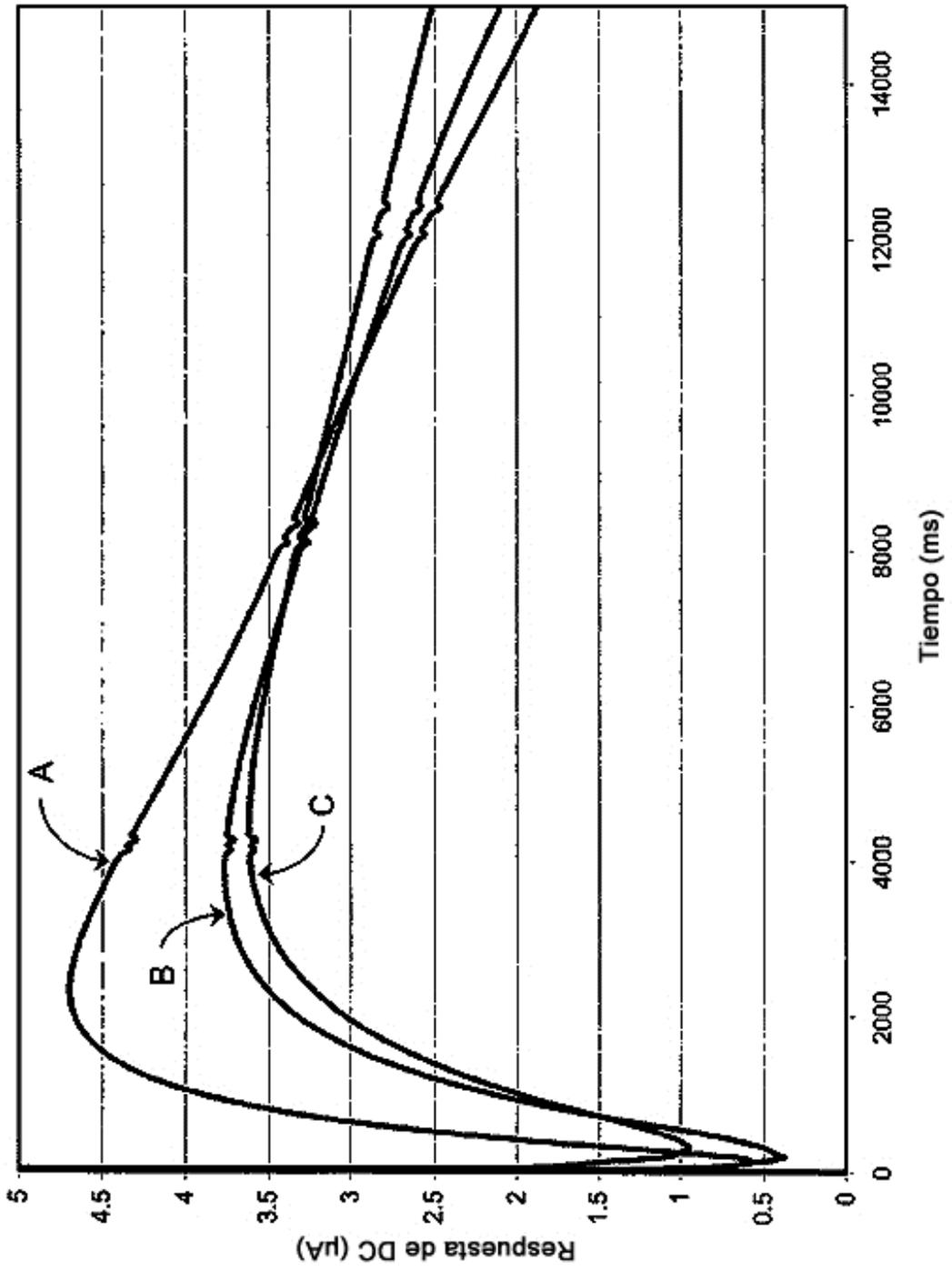


Fig. 1

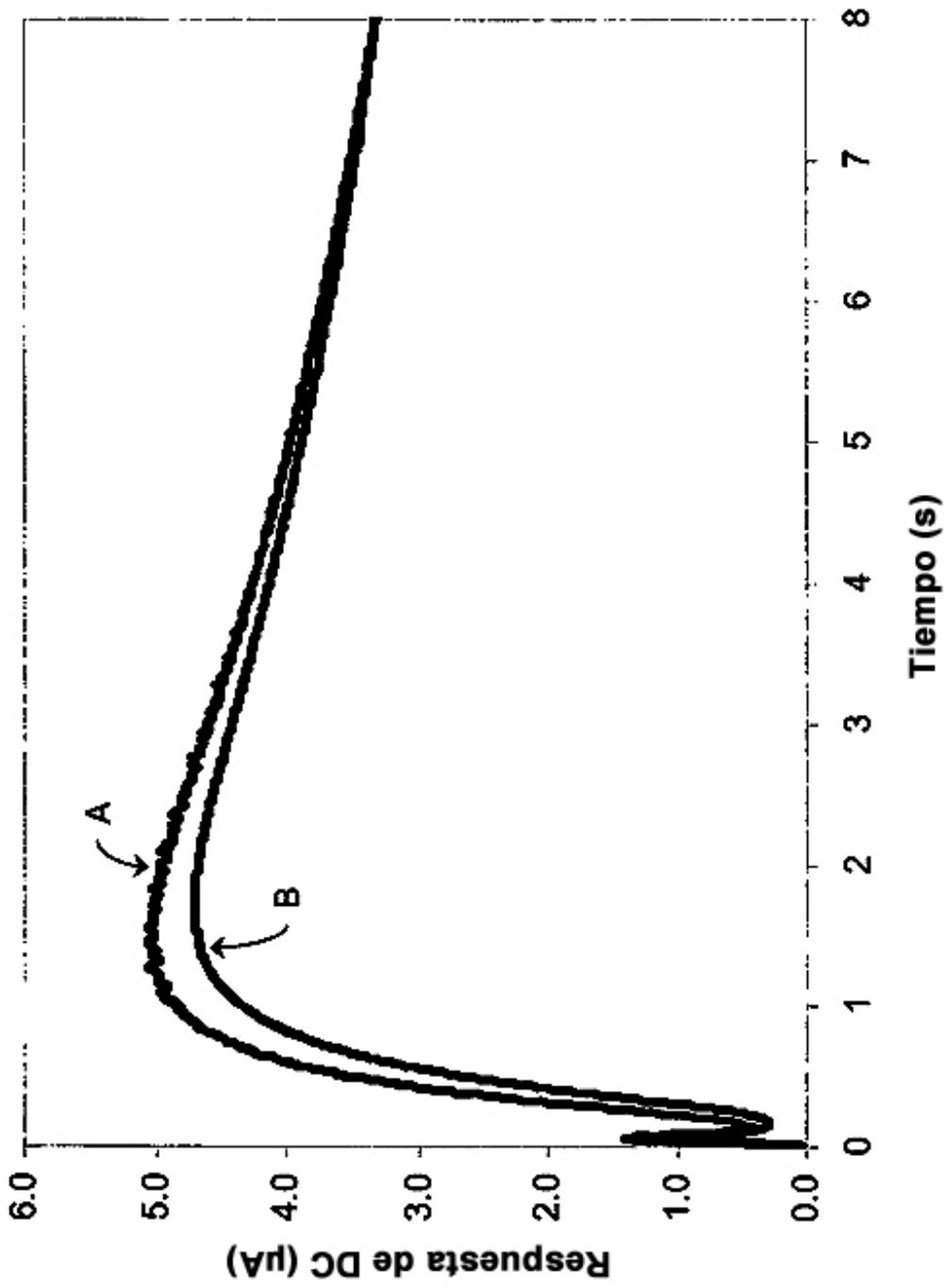


Fig. 2

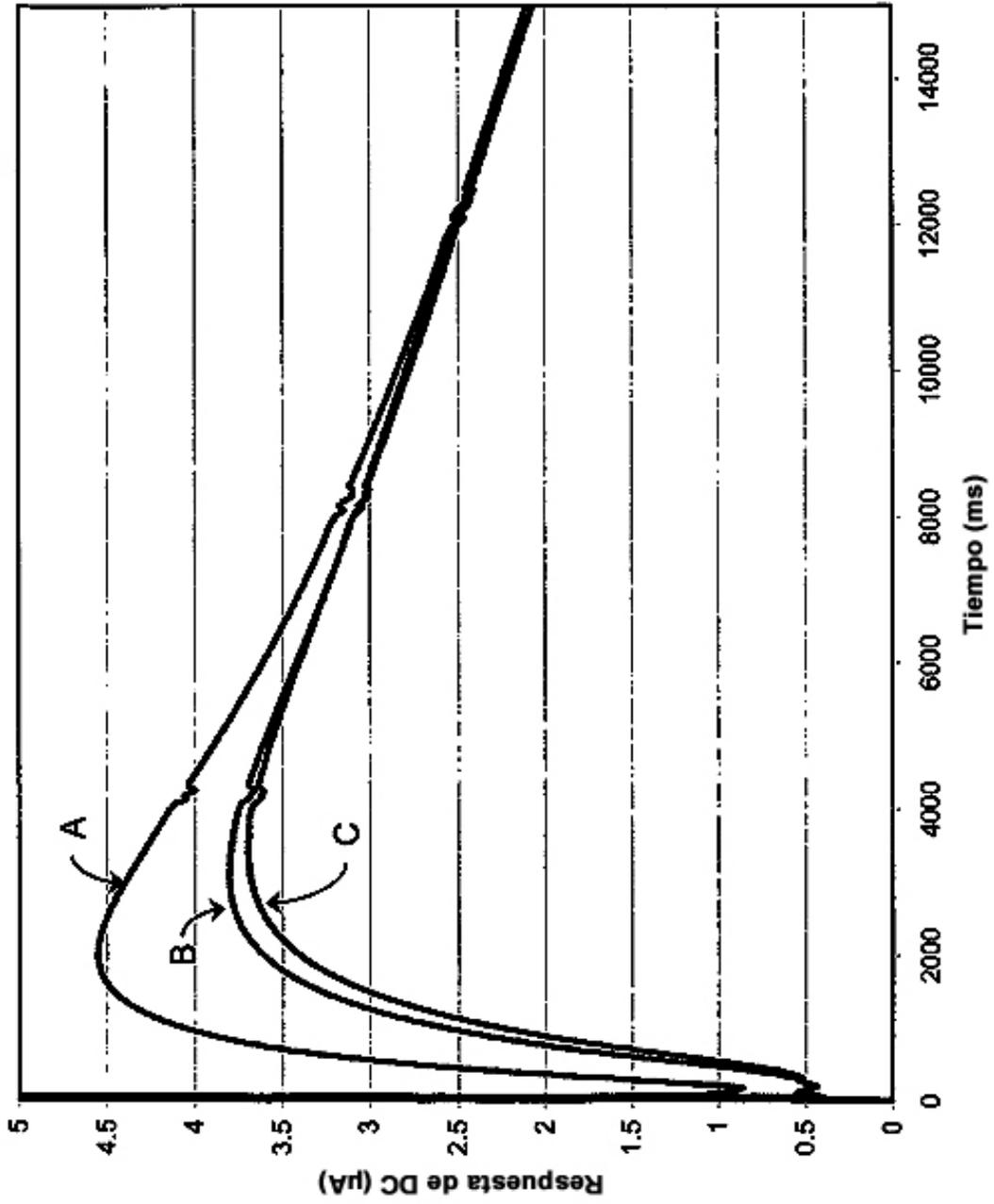


Fig. 3

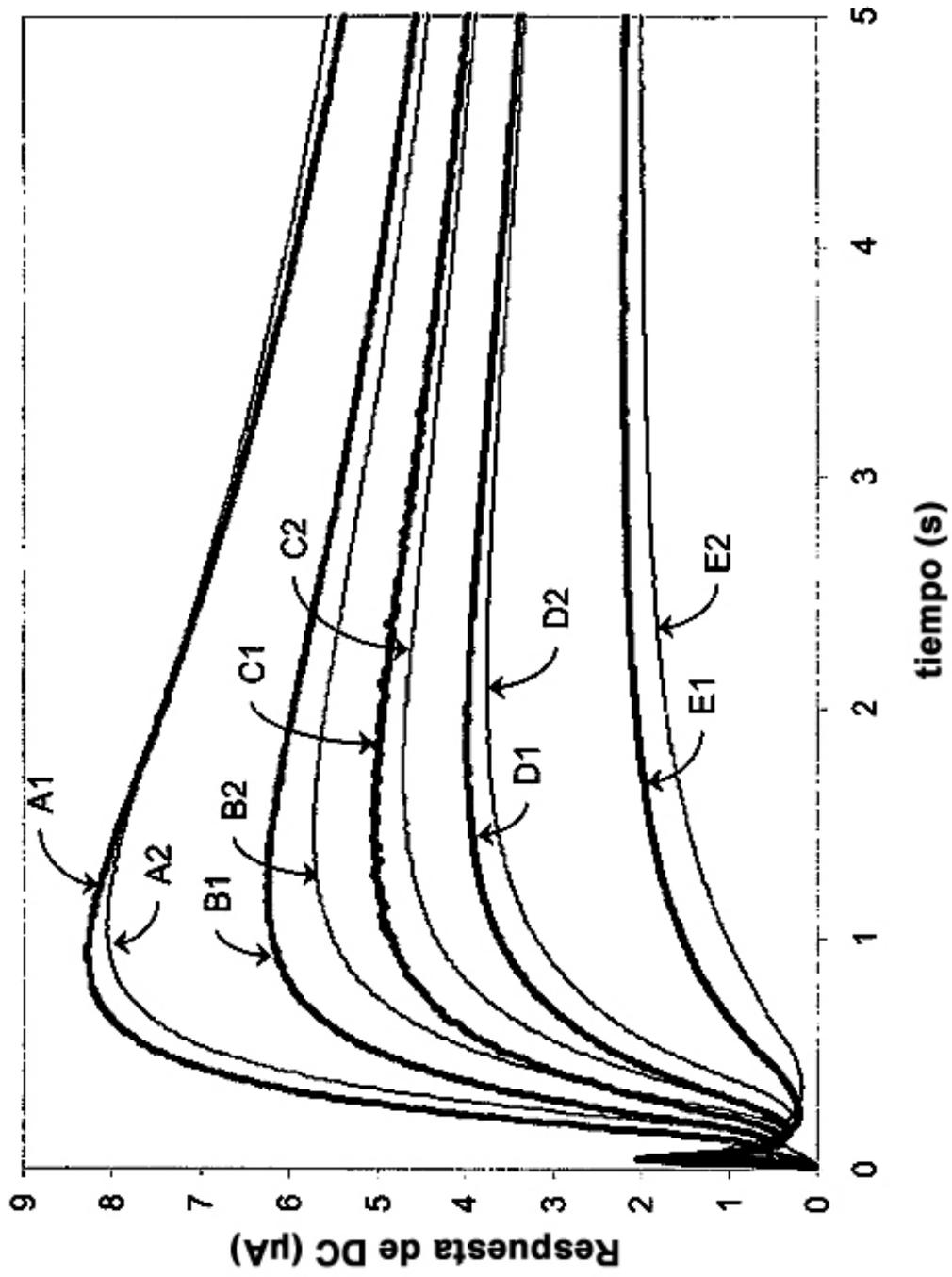


Fig. 4

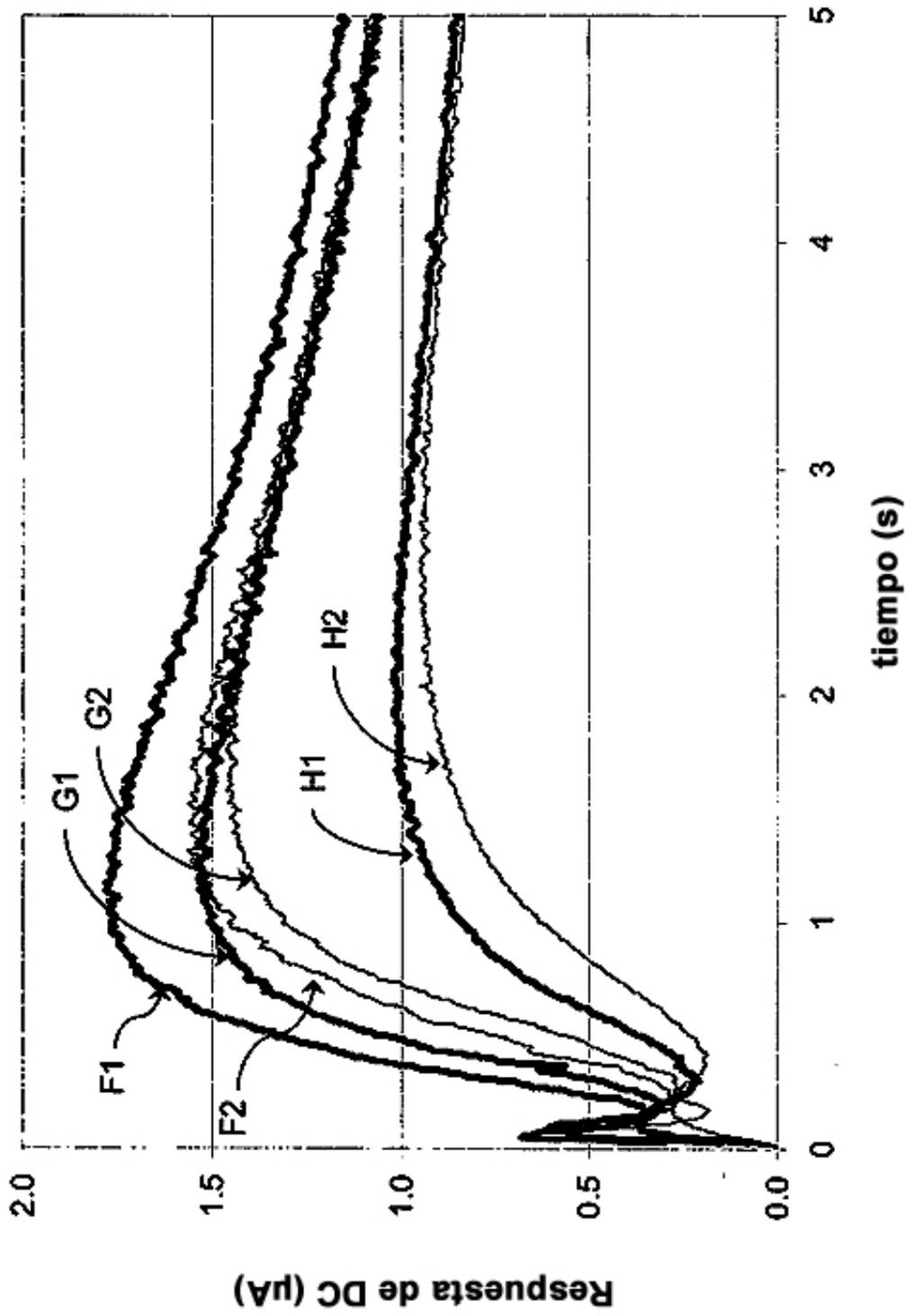


Fig. 5

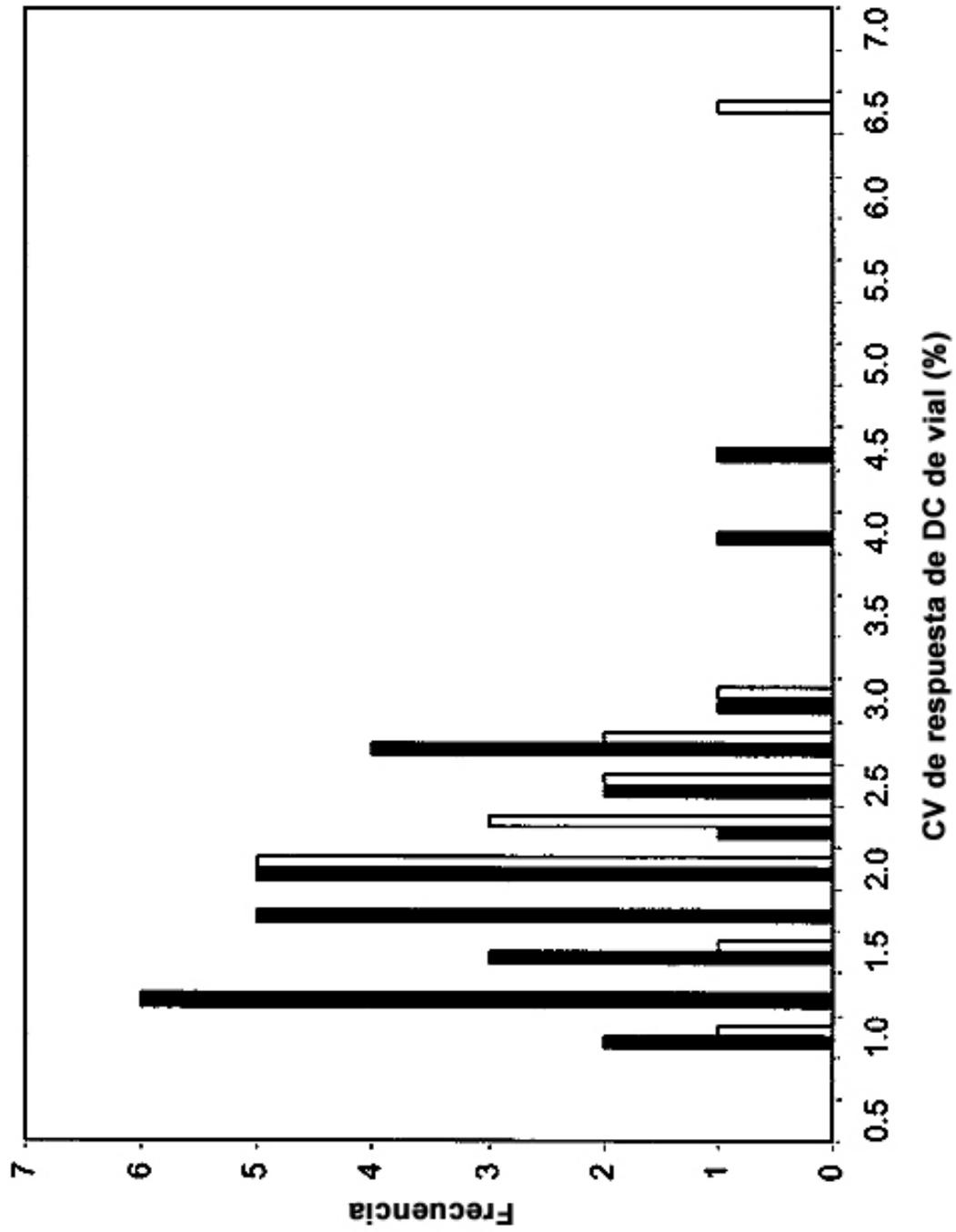


Fig. 6

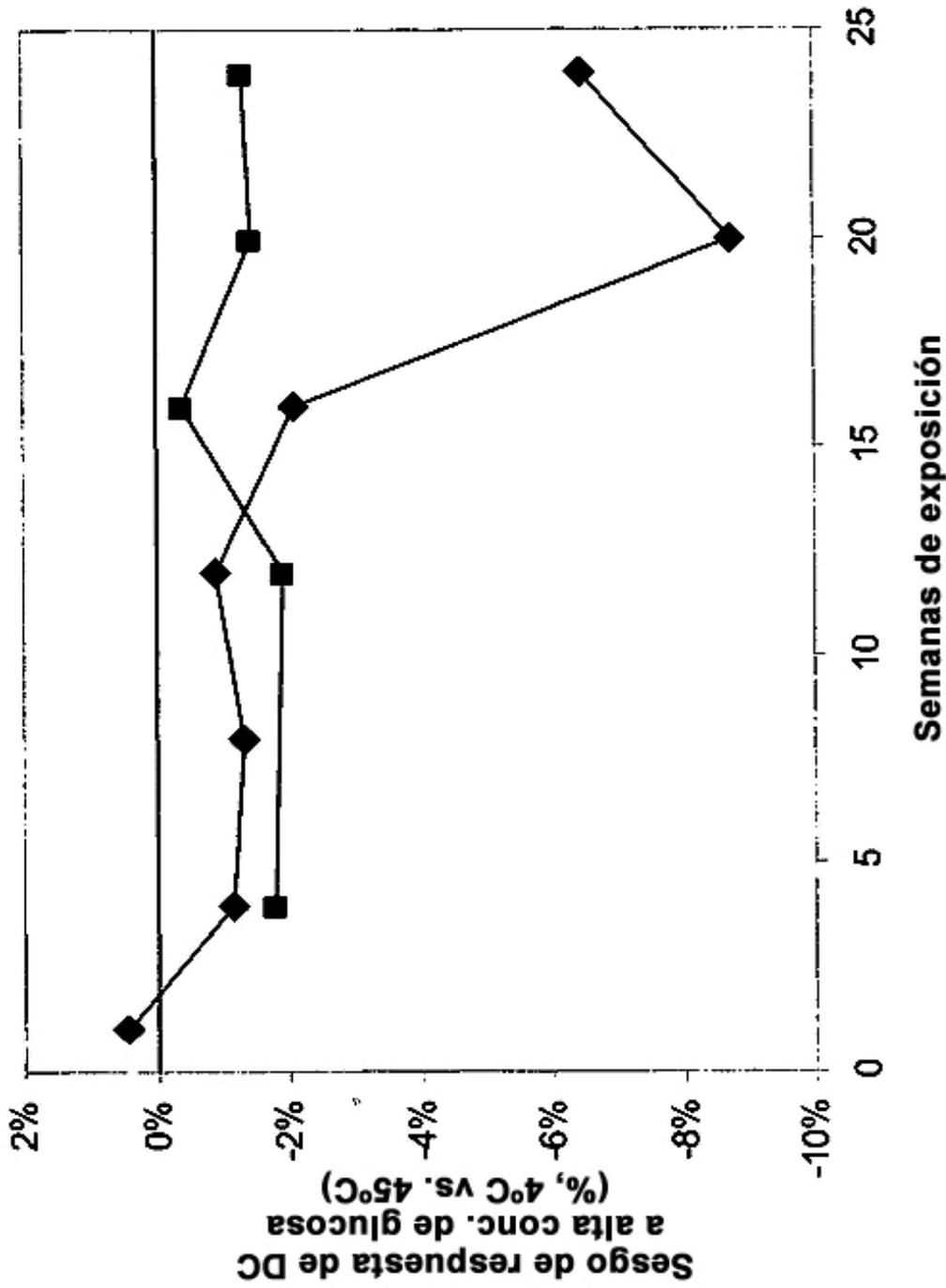


Fig. 7