

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 928**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013** **PCT/EP2013/068238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014** **WO14037372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013** **E 13758850 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016** **EP 2893027**

54 Título: **Composiciones y métodos de estabilidad de matriz mejorada**

30 Prioridad:

06.09.2012 US 201261697535 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DUVALL, STACY;
KACHEL, SIBYLLE;
LICA, GEORGETA CAMI;
SCHABEL, WILHELM y
SCHARFER, PHILIP

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 603 928 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

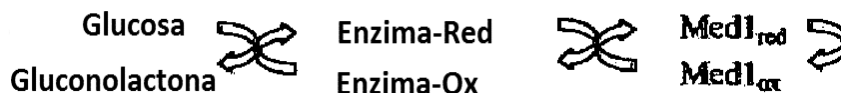
Composiciones y métodos de estabilidad de matriz mejorada

- 5 La presente invención se refiere a un elemento de prueba para determinar la cantidad de un analito en un fluido de muestra y un método para mejorar la estabilidad de un elemento de prueba de biosensor.

10 A medida que ha ido en aumento el número de pacientes que padecen diabetes y afecciones médicas similares, el autocontrol de la glucosa en sangre, en el que el paciente controla su nivel de glucosa en sangre, se ha convertido en una práctica habitual. El propósito de controlar el nivel de glucosa en sangre es determinar el nivel de concentración para tomar medidas correctivas basándose en si el nivel es demasiado alto o demasiado bajo, para llevar el nivel de nuevo a un intervalo normal. Si no se toman medidas correctivas pueden producirse consecuencias médicas graves, por lo que el control de la glucosa es un hecho de la vida cotidiana de los individuos diabéticos. Si los niveles de glucosa en sangre no se miden adecuadamente y de forma regular, pueden producirse complicaciones graves relacionadas con la diabetes, tales como la enfermedad cardiovascular, la enfermedad renal, el daño nervioso y la ceguera.

20 Existen biosensores que permiten a un individuo determinar el nivel de glucosa en una pequeña muestra de sangre. Los diseños de los medidores comunes utilizan un elemento de prueba desechable que, en combinación con el medidor, mide la cantidad de glucosa en la muestra de sangre electroquímica u ópticamente. La información normalmente se muestra como un valor de glucosa en sangre y, en ocasiones, se muestra la hora y fecha en que se realizó la medición. Esta información es, en la mayoría de los casos, suficiente para permitir a los diabéticos ajustar su ingesta de la dieta y/o dosis de insulina, y en el caso de valores bajos de glucosa puede indicar la necesidad de ingesta de azúcar para evitar la hipoglucemia.

25 La medición electroquímica de un analito tal como glucosa se puede lograr mediante la dosificación de un sensor con una muestra que contiene el analito (por ejemplo, la glucosa en una muestra de sangre acuosa) para iniciar una cadena de reacciones tales como la cadena mostrada a continuación para la glucosa. Mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y el contraelectrodo, la forma reducida del mediador se convierte en la forma oxidada. La corriente asociada con esta reacción es proporcional a la masa de mediador reducido y, por lo tanto, con la concentración de glucosa.



35 La exposición de los elementos de prueba de biosensor (tales como tiras reactivas de glucosa) en condiciones de alta humedad pueden hacer que el mediador se degrade a la forma reducida o a otros productos que son electroquímicamente activos en el mismo intervalo de potencial. Además, una humedad elevada puede hacer que la enzima se degrade a una forma reducida y la enzima reducida puede reaccionar con el mediador, produciendo el mediador en su forma reducida.

40 La acumulación de productos de degradación electroactivos en la superficie del electrodo y la correspondiente conversión con la aplicación de potencial dará lugar a la generación de corriente, incluso en ausencia de un sustrato (corriente blanco). Esta corriente se puede añadir a la corriente generada por la reacción de la glucosa dando lugar a un resultado positivamente sesgado o a un aumento de la tasa de fracaso de la tira.

45 Los componentes de una matriz de reactivo de una tira reactiva se seleccionan a menudo de modo que se disuelvan rápidamente en una muestra de sangre acuosa, proporcionando así un tiempo de reacción rápido y una visualización rápida del resultado para el usuario. Sin embargo, esto tiene la consecuencia no deseada de hacer a la matriz susceptible a la degradación por humedad ambiental, comprometiendo así la estabilidad durante el almacenamiento de las tiras reactivas desechables.

50 En consecuencia, se desea un método para disminuir la sensibilidad del elemento de prueba a las condiciones ambientales. El documento EP 1174716 describe un biosensor que incluye un segundo sustrato aislante situado sobre un primer sustrato, trazas situadas entre los sustratos, un reactivo de prueba, un tercer sustrato situado sobre el reactivo en una parte del segundo sustrato y una cubierta que se extiende sobre el tercer sustrato. Un desecante puede ser aplicado de forma permanente a la cubierta o al tercer sustrato. El documento US 2008/0031778 también describe un elemento de prueba, en el que un desecante está contenido en el elemento de prueba en una realización preferida. El documento WO 02/50609 se refiere a tarjetas de tiras reactivas electroquímicas que incluyen un desecante integral. El documento WO 02/083273 se refiere a una composición desecante que comprende una sal delicuescente y almidón modificado. Aunque los elementos de prueba pueden ser envasados y distribuidos en recipientes configurados para evitar la entrada no deseada de humedad de la atmósfera o de otras fuentes y aunque los elementos de prueba se pueden envasar en recipientes con materiales desecantes incorporados dentro del recipiente (como en la tapa o tapón del recipiente) o en un inserto que se deja en el

recipiente con los elementos de ensayo, los métodos conocidos no han sido eficaces para la eliminación de los riesgos de degradación del sensor.

Existe una necesidad, por tanto, de composiciones y métodos para mejorar la estabilidad de los sistemas de prueba de biosensores y más particularmente de las tiras reactivas de glucosa. La presente invención aborda esa necesidad.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. En un aspecto de la presente invención, se proporciona un elemento de prueba para determinar la cantidad de un analito en un fluido de muestra. El elemento de prueba comprende un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, y una matriz de reactivo que se extiende entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y que está configurado para una reacción de electrodo. La matriz de reactivo se proporciona con un material delicuescente y el material delicuescente se selecciona y proporciona en una cantidad eficaz para proteger uno o más de los componentes activos de la humedad en la atmósfera.

En la presente memoria se describe también una matriz de reactivo para un biosensor de glucosa en sangre, que comprende un mediador, una enzima y un material delicuescente seleccionado y proporcionado en una cantidad eficaz para absorber preferentemente y/o preventivamente el agua del aire comparado con las propiedades de absorción de agua y las tasas de los otros componentes de la matriz de reactivo, protegiendo así a los otros componentes de la degradación por agua cuando la humedad relativa supera el punto de delicuescencia del material delicuescente. El material delicuescente se puede seleccionar para absorber preferentemente agua cuando la humedad relativa del medio ambiente supera a cualquier nivel predeterminado, tal como 40 % o 50 % o 60 % o 70 % o 75 % o 80 %, etc., según se desee.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para mejorar la estabilidad de un elemento de prueba de biosensor con respecto a la degradación de los componentes del reactivo por la humedad en el aire, en el que el elemento de prueba comprende una base/sustrato de soporte, electrodo de trabajo y contraelectrodo y una matriz de reactivo que se extiende entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y que está configurado para una reacción de electrodo. El método de la invención comprende proporcionar en la matriz de reactivo un material delicuescente seleccionado y en una cantidad eficaz para disminuir la absorción de agua del aire por otros componentes de la matriz de reactivo.

En la presente memoria se describe también un método para mejorar la estabilidad de una matriz de reactivo de película seca de un biosensor electroquímico. Este método puede comprender proporcionar en la matriz de reactivo un material delicuescente seleccionado y en una cantidad eficaz para disminuir la absorción de agua del aire por otros componentes de la matriz de reactivo.

El material delicuescente se selecciona para que sea un material que tiene un punto de delicuescencia entre 50 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa. En algunas realizaciones, el punto de delicuescencia está preferiblemente entre 70 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa, mientras que en otras realizaciones el material delicuescente tiene un punto de delicuescencia al 75 % de humedad relativa.

El elemento de prueba puede ser una tira reactiva de glucosa de un medidor de glucosa que tiene una matriz de reactivo de glucosa en el mismo, incluyendo la matriz de reactivo de la tira reactiva un sistema de enzima y un mediador. El sistema enzimático puede comprender la enzima glucosa deshidrogenasa de enzima (GDH) y/o el cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD). El mediador puede comprender un mediador nitrosoanilina. También se puede incluir un formador de película que comprende polivinilpirrolidona (PVP).

El material delicuescente puede comprender uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de zinc, carbonato de potasio, fosfato de potasio, carnalita, citrato férrico amónico, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio. El material delicuescente se puede proporcionar en una cantidad eficaz para absorber agua de la atmósfera a una velocidad que es más rápida que la velocidad a la que los otros componentes de la matriz de reactivo absorben agua de la atmósfera. Del mismo modo, el material delicuescente se puede proporcionar en una cantidad eficaz para absorber agua de la atmósfera a una velocidad que es más rápida que la velocidad a la que los otros componentes de la matriz de reactivo absorben agua de la atmósfera cuando la humedad relativa en la atmósfera excede aproximadamente el 75 %. El material delicuescente puede alternativa o adicionalmente ser seleccionado y proporcionado en una cantidad eficaz para absorber preferentemente agua de la atmósfera, en comparación con las propiedades de absorción de agua de los otros componentes reactivos, protegiendo así los otros componentes de la matriz de reactivo de la absorción de agua de la atmósfera cuando la humedad relativa supera el punto de delicuescencia del material delicuescente.

La FIG. 1 muestra un gráfico de la corriente blanco (nA) con el tiempo para tiras que tienen cantidades variables de NaCl añadido a la mezcla de reactivos. Las tiras se dosificaron con solución tampón y se expusieron a condiciones de calor y humedad elevadas (30 °C/80 % HR).

La FIG. 2 muestra un gráfico de la corriente blanco (nA) con el tiempo para tiras que tienen cantidades variables de NaCl añadido a la mezcla de reactivos. Las tiras fueron dosificadas con la sangre no enriquecida y se expusieron a condiciones de calor y humedad elevadas (30 °C/80 % HR).

La FIG. 3 muestra un gráfico de la fracción de mediador restante en la tira con el tiempo para tiras que tienen cantidades variables de NaCl añadido a la mezcla de reactivos. Las tiras fueron expuestas a condiciones de calor y humedad elevadas (30 ° C/80 % HR).

La FIG. 4 es un gráfico de datos de sorción para PVP de acuerdo con las mediciones de prueba (diamantes rojos) y los valores dados en la literatura (otros símbolos).

La FIG. 5 es un gráfico de los datos de sorción de NaCl de acuerdo con las mediciones de prueba (diamantes rojos) y los valores dados en la literatura (otros símbolos), así como el punto de deliquesencia (línea verde) y el punto de cristalización (línea azul).

La FIG. 6 es un gráfico de las isotermas de sorción para PVP, NaCl y mezclas de los dos componentes.

La FIG. 7 es un gráfico de las corrientes blanco observadas cuando los reactivos de película seca que tienen diversos aditivos están protegidos por materiales deliquescentes, como proporcionan ciertos aspectos de la presente invención.

Para el propósito de promover una comprensión de los principios de la invención, ahora se hará referencia a ciertas realizaciones y se usará un lenguaje específico para describir la misma. No obstante, se entenderá que no se pretende con ello ninguna limitación del alcance de la invención. Cualquier alteración y modificaciones adicionales en las realizaciones descritas, y cualquier aplicación adicional de los principios de la invención como se describe en la presente memoria, se contemplan como normalmente se le ocurriría a un experto en la técnica a la que se refiere la invención. En particular, aunque las realizaciones más preferidas de la invención se refieren a un dispositivo de prueba de glucosa en sangre y los métodos de medición, se contempla que la invención se pueda utilizar con dispositivos para medir otros analitos y otros tipos de muestras. Tales realizaciones alternativas requieren ciertas adaptaciones a las realizaciones descritas en la presente memoria que serían obvias para los expertos en la técnica.

Los biosensores de glucosa suelen utilizar una matriz de reactivo que comprende un sistema de enzima/cofactor y un mediador para la prueba de la concentración de glucosa en una muestra de sangre. Cuando las tiras reactivas de glucosa del sensor se exponen a alta humedad durante largos períodos de tiempo, las tiras pueden perder su funcionalidad o volverse inestables. La presente invención aborda este problema mediante la formulación de la matriz de reactivo de la tira reactiva para incluir un material deliquescente que absorbe agua de la atmósfera a un nivel de humedad seleccionado, evitando de este modo que el agua degrade los componentes de la matriz de reactivo. El material deliquescente se selecciona para proteger los componentes reactivos cuando se exponen a una humedad relativa definida, tal como cuando la humedad relativa en la atmósfera excede de aproximadamente 75 %. El material deliquescente es preferiblemente una sal y los más preferiblemente es cloruro de sodio. Otros materiales deliquescentes conocidos incluyen cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de zinc, carbonato de potasio, fosfato de potasio, carnalita, citrato férrico amónico, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio.

Los materiales y métodos de estabilización de la matriz de reactivo de la presente invención tienen una utilidad particular cuando se utilizan con los elementos de prueba (tal como una tira de ensayo de glucosa) que tiene sistemas de reactivos de película seca que se pueden degradar si se exponen a una humedad excesiva, tales como una humedad relativa del 75 % o incluso 70 % o menos. Por ejemplo, los mediadores de la reacción de glucosa usados comúnmente se pueden degradar cuando se exponen a la humedad (agua) en el aire, produciendo una forma reducida u otros productos que son electroquímicamente activos y pueden tener como resultado una corriente blanco en el medidor de prueba. Del mismo modo, una enzima se puede degradar a una forma reducida, a continuación, reducir el mediador y presentarse este problema por esta vía. El problema se agrava por el hecho de que la matriz de reactivo tiene un grado de hidrofiliicidad con el fin de proporcionar una humectación rápida del reactivo (y, por tanto, una lectura de prueba rápida). Este problema se presenta específicamente, por ejemplo, cuando se utilizan materiales que contienen PVP como formador de película para un sistema de reactivo de glucosa. El PVP adsorbe la humedad del aire, entrando en contacto con el sistema reactivo.

En un aspecto de la presente invención el problema mencionado anteriormente se aborda mediante la adición de un componente a la matriz de reactivo que hace que la matriz en su conjunto adsorba menos agua. Si bien la invención se ilustra en esta divulgación mediante la adición de un material deliquescente tal como NaCl a un sistema de reactivo de glucosa, incluyendo FADGDH y nitrosoanilina, la invención cuando se interprete en sentido amplio se pretende que incluya otros sistemas de reactivos y otros materiales deliquescentes.

En las realizaciones más preferidas de la presente invención, el biosensor es una tira reactiva de glucosa. Tales tiras de prueba tienen típicamente un electrodo de trabajo y un contraelectrodo y se proporcionan con una matriz de reactivo para analizar electroquímicamente una matriz de reactivo de la tira reactiva. Sin embargo, otros dispositivos y procesos de este tipo están dentro del alcance de la presente divulgación, la cual puede utilizar uno o más elementos de prueba alternativos. Estos elementos de prueba son conocidos y están disponibles en diferentes formas, a las que la presente invención en su conjunto es aplicable. Por ejemplo, los elementos de prueba en forma de tiras reactivas, cintas reactivas, discos reactivos, elementos reactivos plegables (por ejemplo, de acuerdo con el principio Leporello) y otras formas como son conocidos por los expertos en la técnica. En lo sucesivo, aunque la invención se describirá con referencia sustancialmente a tiras de ensayo, hay que señalar que también son posibles otras realizaciones y que están destinadas a estar dentro del alcance de la invención divulgada.

El elemento de prueba comprende generalmente al menos un campo de prueba que tiene una superficie de campo de prueba. Un campo de prueba se entiende que significa una región bidimensional o tridimensional del elemento de prueba, región que se puede utilizar en principio para la detección del analito, la cual se puede llevar a cabo cualitativamente y/o cuantitativamente. En algunas realizaciones, el campo de prueba puede ser un campo de prueba en seco y puede comprender al menos un reactivo de detección que es seleccionado para llevar a cabo una reacción detectable en la presencia del analito.

En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención una matriz de reactivo de la tira de ensayo comprende un sistema enzimático y un mediador. El sistema enzimático puede comprender la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) y/o el cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD), y el mediador puede comprender un mediador de nitrosoanilina. La matriz de reactivo también puede incluir un formador de película, el cual puede comprender polivinilpirrolidona (PVP). Ejemplos de otros reactivos de detección enzimática de glucosa específicos incluyen, pero no se limitan a, desoxi reductasas (por ejemplo, GlucDOR/PQQ), deshidrogenasas, oxidasas, o enzimas similares, por ejemplo, glucosa oxidasa (GOD) o glucosa deshidrogenasa.

En la mezcla de reactivos también puede incluirse un mediador. El mediador puede ser cualquier especie química (generalmente electroactiva), que puede participar en un esquema de reacción que implica una enzima, un analito, y, opcionalmente, un cofactor (y sus productos de reacción), para producir un producto de reacción detectable electroactivo. Generalmente, la participación del mediador en esta reacción implica un cambio en su estado de oxidación (por ejemplo, una reducción), tras la interacción con cualquiera del analito, la enzima, o un cofactor, o una especie que es un producto de reacción de uno de estos (por ejemplo, un cofactor que reacciona a un estado de oxidación diferente). Existen diversos mediadores que presentan un comportamiento electroquímico adecuado. Un mediador puede estar también preferiblemente en su forma oxidada; puede presentar opcionalmente electroquímica redox reversible; puede presentar preferiblemente una buena solubilidad en soluciones acuosas; y preferiblemente reacciona rápidamente para producir un producto de reacción electroactivo. Ejemplos de mediadores adecuados incluyen benzoquinona, azul Meldola, otros complejos de metales de transición, ferricianuro de potasio y nitrosoanilinas, véase la patente US-5.286.362.

Además de las enzimas, mediadores y otros componentes del reactivo de detección, el campo de prueba puede incluir además sustancias de soporte, sustancias auxiliares, pigmentos, cargas, sustancias tampón, etc. En lo sucesivo, no se hace distinción entre las sustancias adicionales que están igualmente implicadas en la reacción para la detección del analito y el reactivo de detección real.

Hay que señalar que la química del esquema de reacción de cualquier método de detección electroquímica elegido se puede elegir a la luz de diversos factores químicos relacionados con el sistema, incluyendo la identidad del analito y de la sustancia de muestra. Incluso entonces, para un analito o sustancia dada, pueden ser útiles diversos componentes reactivos diferentes en términos de un catalizador (a menudo, será útil una variedad de enzimas), co-activos (por ejemplo, una variedad de mediadores puede ser útil, y cofactores (si es necesario, una variedad puede ser útil). Se conocen muchos esquemas de reacción y sus componentes reactivos y productos de reacción y ejemplos de algunas enzimas diferentes incluyen las enumeradas en la Tabla 1.

TABLA 1

Analito	Enzimas	Mediador redox (forma oxidada)	Mediador adicional
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa y diaforasa	Ferricianuro, cloruro de osmio(III) - (bipiridilo)-2-imidazoliilo, azul Meldola, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{MeIm}] \text{Cl}_3$ $[\text{OS}(\text{III}) (\text{NH}_3)_5\text{pyz}]_2(\text{SO}_4)_3$, derivados de anilina nitrosos	
Glucosa	Glucosa oxidasa	(véase más arriba)	
Colesterol	Colesterol esterasa y colesterol oxidasa	(Ver glucosa)	2,6-dimetil-1,4-benzoquinona, 2,5-dicloro-1,4-benzoquinona, o etosulfato de fenazina
Colesterol HDL	Colesterol esterasa y colesterol oxidasa	(Ver glucosa)	2,6-dimetil-1,4-benzoquinona, 2,5-dicloro-1,4-benzoquinona, o etosulfato de fenazina
Triglicéridos	Lipoproteína lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y diaforasa	(Ver glucosa)	Metosulfato de fenazina, etosulfato de fenazina

Analito	Enzimas	Mediador redox (forma oxidada)	Mediador adicional
Triglicéridos	Lipoproteína lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato- deshidrogenasa y diaforasa	(Ver glucosa)	metosulfato de fenazina, etosulfato de fenazina
Lactato	Lactato oxidasa	(Ver glucosa)	2,5-dicloro-1,4-benzoquinona
Lactato	Lactato deshidrogenasa y diaforasa	(Ver glucosa)	
Lactato deshidrogenasa	Diaforasa	(Ver glucosa)	
Piruvato	Piruvato oxidasa	(Ver glucosa)	
Alcohol	Alcohol oxidasa	(Ver glucosa)	
Alcohol	Alcohol deshidrogenasa y diaforasa	(Ver glucosa)	
Ácido úrico	Uricasa	(Ver glucosa)	
Ácido 3-hidroxi-butírico (cuerpos cetónicos)	3-Hidroxi-butirato deshidrogenasa y diaforasa	(Ver glucosa)	

Para describir con más detalle un ejemplo de un esquema de reacción de oxidación/reducción que se sabe que es útil para la detección de glucosa en la sangre humana, una muestra que contiene glucosa puede reaccionar con una enzima (por ejemplo, glucosa-colorante-oxidorreductasa (Gluc-Dor)) y opcionalmente un cofactor, (por ejemplo, pirrolo-quinolina-quinona), en presencia de un mediador redox (por ejemplo, derivados de benzoquinona, ferricianuro, o nitrosoanilina), para producir la forma oxidada del analito, gluconolactona, y la forma reducida del mediador redox. Ver, patente US-5.128.015. Se conocen otros ejemplos de esquemas de reacción y se utilizan generalmente en métodos diseñados para detectar un analito específico, p.ej., colesterol, urea, etc.

Independientemente de la matriz de reactivo utilizada, se añade un material deliquescente a la matriz de reactivo para proteger los componentes del reactivo de la degradación por agua. Materiales deliquescentes preferidos incluyen cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de zinc, carbonato de potasio, fosfato de potasio, carnalita, citrato férrico amónico, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio, siendo las sales como el cloruro de sodio la más preferida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "deliquescentia" generalmente se refiere a una transición de fase de sólido a solución que se produce cuando la presión de vapor de una solución acuosa saturada de una sustancia es menor que la presión de vapor del agua en el aire ambiente. Cuando el vapor de agua es absorbido por el compuesto sólido puro, se forma una mezcla del sólido y su solución saturada o una solución acuosa de las formas compuestas hasta que la sustancia se disuelve y está en equilibrio con su entorno. La humedad relativa a la que se produce la deliquescentia, es una propiedad específica de la sustancia. En este punto, la presión de vapor de agua sobre la solución acuosa será igual a la presión parcial de agua en la atmósfera en contacto con ella. Por consiguiente, una partícula de sal deliquescente en la atmósfera cuando la humedad relativa supere el punto de deliquescentia del material. La expresión "material deliquescente" generalmente se refiere a materiales que tienen propiedades deliquescentes y puede referirse a los materiales, tales como sales, que tienen una fuerte afinidad por la humedad y que van a absorber cantidades relativamente grandes de agua de la atmósfera si se exponen a la misma, protegiendo de este modo otros materiales de la absorción de agua.

Como se ha indicado anteriormente, el material deliquescente se puede seleccionar para que sea un material que tiene un punto de deliquescentia que protege a los otros componentes de reactivo cuando se expone a la humedad ambiental a un nivel pre-determinado. En consecuencia, en un aspecto de la presente invención, un usuario identifica un estrés ambiental en particular a evitar, tales como el estrés ambiental de una humedad relativa del 75 %, e incluye en la mezcla de reactivo un material deliquescente seleccionado para tener un punto de deliquescentia ligeramente por debajo de ese nivel. Por ejemplo, el punto de deliquescentia del NaCl está cercano a una humedad relativa (HR) de 75 %, por lo que la adición de NaCl es particularmente eficaz para el uso con elementos de prueba que pueden estar expuestos a una humedad relativa que puede exceder el 75 %. Cuando la humedad relativa es superior a ese punto, los cristales de cloruro de sodio absorben agua más rápido que los otros materiales reactivos, adelantándose así a la absorción por los otros componentes y protegiendo a los otros materiales reactivos de la degradación por el agua.

La cantidad de material deliquescente añadido a la matriz de reactivo dependerá del material que está siendo utilizando, de los otros componentes en la matriz de reactivo y de las condiciones ambientales a las que se expone. En general, el material deliquescente se proporcionará en la matriz de reactivo en una cantidad eficaz para permitir que el material deliquescente absorba preventivamente el agua que de otra manera sería absorbida por otros componentes reactivos y de esta manera evitar que los demás componentes reactivos se deterioren. En otras

palabras, el material deliquescente se proporciona preferiblemente en una cantidad eficaz para absorber agua de la atmósfera a una velocidad que es más rápida que la velocidad a la que los otros componentes de la matriz de reactivo absorben agua de la atmósfera, evitando así que los otros componentes absorban agua y se degraden.

- 5 En algunas realizaciones el material deliquescente puede ser una combinación de dos o más materiales deliquescentes. Por ejemplo, se puede usar una mezcla de sales tales como NaCl, MgSO₄ y CaCl₂.

Tanto si se utiliza individualmente como en combinación, el material(es) deliquescente se puede añadir a la matriz de reactivo en cantidades eficaces para proporcionar de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % en porcentaje de peso de material deliquescente en el reactivo de la película seca, siendo más preferidas cantidades entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 8 %. En una realización, se proporciona el material deliquescente en la matriz de reactivo de película seca en una cantidad entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 7 % en peso, siendo más preferidas cantidades entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 6 %. En una realización, el material deliquescente se incluye en el material reactivo en una cantidad eficaz para proporcionar al menos aproximadamente 2 % de material deliquescente en la matriz de reactivo de película seca, mientras que en otra realización, el material deliquescente se incluye en el material reactivo en una cantidad eficaz para proporcionar al menos aproximadamente 3 % de material deliquescente en la matriz de reactivo de película seca. En otra realización, el material deliquescente se puede añadir al material reactivo en cantidades eficaces para proporcionar no más de aproximadamente 10 % de material deliquescente en la matriz de reactivo de película seca.

En una realización preferida se proporciona el material deliquescente en una cantidad eficaz para proporcionar aproximadamente 3,0 % de NaCl en el reactivo de película seca. En otra realización preferida se proporciona el material deliquescente en una cantidad eficaz para proporcionar aproximadamente 5,8 % de NaCl en el reactivo de película seca. En una tercera realización preferida se proporciona el material deliquescente en una cantidad que proporciona aproximadamente 6,5 % de MgSO₄ en el reactivo de película seca.

Como se indicó anteriormente, los principios de la invención descritos en la presente memoria se pueden utilizar particularmente en la estabilización de los reactivos utilizados en un elemento de prueba para la detección de al menos un analito en una muestra, tales como la detección de al menos un metabolito en un fluido corporal, y en particular la detección de glucosa en una muestra de sangre. Por consiguiente, ciertos aspectos y principios de la presente invención se ilustran en el presente documento mediante la descripción de una realización particularmente preferida, concretamente, una realización en la que se usa NaCl como un material deliquescente en una mezcla de reactivos que contiene PVP o un material que contiene PVP. Si se comprende el comportamiento de sorción de agua del PVP y del cloruro de sodio, se puede entender mejor el mecanismo para mejorar la estabilidad del mediador en películas que contienen cloruro de sodio. Esta comprensión facilita el diseño de matrices de biosensores cuando se aplica a los materiales mencionados anteriormente, así como los nuevos componentes de la matriz.

EJEMPLO 1

Se añadió cloruro de sodio al reactivo para aumentar la fuerza iónica del reactivo. La corriente blanco tanto en solución acuosa como en sangre no enriquecida se redujo significativamente en las formulaciones que contenían cloruro de sodio adicional en comparación con la formulación que no contenía cloruro de sodio adicional (ver las figuras 1 y 2). La estabilidad del mediador tal como se mide de forma independiente por HPLC fue mejor en tiras con cloruro de sodio adicional, como se muestra en la Figura 3. El resultado es una mayor estabilidad de la matriz de reactivo. Como se muestra en la Figura 3, el aumento de la cantidad de un material deliquescente tal como NaCl en una matriz de reactivo aumenta la fracción de mediador restante en la tira después de la exposición a un elevado nivel de humedad.

EJEMPLO 2

Dado que se sabe que la exposición a altas temperaturas y a altos niveles de humedad produce un fallo de estabilidad del mediador en los biosensores de glucosa, se estudió el comportamiento de sorción del PVP, NaCl y mezclas de PVP y NaCl. Tales estudios ayudan a caracterizar las propiedades de sorción de la matriz de reactivo sin estudiar la matriz de reactivo completa y son útiles como una herramienta de predicción para el diseño de las películas de la matriz de reactivo con características de sorción de agua deseables.

Las isotermas de sorción de PVP y NaCl fueron medidas y modeladas y a continuación se compararon con las isotermas de sorción medidas de mezclas de PVP y NaCl. En su caso, los datos medidos se modelaron con la ecuación de Flory-Huggins:

$$\ln a_w = \ln \phi_w + \phi_P + \chi_{wP} \phi_P^2$$

Donde a_w es la actividad de agua en la fase de gas (humedad relativa), ϕ es la fracción de volumen de agua (w) y polímero (P) y χ_{wP} es el parámetro de interacción entre el agua y el polímero.

Los valores medidos y los valores de la literatura se corresponden bien para el PVP, como se muestra en la Figura 4 y se observó que la dependencia de la concentración del parámetro de interacción se ajustaba a la siguiente ecuación. Esta ecuación se utilizó para determinar la cantidad de agua absorbida por el PVP en las mezclas.

$$\chi_{w,p} = 0,6954 - 0,1539 \cdot \phi_w - 0,0392 \cdot \phi_w^{-1}$$

EJEMPLO 3

El cloruro de sodio no absorbe una cantidad apreciable de agua por debajo del punto de deliquesencia. Por consiguiente, la cantidad de agua adsorbida por debajo del punto de deliquesencia a una humedad relativa de 75 % es, como mucho, unas pocas capas moleculares. Por encima del punto de deliquesencia, se disuelven los cristales de cloruro de sodio y la concentración de la solución es una función de la actividad de agua en la fase gaseosa y se calcula como:

$$a_w = \gamma_w \cdot (1 - x_s)$$

donde x_s es la fracción molar de la sal en la solución e γ_w es el coeficiente de actividad. El coeficiente de actividad se calcula a partir de valores de la literatura y se observó que sigue la siguiente relación con la fracción molar de agua (ecuación, Figura 5):

$$\gamma_w = -10,1757 x_w^2 + 20,9601 x_w + 9,7854$$

EJEMPLO 4

Se compararon las isothermas de sorción para PVP, NaCl, y mezclas de PVP y NaCl. Los resultados muestran que la masa de agua adsorbida por la mezcla son las sumas ponderadas de los componentes individuales. Por debajo del punto de deliquesencia del cloruro de sodio, la cantidad de agua adsorbida por estas mezclas disminuye con la cantidad creciente de cloruro de sodio. Sin embargo, lo contrario es cierto en las actividades de agua por encima del punto de deliquesencia del cloruro de sodio. En estas condiciones, las películas con más cloruro de sodio tienen una mayor absorción de agua ya que el cloruro de sodio adsorbe más agua del PVP por encima del punto de deliquesencia.

La comparación de los componentes individuales y las mezclas se muestra en la Figura 6, donde la relación PVP/NaCl varió entre 0,2 y 4,0. Para los biosensores descritos anteriormente, la relación PVP/NaCl varió desde 1,7 hasta 3,4. Como se muestra en la Figura 6, la adición de NaCl al PVP hace que la matriz resultante adsorba menos agua. Esto se demuestra por el hecho de que la curva para el PVP (solo) está relativamente a la derecha en la figura y el aumento de la relación de NaCl de 0,5:1, a 1:1, a 2:1, a 5:1 empuja la curva progresivamente a la izquierda. En consecuencia, se ha demostrado por los inventores que cuanto mayor es la concentración de sal en la matriz, menos agua es adsorbida por la matriz.

EJEMPLO 5

También se pueden usar materiales deliquescentes distintos del NaCl, como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, reactivos de película seca que estén protegidos con un material deliquescente de $MgSO_4$ han demostrado ser eficaces usando los procedimientos descritos en general anteriormente. En particular, la Figura 7 muestra que la inclusión de $MgSO_4$ en la matriz de reactivo de película seca proporciona protección contra la degradación por el agua en ambientes húmedos.

En la Figura 7, el rodillo 2 muestra los datos de una prueba de un reactivo de película seca que comprende un sistema de enzima FADGDH/cofactor, un mediador nitrosoalina, PVP y no hay material deliquescente. Por el contrario, el rodillo 11 muestra los datos de una prueba de un reactivo de película seca que tiene una mezcla de reactivos que es comparable a la mezcla de reactivo del rodillo 2, pero con aproximadamente 6 % de $MgSO_4$ añadido como material deliquescente. En estas pruebas, la temperatura era de aproximadamente 30 ° C y la humedad relativa fue del 82 %.

La inspección de los datos proporcionados en la Figura 7 muestra una corriente blanco significativamente más alta del rodillo 2, donde la matriz de reactivo de película seca no incluye un material deliquescente, que en el caso del rodillo 11, donde la matriz de reactivo de película seca incluye un material deliquescente de $MgSO_4$. Esto indica que la inclusión de aproximadamente 6 % de $MgSO_4$ en la mezcla de reactivo de película seca protege el reactivo de la degradación por el agua en el ambiente húmedo.

El trabajo adicional en el campo de las isothermas de sorción se describe en un artículo titulado "Sorption Isotherms of Mixtures of Polymers, Protein and Electrolytes - Measurement Data and Model Prediction" de Sibylle Kachel, Philip Scharfer y Wilhelm Schabel de Thin Film Technology, Institute of Thermal Process Engineering, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Alemania, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

Además, los datos de equilibrio de fase se presentan en los siguientes artículos. D. J. Cziczo, J. B. Nowak, J. H. Hu, J. P. D. Abbatt, Infrared spectroscopy of model tropospheric aerosols as a function of relative humidity: Observation of deliquescence and crystallization, *J. Geophys. Res.* 102 (D15) (1997) 18843-18850.

5 P. B. Barraclough, P. G. Hall, The adsorption of water vapour by lithium fluoride, sodium fluoride and sodium chloride, *Surf. Sci.* 46 (2) (1974) 393-417.

I. Tang, H. Munkelwitz, J. Davis, Aerosol growth studies-ii. preparation and growth measurements of monodisperse salt aerosols, *J. Aerosol Sci.* 8 (3) (1977) 149-159.

10 R. H. Stokes, B. J. Levien, The osmotic and activity coefficients of zinc nitrate, zinc perchlorate and magnesium perchlorate. transference numbers in zinc perchlorate solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 68 (2) (1946) 333-337.

J. Teng, S. Bates, D. A. Engers, K. Leach, P. Schields, Y. Yang, Effect of water vapor sorption on local structure of poly(vinylpyrrolidone), *J. Pharm. Sci.* 99 (9) (2010) 3815-3825.

15 J. Zhang, G. Zografi, The relationship between "BET" and "free volume"-derived parameters for water vapor absorption into amorphous solids, *J. Pharm. Sci.* 89 (8) (2000) 1063-1072.

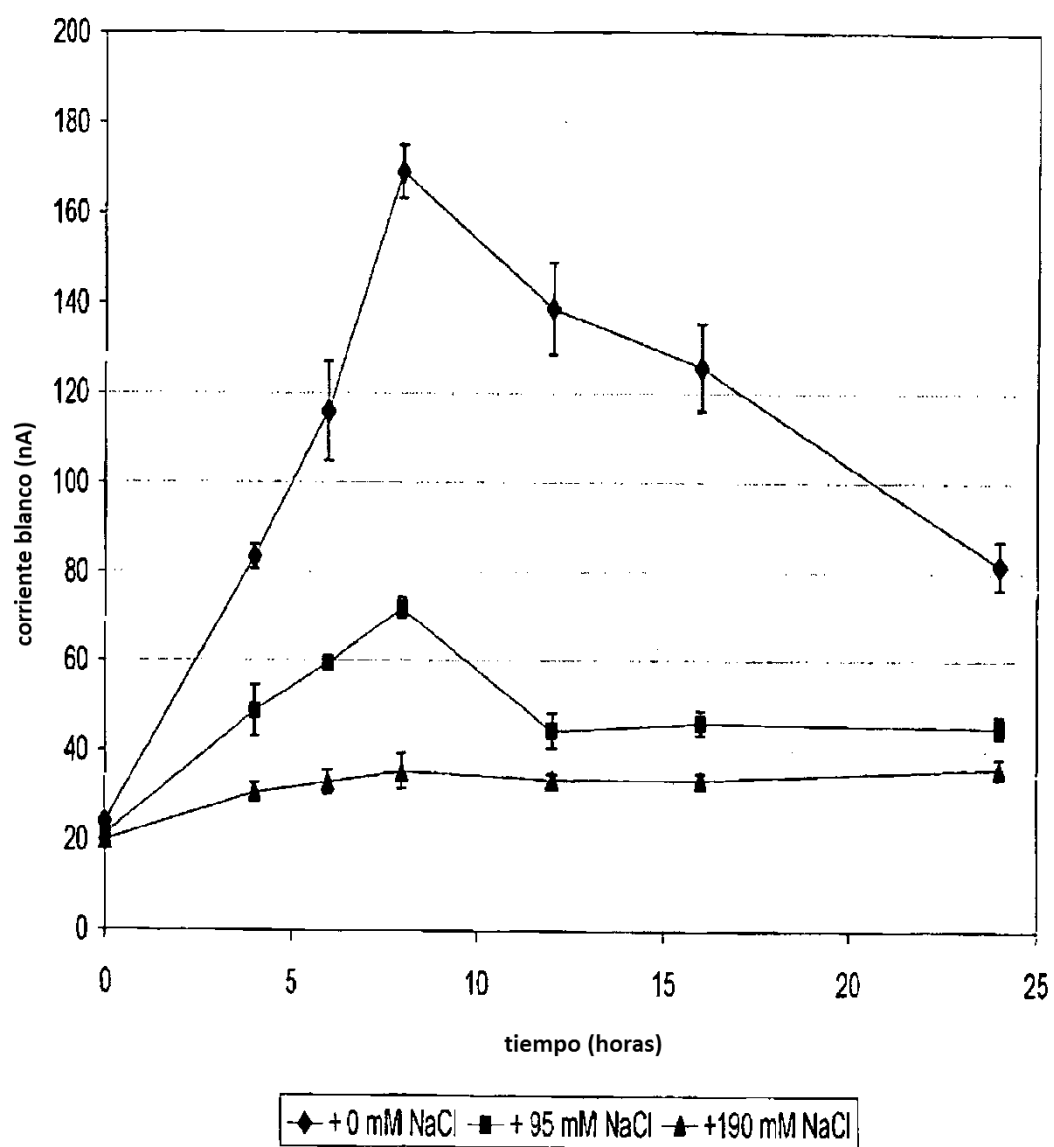
A. C. F. Rumondor, H. Konno, P. J. Marsac, L. S. Taylor, Analysis of the moisture sorption behavior of amorphous drug-polymer blends, *J. Appl. Polym. Sci.* 117 (2) (2010) 1055-1063.

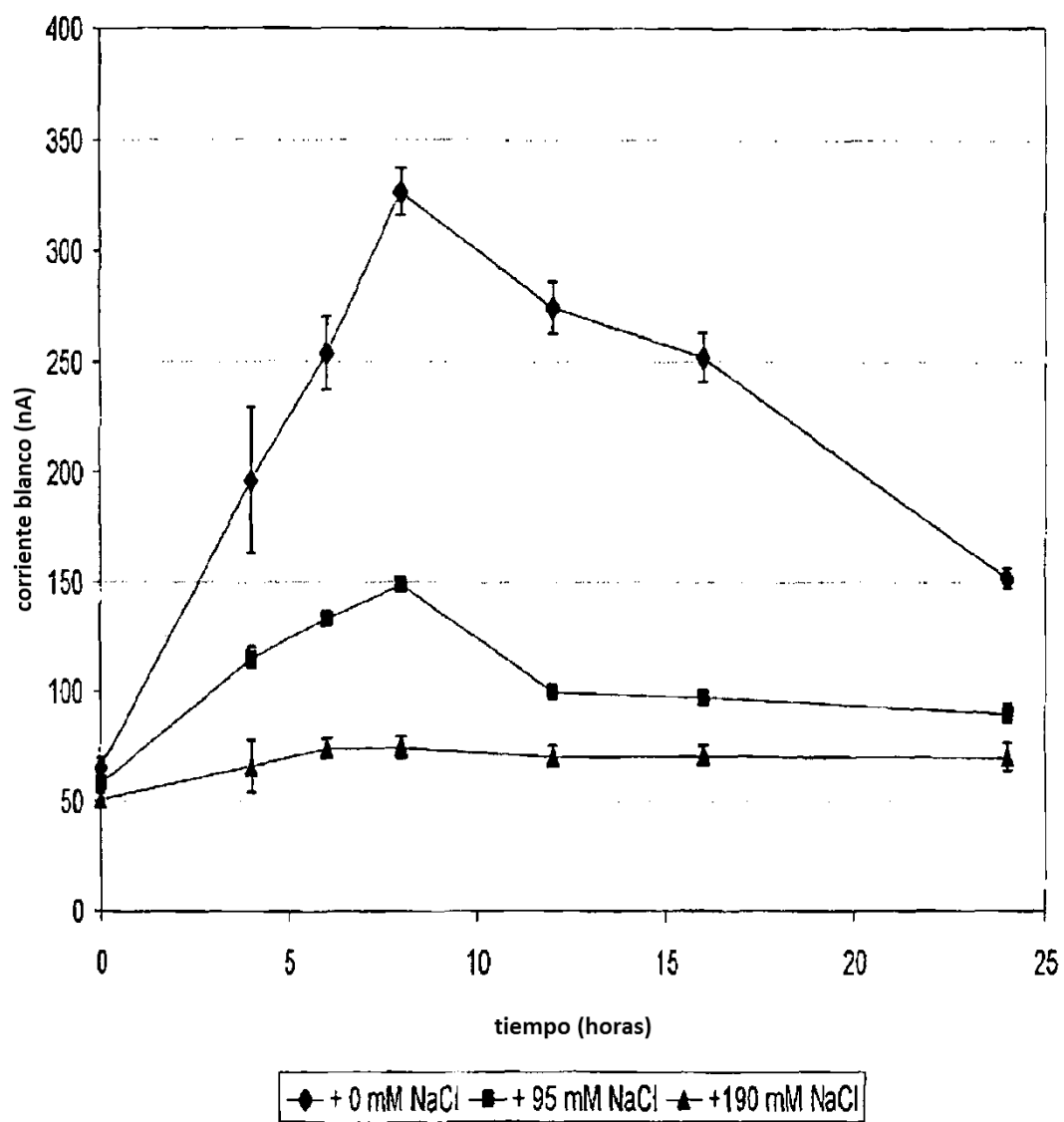
20 Aunque ciertas realizaciones preferidas se han descrito en detalle en la descripción anterior, las mismas han de considerarse como ilustrativas y no de carácter restrictivo, entendiéndose que la realización preferida ha sido mostrada y descrita y que se desea proteger todos los cambios, equivalentes y modificaciones que están comprendidas dentro del alcance de las invenciones tal como se definen por las siguientes reivindicaciones a proteger. Será evidente a partir de la descripción que los aspectos o características que se describen en un contexto o realización serán de aplicación en otros contextos o realizaciones

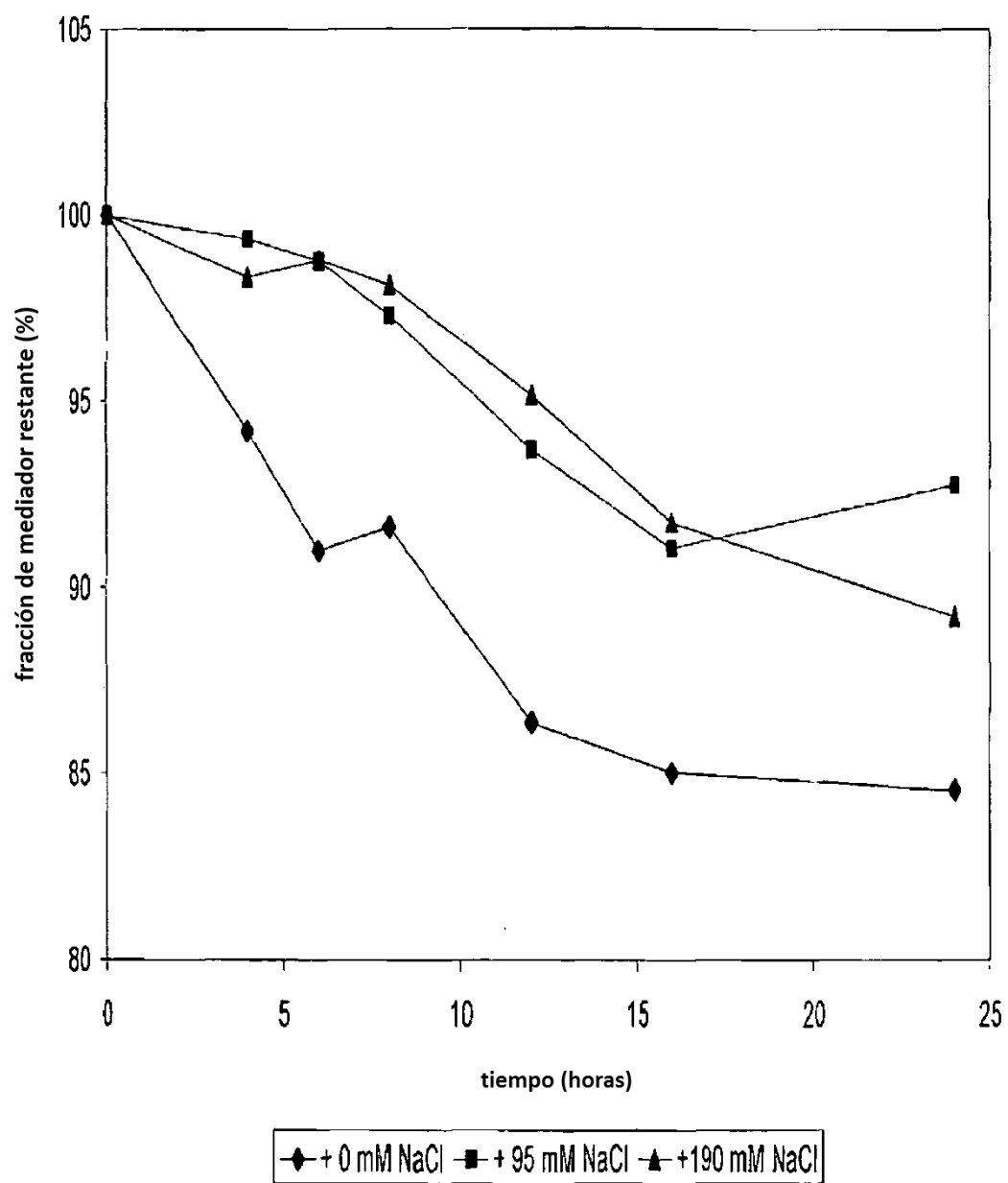
25

REIVINDICACIONES

1. Un elemento de prueba para determinar la cantidad de un analito en un fluido de muestra, que comprende:
 - a) un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;
 - b) una matriz de reactivo de película seca que se extiende entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y configurado para una reacción de electrodo; en el que dicha matriz de reactivo comprende un material delicuescente y uno o más componentes activos eficaces para facilitar una reacción electroquímica deseada, y en el que el material delicuescente se selecciona y proporciona en una cantidad eficaz para absorber de forma preventiva agua de la atmósfera cuando la humedad relativa supera un nivel predeterminado y en el que dicho material delicuescente tiene un punto de delicuescencia entre 50 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa, preferiblemente entre 70 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa y más preferiblemente 75 % de humedad relativa.
2. El elemento de prueba de la reivindicación 1, en el que dicho material delicuescente comprende uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de zinc, carbonato de potasio, fosfato de potasio, carnalita, citrato férrico amónico, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio; y preferiblemente comprende NaCl y/o MgSO_4 .
3. El elemento de prueba de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho elemento de prueba es una tira reactiva de un medidor de glucosa que tiene una matriz de reactivo de glucosa en el mismo, y en el que dicha matriz de reactivo de la tira reactiva incluye un sistema enzimático y un mediador.
4. El elemento de prueba de la reivindicación 3, en el que dicho sistema enzimático comprende la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) y/o el cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD).
5. El elemento de prueba de la reivindicación 3 o 4, en el que dicho mediador comprende un mediador nitrosoanilina.
6. El elemento de prueba de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha matriz de reactivo incluye un formador de película, comprendiendo preferiblemente dicho formador de película polivinilpirrolidona (PVP) y/o un material que contiene PVP.
7. El elemento de prueba de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material delicuescente se proporciona en una cantidad eficaz para absorber agua de la atmósfera a una velocidad que es más rápida que la velocidad a la que los otros componentes de la matriz de reactivo absorben agua de la atmósfera, en particular, cuando la humedad relativa en la atmósfera es superior al 75 %.
8. El elemento de prueba de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material delicuescente se selecciona y se proporciona en una cantidad eficaz para absorber preferiblemente agua de la atmósfera, en comparación con las propiedades de absorción de agua de los otros componentes reactivos, protegiendo así a los otros componentes del reactivo de matriz de la absorción de agua de la atmósfera cuando la humedad relativa supera el punto de delicuescencia del material delicuescente.
9. El elemento de prueba de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material delicuescente se proporciona en la matriz de reactivo en una cantidad eficaz para proporcionar de 1 % a 10 % en porcentaje de peso, preferiblemente al menos 2 % en porcentaje de peso, por ejemplo, entre 2 % y 8 % en porcentaje de peso, y más preferiblemente al menos 3 %, por ejemplo entre 3 % y 7 % en porcentaje de peso de material delicuescente en la matriz de reactivo seco, basado en el peso total de la matriz de reactivo seco.
10. El elemento de prueba de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material delicuescente es NaCl y se proporciona en la matriz de reactivo en una cantidad eficaz para proporcionar entre 3,0 % en porcentaje de peso y 6,0 % en porcentaje de peso de NaCl en la matriz de reactivo seco, basado en el peso total de la matriz de reactivo seco.
11. El elemento de prueba de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material delicuescente es MgSO_4 y se proporciona en la matriz de reactivo en una cantidad eficaz para proporcionar entre el 30 % en porcentaje de peso y el 7,0 % en porcentaje de peso de MgSO_4 en la matriz de reactivo seco, basado en el peso total de la matriz de reactivo seco.
12. Un método para mejorar la estabilidad de un elemento de prueba de biosensor con respecto a la degradación de los componentes de reactivo por la humedad en el aire, en el que el elemento de prueba comprende un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, y una matriz de reactivo de película seca que se extiende entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y configurado para una reacción de electrodo; comprendiendo el método proporcionar en la matriz de reactivo un material delicuescente seleccionado y en una cantidad eficaz para disminuir la sorción de agua del aire por otros componentes de la matriz de reactivo, y en el que dicho material delicuescente tiene un punto de delicuescencia entre 50 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa, preferiblemente entre 70 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa y más preferiblemente 75 % de humedad relativa.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

**Fig. 3**

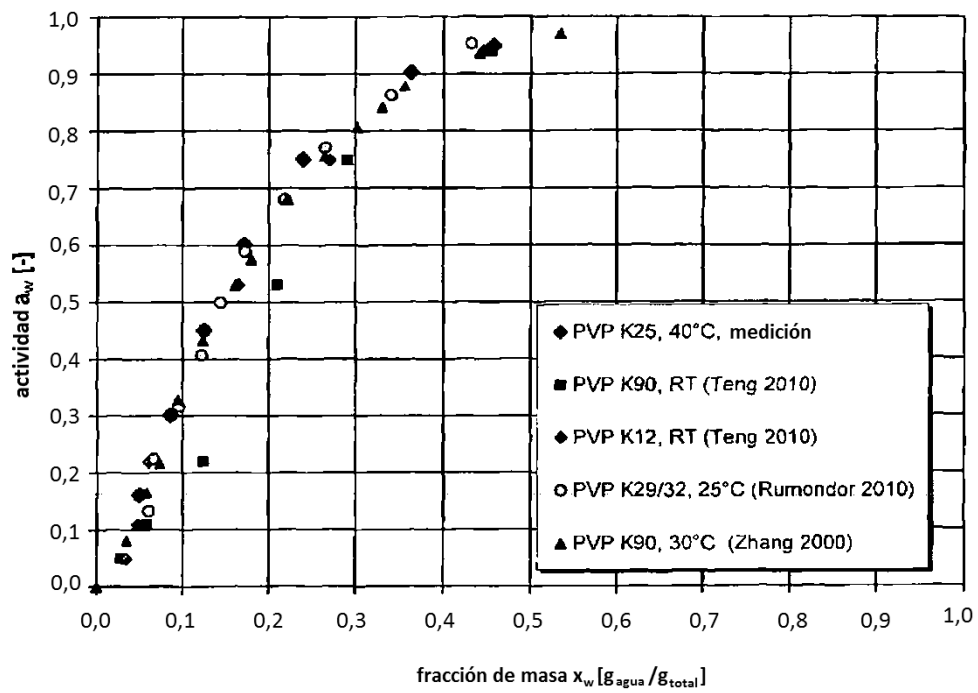


Fig. 4

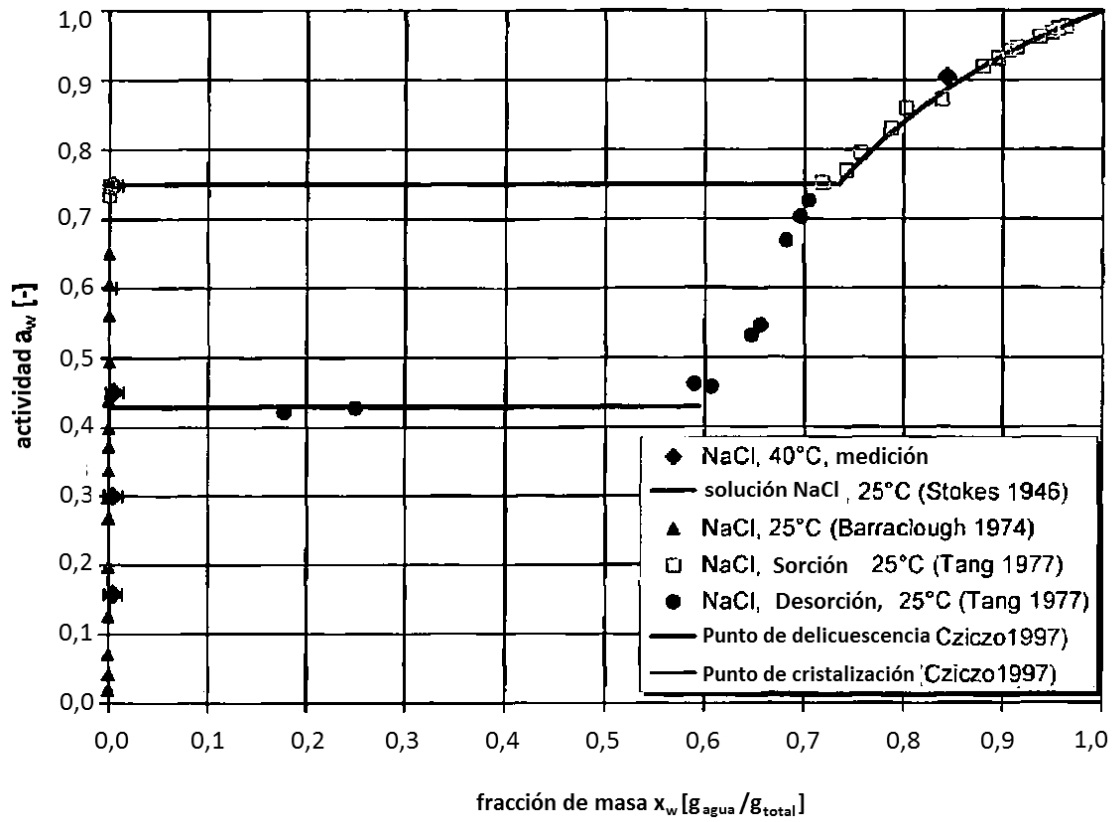


Fig. 5

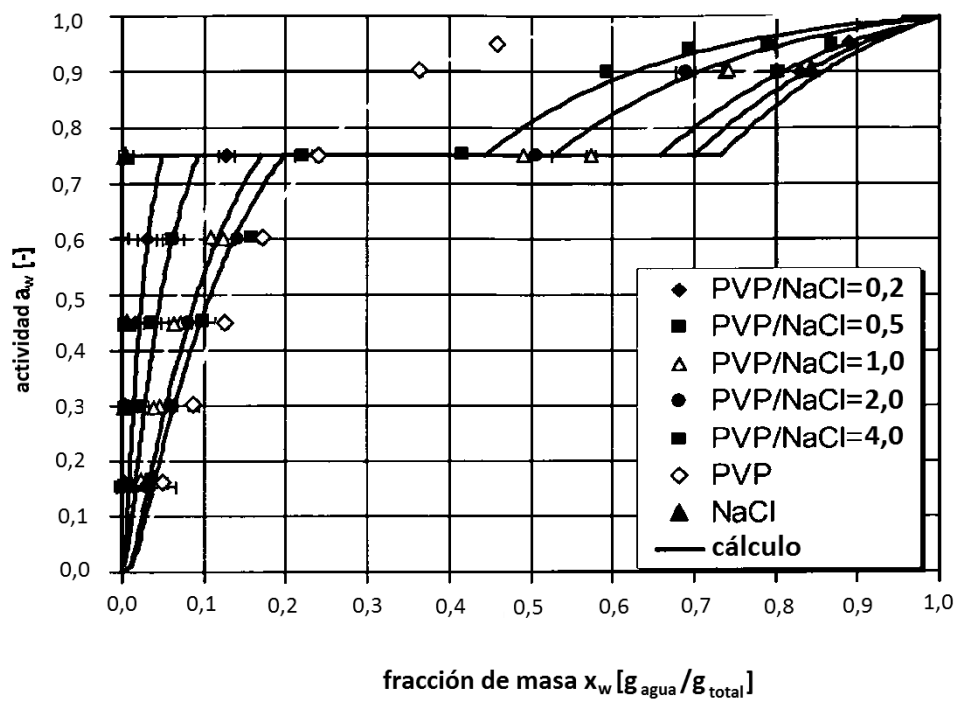


Fig. 6

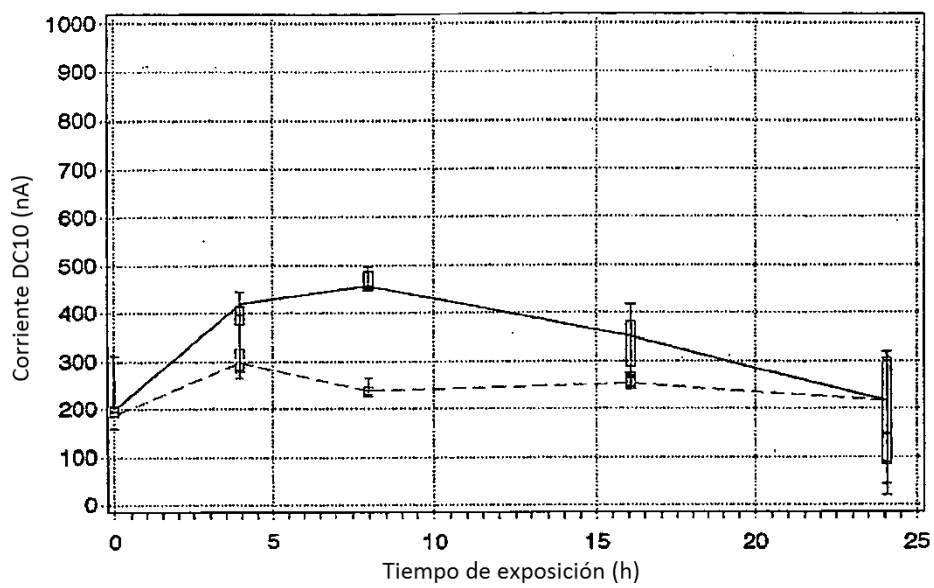


Fig. 7