

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 862**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/EP2013/054351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13131885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13707185 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2823052**

54 Título: **Soluto de ectoína compatible así como derivados del mismo para estabilización enzimática**

30 Prioridad:

**06.03.2012 EP 12158286**

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

**28.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHEMNITIUS, GABRIELE;  
GAA, OTTO;  
NAGEL, THOMAS y  
RECHT, KARL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 606 862 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

Soluto de ectoína compatible así como derivados del mismo para estabilización enzimática

5 La presente invención se refiere a medios y métodos para mantener y preservar la actividad enzimática. En particular, la invención se refiere a una composición seca que comprende una deshidrogenasa, un cofactor redox, un agente capaz de inducir al menos un cambio óptico en una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox, un reactivo indicador, y al menos un soluto compatible que es ectoína o un derivado de la misma. La invención contempla además un elemento de ensayo de diagnóstico para la determinación de un analito  
10 en una muestra de un fluido corporal y un método para la fabricación de tal elemento de ensayo. Adicionalmente la presente invención prevé el uso de al menos un soluto compatible tal como se ha mencionado anteriormente para reducir una disminución de la actividad enzimática de al menos una enzima en una composición en condiciones secas. Asimismo, se contempla un método para determinar la presencia o la cantidad de un analito en una muestra de fluido corporal basándose en el elemento de ensayo de acuerdo con la invención.

15 Los elementos de ensayo de diagnóstico se fabrican habitualmente para su uso en aplicaciones en el punto de atención del paciente. Por tanto, los elementos deben ser robustos con respecto a la manipulación y el almacenamiento. Esto incumbe, en particular, a la química de ensayo de los elementos de ensayo. (véase Hönes 2008, *Diabetes Technology & Therapeutics* 10: S10)

20 Sin embargo, muchos elementos de ensayo de diagnóstico se basan en una química de ensayo de enzimas más bien complejas presentes en el elemento de ensayo. En particular, el elemento de ensayo comprende un soporte y una capa de detección en el que la capa de detección contiene normalmente enzimas. Es decisivo para la función apropiada de los elementos de ensayo que estas enzimas permanezcan biológicamente activas durante el almacenamiento y tras el tratamiento. Puesto que no es posible generalmente la calibración para una medición individual, los elementos de ensayo se calibran normalmente por lotes. La información de calibración para un lote de elementos de ensayo se almacena y se usa para cada elemento del lote independientemente de las diferencias individuales en el tratamiento y almacenamiento.

30 Sin embargo, los pretratamientos de los elementos de ensayo y las condiciones de almacenamiento pueden influir seriamente en la actividad de las enzimas. Por ejemplo, el tratamiento térmico, durante la fabricación o el almacenamiento de los elementos de ensayo puede desnaturalizar las enzimas de modo que la actividad enzimática global presente en un elemento de ensayo se reduce significativamente, lo cual, a su vez, dará lugar a resultados del ensayo erróneos cuando se use tal elemento de ensayo. Análogamente, muchas enzimas son sensibles con respecto a los procesos de oxidación que dan lugar también a la desnaturalización e inactivación irreversible de las enzimas. Sin embargo, sobre los elementos de ensayo hay presentes muchas enzimas, al menos durante el tiempo de almacenamiento, en un entorno sin disolvente que puede promover incluso tales procesos de oxidación. Asimismo, la capa de detección puede comprender componentes adicionales que facilitan aún más los procesos de oxidación tales como cofactores redox y otros componentes redox relevantes.

40 El problema de preservar las actividades enzimáticas en condiciones tan desfavorables, sin embargo, no incumbe solamente a los elementos de ensayo. Antes bien, de modo más general, se proporcionan y se almacenan muchas preparaciones de enzimas en una forma esencialmente sin disolvente, tal como preparaciones liofilizadas.

45 Se han investigado diversos de los denominados solutos compatibles, es decir, compuestos de bajo peso molecular de diferentes clases químicas, tales como azúcares, polioles, aminoácidos libres, derivados de aminoácidos, aminos y análogos de azufre ésteres de sulfato, péptidos cortos y 2,3-difosfoglicerato cíclico, por sus propiedades conservantes para proteínas en solución y en condiciones secas (véanse Arakawa 1985, *Biophys J* 47: 411; Lippert 1992, *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 61; Göller 1999, *J Mol Catal B Enzymatic* 7:37; Lentzen 2006, *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 623; y los documentos WO2007/002657 y US2010/0255120).

50 La estabilización de la glucosa oxidasa por la ectoína y la hidroxiectoína en biosensores para la determinación electroquímica de glucosa en solución se ha comunicado previamente (documento WO2007/097653; Loose 2006, *Proceedings of the 24th IASTED International Multi-conference Biomedical Engineering*, 167-173, Innsbruck, AT). Sin embargo, la glucosa oxidasa es conocida por ser una enzima bastante estable con respecto al estrés oxidativo y al calor. Por otro lado, se comunicó que la hidroxiectoína era incapaz de prevenir la agregación de proteínas en solución para la lactato deshidrogenasa (Andersson 2000, *Biotechnol Appl Biochem* 32: 145-153). Las deshidrogenasas en general y las glucosa deshidrogenasas, en particular, son enzimas bastante sensibles al estrés oxidativo y al tratamiento térmico. Estas son, sin embargo, importantes herramientas de diagnóstico.

60 Se ha notificado la ectoína como agente en biosensores de colesterol que comprenden colesterol deshidrogenasa dirigidos a la detección electroquímica de la actividad enzimática (WO2007/132226 o WO2006/067424).

65 No obstante, existe la necesidad de preservar la actividad enzimática de enzimas sensibles al almacenamiento y a la temperatura usadas en aplicaciones diagnósticas y, en particular, para la clase de las deshidrogenasas, tales como la glucosa deshidrogenasa.

El problema técnico que subyace a la presente invención se podría considerar la provisión de medios y métodos para satisfacer las necesidades mencionadas anteriormente. El problema se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en la presente descripción a continuación.

5 Así pues, la presente invención se refiere a una composición seca tal como se divulga en las reivindicaciones 1 a 5.

10 El término "seca", tal como se usa en el presente documento, significa que la composición carece esencialmente de un disolvente o una mezcla de disolventes. "Carece esencialmente", tal como se usa en el presente documento, significa que al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % del disolvente o mezcla de disolventes que estaba originalmente presente en una solución de la composición se ha eliminado de la composición. De acuerdo con esto, preferentemente se prevé que el disolvente o mezcla de disolventes esté presente en la composición seca de la invención en una cantidad de hasta un 15 % y, preferentemente, de hasta un 10 %, hasta un 8 %, hasta un 5 %, hasta un 2%. Los valores porcentuales mencionados anteriormente y otros valores porcentuales a los que se hace referencia en el presente documento usados para definir cantidades se refieren a porcentajes en peso (p/p).

15 Tal composición de la invención es preferentemente una composición sólida en condiciones normales, es decir, a temperatura ambiente y a presión normal.

20 Un disolvente de acuerdo con la presente invención es un disolvente que permite disolver los componentes de la composición de la presente invención en condiciones que no afectan irreversiblemente a la función de los componentes de la composición y, en particular, a la actividad enzimática de la deshidrogenasa. Asimismo, se prevé que el disolvente disuelva los componentes, preferentemente a una presión convencional, preferentemente 0,1 MPa  $\pm$  10 % en un intervalo de temperaturas de 5 a 40 °C y, más preferentemente, a temperatura ambiente, 20 °C  $\pm$  10 °C. m Disolventes adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen, preferentemente, agua, tampones basados en agua, tales como solución salina tamponada con fosfato o tampones Tris, alcoholes tales como hexanol, 2-metoxi-propanol, 2-metil-2-butanol, tampón citrato, fosfato de glicerina, o tampón de Good (preferentemente en adición al tampón Tris). Se entenderá que, de acuerdo con la presente invención, un disolvente que se va a usar puede ser una mezcla de dos o más de los disolventes mencionados anteriormente. Mezclas de disolventes preferentes previstas en este contexto son mezclas de agua o tampones basados en agua con alcoholes y, en particular, las mezclas de disolventes a las que se hace referencia en los Ejemplos adjuntos que siguen a continuación.

35 Una composición seca de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar, preferentemente, disolviendo los componentes de la composición de la presente invención primero en un disolvente o una mezcla de disolventes y posteriormente eliminando dicho disolvente o mezcla de disolventes mediante un tratamiento adecuado de modo que la composición remanente carezca esencialmente de dicho disolvente o mezcla de disolventes. Tratamientos adecuados previstos preferentemente por la presente invención incluyen tratamiento térmico, técnicas de evaporación, liofilización. Preferentemente, el tratamiento previsto es el tratamiento térmico y, en particular, el tratamiento térmico en las siguientes condiciones: tratamiento térmico a aproximadamente 60 °C o más durante aproximadamente un periodo de 20 a 45 minutos o a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente un periodo de 1 a 2 minutos con circulación de calor; espesor de la composición de 20 a 200 micrómetros o inferior; a una presión de 0,1 MPa o 0,01 MPa. Asimismo, se entenderá que a fin de mantener la composición en condiciones secas, el almacenamiento se lleva a cabo preferentemente en presencia de un agente desecante. Agentes desecantes adecuados incluyen, preferentemente, gel de sílice, zeolitas, carbonato de calcio o sulfato de magnesio.

50 El término "deshidrogenasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la oxidación de un sustrato mediante transferencia de hidruros (H<sup>-</sup>) como equivalentes redox a una molécula aceptora, preferentemente a un cofactor redox tal como se hace referencia en otra parte del presente documento. Las deshidrogenasas previstas por la presente invención son, preferentemente, aquellas que dependen de un cofactor redox (o denominado a veces co-enzima) tales como pirrolo quinolina quinona (PQQ), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), o un derivado de los mismos, o un cofactor de flavina, tal como flavina adenina dinucleótido (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN). Las deshidrogenasas preferentes son, en particular, lactato deshidrogenasa (número EC 1.1.1.27 o 1.1.1.28), glucosa deshidrogenasas (véase más abajo), alcohol deshidrogenasa (número EC 1.1.1.1 o 1.1.1.2), L-aminoácido deshidrogenasa (número EC 1.4.1.5), glicerina deshidrogenasa (número EC 1.1.1.6), malato deshidrogenasa (número EC 1.1.1.37), 3-hidroxitbutirato deshidrogenasa (número EC 1.1.1.30), o sorbitol deshidrogenasa (número EC 1.1.1.14).

60 La deshidrogenasa de la invención es una glucosa deshidrogenasa. Más preferentemente, dicha glucosa deshidrogenasa se selecciona entre el grupo que consiste en: glucosa deshidrogenasa (número EC 1.1.1.47), quinoproteína glucosa deshidrogenasa (número EC 1.1.5.2), en particular, glucosa deshidrogenasa dependiente de pirrolo quinolina quinona (PQQ) (número EC 1.1.5.2), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (número EC 1.1.1.49), glucosa deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (número EC 1.1.1.119), y glucosa deshidrogenasa dependiente de flavina adenina dinucleótido (FAD) (número EC 1.1.99.10) o mutantes enzimáticamente activos de las mismas. De acuerdo con la presente invención es preferente un mutante de glucosa deshidrogenasa (número E.C. 1.1.1.47) divulgado en el documento WO2011/020856 que tiene una mutación de al

menos una posición de los aminoácidos 96, 170 y/o 252, que se incorpora por referencia en el presente documento. Mutaciones preferentes previstas en estas posiciones de aminoácido son sustituciones de Glu96Gly, Glu170Arg o Lys y/o Lys252Leu.

5 La estructura y propiedades de miembros preferentes de dichas familias de enzimas son bien conocidas en la técnica (véanse Olsthoorn 1998, *Biochemistry* 37: 13854-13861; Pauly 1976, Hoppe Seylers *Z Physiol Chem* 356: 1613-1623; Tsujimura 2006, *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 654-659). Mutantes enzimáticamente activos de las enzimas mencionadas anteriormente se pueden obtener sustituyendo, añadiendo o eliminando uno o más aminoácidos de las secuencias de aminoácidos notificadas para las enzimas de tipo silvestre mencionadas  
10 anteriormente en la técnica anterior, tal como se ha enumerado previamente. Los mutantes preferentes son los mutantes de la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ que tienen una especificidad por el sustrato mejorada en comparación con la homóloga de tipo silvestre tal como se divulga en los documentos US 7.132.270 o US 7.547.535. Ambos documentos se incorporan por referencia en el presente documento con respecto a los mutantes. Mutantes adicionales son los divulgados en Baik et al. (Baik 2005, *Appl Environ Microbiol* 71: 3285), Vasquez-Figuera et al. (Vasquez-Figuera 2007, *Chem BioChem* 8: 2295), y el documento WO 2005/045016.

El término "cofactor redox", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que puede actuar como aceptor para equivalentes redox transferidos enzimáticamente y, en particular, hidruro (H<sup>-</sup>). Preferentemente, el cofactor redox es PQQ, NAD o FAD. Se ha de entender que el cofactor redox que se va a incluir en la composición de la presente invención depende de las propiedades de la deshidrogenasa prevista. Por ejemplo, la PQQ se combina en una composición de acuerdo con la presente invención con una glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ, el NAD se combina en una composición de acuerdo con la presente invención con una glucosa deshidrogenasa dependiente de NAD, y el FAD se combina en una composición de acuerdo con la presente invención con una glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD. Un cofactor redox de acuerdo con la presente  
20 invención puede ser preferentemente un derivado de PQQ, NAD o FAD. Derivados preferentes de NAD son los divulgados en el documento WO 2007/012494 que se incorpora por referencia en el presente documento con respecto a los derivados NAD/NADH y/o NADP/NADPH divulgados. Más preferentemente, el cofactor redox de acuerdo con la presente invención es carba-NAD tal como se divulga en el documento WO 2007/012494.

30 La ectoína (número CAS: 96702-03-3) es un compuesto orgánico bien conocido que se produce de forma natural en bacterias y que tiene la fórmula C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También se denomina ácido (S)-2-metil-3,4,5,6-tetrahidropirimidina-4-carboxílico. La ectoína se puede obtener de diversas bacterias, en particular del género *Halomonadaceae* o *Firmicutes*, mediante técnicas bien conocidas en la técnica (véase el documento WO1994/15923).

35 Un "derivado" de ectoína, al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención, es una molécula orgánica estructuralmente relacionada capaz de prevenir una reducción de la actividad enzimática de al menos una enzima a la que se hace referencia en el presente documento en solución así como en estado seco. Preferentemente, dicha reducción de la actividad enzimática se previene de un modo similar o igual y/o en un grado similar o igual que el encontrado para la ectoína. Más preferentemente, el derivado de ectoína, si está presente en una composición de  
40 acuerdo con la invención, deberá ser capaz de prevenir la reducción de la actividad enzimática que se produce durante la fabricación y/o el almacenamiento, en particular el almacenamiento, a temperatura ambiente o incluso a temperaturas mayores tales como 45 °C o 50 °C, o incluso a temperaturas de hasta 60 °C, en un grado estadísticamente significativo. Preferentemente, el derivado, si está presente en la composición, será capaz de mantener al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % de la actividad enzimática de al menos una enzima en la composición en comparación con la actividad enzimática encontrada en una composición de control sin dicho derivado de ectoína. La prevención de la reducción de la actividad enzimática en condiciones secas se puede determinar tal como se describe en otra parte del presente documento, por ejemplo, en los Ejemplos adjuntos. Preferentemente, dicho derivado de ectoína se selecciona entre el grupo que consiste en: hidroxiectoína, homoectoína, un éster de hidroxiectoína, un éter de hidroxiectoína, un derivado de sulfonilo de ectoína, un derivado de sulfonilo esterificado de ectoína y una amida de un derivado de sulfonilo de ectoína. Al igual que la ectoína, la hidroxiectoína se puede obtener de diferentes bacterias, en particular del género *Halomonadaceae* o *Firmicutes*, mediante técnicas bien conocidas en la técnica (véase el documento WO1994/15923). Los otros derivados de ectoína mencionados anteriormente se pueden obtener, por ejemplo, mediante derivatización química de hidroxiectoína *in vitro*.

55 Al menos un soluto compatible al que se hace referencia en el presente documento significa que se pueden usar dos o más solutos compatibles juntos en la composición de la presente invención. Preferentemente, la ectoína y uno o más derivados de la misma se pueden aplicar en la composición de la invención. La hidroxiectoína es un derivado preferente en este contexto. Además, se puede aplicar también una combinación de derivados de ectoína, tales como hidroxiectoína y homoectoína.

60 El término "equivalentes redox", tal como se usa el presente documento, se refiere a los hidruros (H<sup>-</sup>) que se transfieren de un sustrato de la deshidrogenasa al cofactor redox o a los electrones transferidos al reactivo indicador desde el cofactor redox.

65

El término "agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox" se refiere a una molécula que, en presencia de los equivalentes redox, es capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica del reactivo indicador. Se ha de entender que, de acuerdo con la presente invención, el agente puede inducir también un cambio en más de una propiedad óptica del reactivo indicador que se puede detectar posteriormente. Una propiedad óptica a la que se hace referencia en el presente documento se refiere a una propiedad del reactivo indicador que se puede detectar ópticamente tal como la polarización, refracción, reemisión, emisión o absorción de la luz y propiedades asociadas a las mismas. Se ha de entender que tal cambio en al menos una propiedad óptica, tal como se usa en el presente documento, engloba la detección de la presencia de una propiedad que no era detectable antes, la detección de la ausencia de una propiedad que se había detectado antes y la detección de cambios cuantitativos de una propiedad, es decir, la detección del cambio de la intensidad de la señal que se correlaciona con el grado del cambio de la al menos una propiedad óptica. Propiedades ópticas preferentes previstas por la presente invención son el color, la fluorescencia, la luminiscencia, o la refractometría. Las propiedades ópticas que van a ser cambiadas por el agente previsto de acuerdo con la presente invención dependen del tipo de reactivo indicador. Dependiendo de la propiedad óptica deseada que se va a detectar y del agente que se va a usar en la composición, el experto en la materia está en posición de seleccionar sin más un reactivo indicador adecuado, en particular entre los reactivos indicadores a los que se hace referencia en otra parte del presente documento.

Un agente al que se hace referencia anteriormente es capaz, preferentemente, de transferir directa o indirectamente, es decir, mediante un mediador adicional, equivalentes redox del cofactor redox al reactivo indicador. Como consecuencia de dicha transferencia de equivalentes redox, el reactivo indicador será modificado de tal manera que se produzca un cambio en al menos una propiedad óptica. Por ejemplo, un reactivo indicador incoloro o no fluorescente en estado oxidado puede convertirse en un reactivo indicador coloreado o fluorescente mediante la transferencia de equivalentes redox mediada por el agente en estado reducido. La transferencia de equivalentes redox puede ser directa, en la que los equivalentes redox son transferidos por el agente al reactivo indicador, o puede ser indirecta. En este último caso, los equivalentes redox se transfieren desde el agente hasta un mediador intermedio que transfiere posteriormente los equivalentes redox al reactivo indicador. Se debe entender que se puede usar, preferentemente, más de un mediador. Por ejemplo, el agente puede transferir los equivalentes redox a un primer mediador que posteriormente transfiere los equivalentes redox a un segundo mediador y dicho segundo mediador transfiere después los equivalentes redox al reactivo indicador. Se ha de entender que en tal cascada de mediadores se podrían usar más de dos mediadores. Una ventaja de usar uno o más mediadores para la transferencia de equivalentes redox al reactivo indicador es que se puede mejorar la elección del momento de la detección óptica.

Mediadores que se pueden aplicar en el contexto de la presente invención son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ferrocianuro potásico, derivados de quinona, azul de Nilo (número CAS: 3625-57-8), azul de Meldola (número CAS: 7057-57-0), complejos de osmio tal como se divulga en el documento EP 1 457 572 B1, incorporado por referencia en el presente documento, o complejos de metales de transición tales como cloruro de hexamino rutenio.

Un agente de acuerdo con la invención que se prevé preferentemente es una fenazina. Más preferentemente, dicha fenazina es etosulfato de fenazina, metosulfato de fenazina, trifluorometanosulfonato de 1-(3-carboxipropoxi)-5-etilfenazinio o metosulfato de 1-metoxifenazina. Tales fenazinas se pueden aplicar para inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador. Detalles para la detección y de cómo se han de aplicar tales fenazinas se pueden encontrar en el documento EP 0 654 079 A1 que se incorpora por referencia en el presente documento.

Asimismo, un agente previsto en este contexto es preferentemente una quinona. Más preferentemente, dicha quinona es fenantrenoquinona, fenantrolinquinona, o benzo[h]-quinolinquinona.

Otro agente previsto en este contexto es una nitrosoanilina. Más preferentemente, dicha nitrosoanilina es clorhidrato de [(4-nitrosfenil)imino]dimetanol.

También previsto preferentemente por la presente invención es un agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox, siendo dicho agente una enzima capaz de catalizar la transferencia de equivalentes redox desde el cofactor redox al reactivo indicador. Más preferentemente, la enzima prevista en este contexto de acuerdo con la presente invención es una diaforasa (número EC 1.6.99.2), preferentemente una lipoamida deshidrogenasa o una NADH deshidrogenasa o un mutante enzimáticamente activo de las mismas. Diaforasas preferentes son las de corazón de cerdo, *Clostridium kluyverii* o *Bacillus stearothermophilus*. La estructura de dichas enzimas es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en el documento DE 2 061 984. Se pueden proporcionar mutantes enzimáticamente activos tal como se describe en otra parte del presente documento. Diaforasas particularmente preferentes previstas de acuerdo con la presente invención son las que tienen una termoestabilidad y unas propiedades catalíticas mejoradas tal como se divulga en el documento US2007/196899 que se incorpora por referencia en el presente documento con respecto al contenido divulgativo correspondiente.

Preferentemente, el soluto compatible reduce una disminución de la actividad enzimática de al menos una enzima en la composición en condiciones secas. Más preferentemente, dicha al menos una enzima es la deshidrogenasa. Más preferentemente, la al menos una enzima puede ser, no obstante, también ambas, la deshidrogenasa así como una enzima, preferentemente una diaforasa tal como se ha especificado anteriormente, que se aplica en la composición de la presente invención como agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox. Más preferentemente, la disminución de la actividad enzimática es prevenida o al menos es reducida significativamente en la composición de la invención durante la fabricación y/o el almacenamiento a temperatura ambiente, o incluso a temperaturas mayores a las que se hace referencia anteriormente, por parte del al menos un soluto compatible en comparación con una composición de control sin dicho soluto compatible de modo que al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % de la actividad enzimática de una o ambas enzimas se mantenga.

El término "reactivo indicador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o una entidad molecular que, como consecuencia de la transferencia de equivalentes redox, será modificada de tal manera que se produzca un cambio en al menos una propiedad óptica.

Reactivos indicadores preferentes para su aplicación en la composición de la invención engloban heteropoliácidos, preferentemente, ácido 2,18-fosfomolibdénico, quinonas, preferentemente resazurina, diclorofenolindofenol, y/o sales de tetrazolio, preferentemente, las sales disponibles en el mercado WST-3, WST-4 y WST-5 (Dojindo, Inc. EE.UU.). Estos reactivos indicadores se reducen tras la transferencia de los equivalentes redox y esta reducción va acompañada de un cambio en al menos una propiedad óptica y, en particular, el color.

Reactivos indicadores preferentes adicionales previstos de acuerdo con la presente invención son reactivos tales como los fluoróforos, cuya fluorescencia cambia tras la transferencia de los equivalentes redox. Fluoróforos adecuados incluyen, entre otros, los nucleótidos de flavina y los nicotina adenina dinucleótidos a los que se hace referencia en otra parte en el presente documento también en el contexto de los cofactores redox. Si un cofactor redox tal como carba-NAD o NAD se aplica en la composición de la invención como reactivo indicador, los componentes (b), (c) y (d) de la composición de la invención puede estar todos representados por la misma molécula, es decir, carba-NAD o NAD. De acuerdo con esto, los componentes (b), (c) y (d) pueden estar representados en la composición de la invención por la misma entidad química. Asimismo, se puede usar preferentemente una nitrosoanilina modificada tal como se divulga en los documentos EP 0 620 283 B1 o EP 0 831 327 B1, cuyo contenido descriptivo respectivo se incorpora por referencia en el presente documento, como componente (c) y componente (d). Así, los componentes (c) y (d) pueden estar representados en la composición de la invención por la misma entidad química.

Los procedimientos para eliminar el disolvente de una composición a los que se ha hecho referencia anteriormente en el presente documento y, en particular, el tratamiento térmico, son conocidos por influir en la actividad enzimática, en particular en la actividad enzimática de enzimas sensibles tales como las deshidrogenasas. Además, en condiciones secas, enzimas tales como las deshidrogenasas llegan a ser más sensibles a procesos de oxidación y la desnaturalización enzimática asociada (Andersson 2000, *Biotechnol. Appl. Biochem* 32: 145-153). De acuerdo con esto, la fabricación de composiciones secas complejas para ensayos de detección enzimática, así como el almacenamiento de las mismas, va acompañado con frecuencia de un aumento de la inactivación de las enzimas por desnaturalización, agregación u otros procesos. Tras la reconstitución de las enzimas en un entorno que contiene disolvente, se observa frecuentemente una disminución de la actividad enzimática. Ventajosamente, en los estudios subyacentes a la presente invención se ha encontrado que la reducción de dicha actividad enzimática que se produce durante la fabricación y/o el almacenamiento de las composiciones secas complejas de la presente invención se puede prevenir significativamente mediante la adición del al menos un soluto compatible, tal como se ha especificado con detalle en otra parte del presente documento. El descubrimiento es sorprendente ya que se ha notificado que la ectoína y derivados de la misma son insuficientes para prevenir la agregación, por ejemplo, de la lactato deshidrogenasa lo que también da como resultado una reducción de la actividad enzimática (Andersson 2000, *loc cit.*). Además, también es sorprendente que el efecto preservativo se produce incluso en las condiciones redox sensibles presentes en la composición más bien compleja carente de disolvente de la presente invención. De modo interesante, y también sorprendente, no se observó un efecto preservativo de la ectoína en solución para las deshidrogenasas investigadas. En particular, la actividad enzimática presente en una composición seca que tiene los componentes de la composición de la invención excepto el al menos un soluto compatible se ha encontrado en los estudios subyacentes a la presente invención que disminuye en el estado seco y durante el almacenamiento en condiciones secas y a temperaturas por encima de 4 °C. En particular, se ha encontrado que solo aproximadamente un 50 % de la actividad enzimática de, por ejemplo, una glucosa deshidrogenasa está presente tras 3 semanas de almacenamiento a 45 °C y solo aproximadamente un 55 % de la actividad enzimática de, por ejemplo, una diaforasa se mantiene en dichas condiciones. Sin embargo, se podían mantener actividades enzimáticas significativamente mayores en los estudios que subyacen a la presente invención cuando estaba presente en la composición el al menos un soluto compatible que era ectoína o un derivado de la misma. Una ventaja adicional de la composición de la presente invención es que el soluto compatible aplicado en la composición no interfiere con el sistema de detección óptica. En particular, no interfiere con las señales ópticas generadas ni tampoco afecta a la estabilidad o la función del reactivo indicador, el cofactor redox, o el agente capaz de inducir el al menos un cambio óptico. Asimismo, la conversión enzimática y las tasas de conversión no se ven afectadas, preferentemente, por el soluto

compatible.

5 En una realización preferente de la composición de la presente invención, el soluto compatible está presente en cantidades de al menos un 3 % (p/p), al menos un 4 % (p/p), al menos un 5 % (p/p), al menos un 6 % (p/p), al menos un 7 % (p/p) o al menos un 8 % (p/p).

10 En una realización preferente de la composición de la presente invención, dicha composición comprende además al menos un estabilizante, un detergente, un agente de hinchamiento, un agente formador de película, y/o una partícula sólida. Estabilizantes, detergentes, agentes de hinchamiento, agentes formadores de película, agentes oxidantes y/o partículas sólidas adecuados para su uso en la composición de la invención son conocidos por el experto en la materia.

Preferentemente, el dicho al menos un estabilizante es polivinilpirrolidona y, más específicamente, PVP K25.

15 Preferentemente, el dicho al menos un detergente se selecciona entre el grupo que consiste en: N-metil-n-oleoil-taurato de sodio, N-octanoil-N-metil-glucamida, Mega 8 (N-metil-N-octanoil-glucamida), sulfosuccinato de dioctil-sodio (DONS), Rhodapex® (preferentemente CO-433 o CO-436).

20 Preferentemente, el dicho al menos un agente de hinchamiento se selecciona entre el grupo que consiste en: copolímero de metil vinil éter y anhídrido de ácido maleico, goma de xantano y copolímero de metil vinil éter y ácido maleico.

25 Preferentemente, el dicho al menos un agente formador de película se selecciona entre el grupo que consiste en: dispersiones de propionato de polivinilo, ésteres polivinílicos, acetatos polivinílicos, ésteres poliacrílicos, ácido polimetacrílico, polivinil amidas, poliamidas, poliestireno y también son adecuados polimerizados mixtos tales como de butadieno, estireno o éster de ácido maleico.

30 Preferentemente, la dicha al menos una partícula sólida se selecciona entre el grupo que consiste en: partículas de sílice, en particular, dióxido de silicio, silicatos de sodio o silicatos de aluminio, tierra de diatomeas, óxidos metálicos, en particular, óxido de titanio y/o óxido de aluminio, materiales de óxidos sintéticos, en particular, nanopartículas de materiales de óxidos tales como nanopartículas de dióxido de silicio, óxido de aluminio, u óxido de titanio, caolín, polvo de vidrio, sílice amorfa, sulfato de calcio, y sulfato de bario.

35 En una realización particularmente preferente de la composición de la invención, dicha composición comprende e, incluso más preferentemente, consiste esencialmente en los componentes enumerados en la Tabla 1 de los Ejemplos adjuntos.

40 Todas las definiciones y explicaciones para los términos elaborados anteriormente en el presente documento se aplican *mutatis mutandis* a las realizaciones descritas a continuación. Definiciones y explicaciones adicionales elaboradas adicionalmente más adelante también se aplican *mutatis mutandis* a todas las realizaciones descritas en esta memoria descriptiva.

45 La presente invención se refiere a un elemento de ensayo de diagnóstico para la determinación de un analito en una muestra de un fluido corporal que comprende la composición de la presente invención y un soporte.

50 El término "soporte" usado en el contexto de la presente invención se refiere a un soporte sólido al que se puede aplicar la composición de la presente invención. Preferentemente, la composición se puede inmovilizar sobre el soporte. Además, se prevé también que la composición se puede disponer espacialmente sobre el soporte. El soporte se puede disponer de una manera tal que permita la detección del cambio de la al menos una propiedad óptica del reactivo indicador, es decir, preferentemente no comprende componentes o disposiciones espaciales que interfieran con la detección de la al menos una propiedad óptica. Soportes adecuados pueden comprender viales que contienen la composición de la presente invención, por ejemplo, viales dispuestos en un formato de placa con pocillos. Otros ensayos pueden aplicar guíasondas ópticos o placas semiconductoras. Soportes preferidos son, no obstante, los usados para las tiras de ensayo. Dichas tiras de ensayo comprenden normalmente una o más capas que forman un soporte sólido.

60 El término "muestra de un fluido corporal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los fluidos corporales de los que se conoce o se sospecha que comprenden el analito que se va a determinar. Fluidos corporales preferentes conocidos por comprender una pluralidad de analitos diagnósticamente relevantes son la sangre, incluyendo sangre completa, plasma y suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, y sudor. Más preferentemente, la muestra de fluido corporal de acuerdo con la presente invención es una muestra de sangre completa.

65 El término "analito", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula biológica presente en la muestra de fluido corporal, cuya presencia, ausencia o cantidad será determinada de acuerdo con la presente invención. Puesto que la determinación descrita en el presente documento se basa en la actividad enzimática de una

deshidrogenasa, se entenderá que dicho analito es un sustrato de la deshidrogenasa comprendida por la composición. Analitos preferentes previstos para ser determinados de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, mediante los elementos de ensayo de diagnóstico mencionados anteriormente, son glucosa, maltosa, manosa, galactosa, glutamato, glucosa-6-fosfato, etanol o lactosa y, más preferentemente, glucosa.

5 Preferentemente, los elementos de ensayo de diagnóstico de la invención comprenden un área de ensayo que contiene dicha composición, en el que el área de ensayo tiene una cara de aplicación de la muestra a la que se aplica la muestra de fluido corporal y una cara de detección que permite la detección de un cambio en una propiedad óptica cuando el analito reacciona con la composición. La muestra se ha a aplicar a la cara de aplicación de la muestra y se prevé, preferentemente, que células tales como los eritrocitos presentes en muestras de sangre, no alcancen la cara de detección.

10 Detalles sobre tal elemento de ensayo y la fabricación del mismo se pueden encontrar en el documento EP 0 821 234 B1 que se incorpora por referencia en el presente documento. Elementos de ensayo adicionales previstos de acuerdo con la presente invención son los divulgados en los documentos EP 1 035 919 B1 o EP 1 035 920 B1, cuyo contenido descriptivo respectivo se incorpora por referencia en el presente documento.

15 Específicamente, el área de ensayo del elemento de ensayo de diagnóstico de la invención comprende, preferentemente, una lámina transparente sobre la cual se aplican una primera y una segunda capa de película, estando colocada una encima de otra en este orden. Es importante que la primera capa situada sobre la lámina transparente disperse la luz considerablemente menos que la segunda depositada encima. La cara no recubierta de la lámina transparente se denomina cara de detección, y la cara de la segunda capa que está opuesta a la cara sobre la que la segunda capa se apoya sobre la primera capa se denomina cara de aplicación de la muestra.

20 Las capas de película del elemento de ensayo de diagnóstico de acuerdo con la invención se producen a partir de dispersiones o emulsiones de formadores de película poliméricos. Las dispersiones de formadores de película contienen partículas poliméricas microscópicas que son insolubles en el líquido portador (normalmente agua) y se dispersan finamente en el líquido portador. Si el líquido se elimina mediante evaporación durante la formación de la película, las partículas se aproximan entonces y se tocan con precisión entre sí. Las elevadas fuerzas que se producen en el proceso y la ganancia de energía superficial asociada a la formación de la película dan como resultado un crecimiento de las partículas en una capa de película sustancialmente cerrada. De modo alternativo, también es posible usar una emulsión del formador de película en la que este está disuelto en un disolvente. El polímero disuelto se emulsiona en un líquido portador que es inmiscible con el disolvente. Ésteres polivinílicos, acetatos polivinílicos, ésteres poliacrílicos, ácido polimetacrílico, polivinil amidas, poliamidas y poliestireno son particularmente adecuados como polímeros para tales formadores de película. Además de los homopolímeros, también son adecuados polimerizados mixtos tales como de butadieno, estireno o éster de ácido maleico.

25 Las así denominadas capas de película se localizan sobre una lámina transparente en el área de ensayo del soporte de ensayo de diagnóstico de acuerdo con la invención. Para esto, se tienen en cuenta láminas de plástico que son impermeables a los líquidos. Una lámina de policarbonato ha demostrado ser particularmente adecuada.

30 Las dos capas de película se pueden producir a partir de compuestos de recubrimiento que contienen los mismos formadores de película poliméricos o se pueden producir a partir de compuestos de recubrimiento que contienen distintos formadores de película poliméricos.

35 Mientras que la primera capa contiene un agente de hinchamiento y opcionalmente una carga que disperse débilmente la luz, la segunda capa requiere un agente de hinchamiento y en cualquier caso al menos un pigmento que disperse considerablemente la luz. Además, la segunda capa puede contener también cargas no porosas al igual que cargas porosas.

40 Mediante la adición del agente de hinchamiento que se hincha bien (es decir, una sustancia que aumenta su volumen cuando absorbe agua) no solo se obtienen capas que pueden ser penetradas fácilmente por el líquido de la muestra sino que también tienen buenas propiedades de separación de células, por ejemplo eritrocitos y adicionalmente también pigmentos de la sangre, a pesar de este efecto de apertura por parte del agente de hinchamiento. Las propiedades de hinchamiento deben ser tan buenas que, para un ensayo en el que el cambio de la al menos una propiedad óptica depende principalmente de la penetración del líquido de la muestra a través de la capa, el cambio de la propiedad óptica sea medible después de un máximo de un minuto. Agentes de hinchamiento especialmente adecuados han demostrado ser el copolímero de metil vinil éter y anhídrido de ácido maleico, la goma de xantano y el copolímero de metil vinil éter y ácido maleico.

45 La cantidad de pigmento que dispersa considerablemente la luz en la segunda capa es de al menos un 25 % en peso con respecto a la capa doble seca lista para su uso del área de ensayo. Puesto que las cargas que dispersan débilmente la luz y los pigmentos que dispersan considerablemente la luz son esenciales para las propiedades ópticas de las capas de película, la primera y la segunda capa de película tienen diferentes cargas y pigmentos.

50 La primera capa de no película debe contener cargas o debe contener aquellas cargas cuyo índice de refracción está próximo al índice de refracción del agua. El dióxido de silicio, silicatos y silicatos de aluminio han demostrado



ser particularmente adecuados para ello. Particularmente preferente es un silicato de sodio y aluminio con el nombre comercial Transpafill.RTM®. Este tiene una composición promedio de un 66 % en peso de SiO<sub>2</sub>, un 26 % en peso de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, un 7 % en peso de Na<sub>2</sub>O y un 1 % en peso de SO<sub>3</sub>. El tamaño de granulado promedio de las partículas primarias particularmente preferentes es de aproximadamente 0,06 µm.

De acuerdo con la invención, la segunda capa debe dispersar muy considerablemente la luz. Idealmente, el índice de refracción de los pigmentos en la segunda capa de película debe ser de al menos 2,5. Por tanto, se usa preferentemente el dióxido de titanio. Las partículas con un diámetro promedio de aproximadamente 0,2 a 0,8 µm han demostrado ser particularmente ventajosas. Tipos de dióxido de titanio fácilmente procesables en la modificación anatasa son muy especialmente preferentes.

Es posible que la composición de la invención esté comprendida en una capa de película, preferentemente, la primera capa de película. No obstante, también es posible que la composición de la presente invención esté presente en ambas capas de película.

A fin de optimizar el área de ensayo en el soporte de ensayo de diagnóstico de acuerdo con la invención, ha demostrado ser particularmente ventajoso cuando ambas capas de película contienen un agente humectante no hemolítico. Agentes humectantes neutros, es decir, no cargados son particularmente preferentes para ello. La N-octanoil-N-metil-glucamida es el más particularmente preferente.

A fin de producir un área de ensayo de un elemento de ensayo de diagnóstico de acuerdo con la invención cada una de las capas de película respectivas se producen sucesivamente a partir de una dispersión homogénea de dichos componentes. Para esto se usa la lámina transparente como base para formar el compuesto de recubrimiento para la primera capa de película. Una vez que se ha aplicado el compuesto de recubrimiento para la primera capa de película con un espesor de capa particular, se seca la capa. A continuación, se aplica a esta capa el compuesto de recubrimiento para la segunda capa, también con un espesor de capa fino y se seca. Tras el secado, el espesor de la primera y la segunda capa de película deben ser en conjunto de no más de 0,20 mm, preferentemente de no más de 0,12 mm, en particular preferentemente de no más de 0,08 mm.

El área de ensayo producida de esta manera se puede montar sobre una capa de soporte para una mejor manipulación, teniendo en cuenta para tal capa aquellos materiales que no absorban el líquido que se va a examinar. Estos son los así denominados materiales no absorbentes, siendo particularmente preferentes las láminas de plástico hechas, por ejemplo, de poliestireno, cloruro de polivinilo, poliéster, policarbonato o poliamida. Láminas de metal o de vidrio son adecuadas como materiales de soporte adicionales.

En una realización preferente del elemento de ensayo de acuerdo con la invención, la cara de detección del área de ensayo que se ha de observar y medir para determinar un cambio en al menos una propiedad óptica del reactivo indicador debe ser visible a través de la capa de soporte a fin de determinar el analito que se ha de detectar en la muestra corporal. Esto se puede conseguir mediante una capa de soporte transparente. No obstante, también es posible que la capa de soporte tenga una perforación que esté cubierta por la cara de detección del área de ensayo. La cara de detección, por tanto, es visible a través de la perforación. Preferentemente, en un elemento de ensayo de diagnóstico de acuerdo con la invención hay una perforación en la capa de soporte por debajo de la cara de detección del área de ensayo a través de la cual se puede observar la cara de detección del área de ensayo. La perforación tiene un diámetro algo menor que la dimensión lineal del área de ensayo de modo que el área de ensayo por fuera de la perforación se apoya en la capa de soporte y puede estar unida a ella.

La presente invención se refiere adicionalmente a un método para la fabricación de un elemento de ensayo de diagnóstico que comprende la etapa de producir una composición de acuerdo con la presente invención sobre un soporte sólido.

En una realización preferente de dicho método de la invención, dicha producción comprende las etapas de:

- (i) aplicar una composición que comprende los componentes (a) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte; y
- (ii) eliminar dicho disolvente de la composición;

o

- (i) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;
- (ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;
- (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (c) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa;

o

5 (i) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

10 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa;

o

15 (i) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

20 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa;

25 o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (c) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

30 (ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

(iii) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa.

35

o

40 (i) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

(iii) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

45 (iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa.

o

50 (i) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

(iii) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

55 (iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa.

60 Preferentemente, la composición se aplica a una capa de detección en el área de ensayo. La capa de detección se puede producir en particular mediante al menos un proceso químico húmedo, más en particular a partir de una o más dispersiones, preferentemente dispersiones acuosas de la composición de la presente invención. Dichos procesos de formación de capas a partir de una o más dispersiones son conocidos en principio por el experto en la materia, y se puede hacer referencia a modo ilustrativo, por ejemplo, a la técnica anterior mencionada previamente EP 0 821 234 B1.

65 El disolvente se puede eliminar de la composición tras la aplicación de dicha composición al área de ensayo del elemento de ensayo mediante todas las técnicas conocidas para la eliminación de disolventes que incluyen

tratamiento térmico, evaporación o liofilización. Preferentemente, dicho disolvente de la etapa (b) se elimina sustancialmente mediante tratamiento térmico.

5 También preferentemente, dicho soluto compatible reduce la disminución de la actividad enzimática de al menos una enzima en la composición y, en particular, durante la eliminación sustancial del disolvente en la etapa (b) que se consigue, por ejemplo, mediante tratamiento térmico y durante el mantenimiento de la composición en condiciones secas sobre el elemento de ensayo.

10 La presente invención contempla también, en principio, el uso de al menos un soluto compatible, que es ectoína o un derivado de la misma, para prevenir una reducción de la actividad enzimática de al menos una enzima en una composición en condiciones secas, en el que dicha composición comprende una deshidrogenasa, un cofactor redox, un agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox, y un reactivo indicador.

15 Preferentemente, dicho al menos un soluto compatible en la composición en condiciones secas está comprendido en un elemento de ensayo de diagnóstico, preferentemente un elemento de ensayo de diagnóstico tal como se ha especificado anteriormente con detalle.

20 La presente invención se refiere también a un método para determinar la presencia o la cantidad de un analito en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto el elemento de ensayo de diagnóstico de la invención con un fluido corporal del que se sospecha que comprende el analito en condiciones adecuadas para transformar la al menos una enzima a su estado reconstituido;

25 (b) medir un cambio en al menos una propiedad óptica del reactivo indicador en la composición humedecida que comprende al menos una enzima en estado reconstituido sobre el elemento de ensayo de diagnóstico, mediante el cual se determinará la presencia o la cantidad del analito en la muestra de fluido corporal.

30 Como ya se ha expuesto en otra parte en el presente documento, dependiendo de la especificidad del sustrato de la deshidrogenasa que se va a usar en la composición sobre el elemento de ensayo de diagnóstico, se pueden determinar diferentes analitos mediante el método de la invención.

35 "Poner en contacto", tal como se usa en el presente documento, significa que la muestra de fluido corporal se aplica al soporte de tal modo que permite el contacto físico de la composición de la invención comprendida por el soporte y la muestra de fluido corporal. En particular, el ponerlos en contacto se lleva a cabo durante un tiempo y en unas condiciones que son suficientes para permitir que la deshidrogenasa sea reconstituida, es decir, humedecida y disuelta y llegue a ser por tanto, biológicamente activa. Las condiciones adecuadas dependen del soporte de diagnóstico y son conocidas en la técnica. La muestra de fluido corporal aplicada al elemento de ensayo, preferentemente, tiene un volumen de menos de 2 microlitros, más particularmente de menos de 1 microlitro.

40 Tras la reconstitución de dicha deshidrogenasa biológicamente activa, la enzima se unirá a su sustrato, es decir, al analito comprendido en la muestra de fluido corporal, y lo convertirá en el producto correspondiente y equivalentes redox. Los equivalentes redox generados por la deshidrogenasa permiten determinar la actividad de la deshidrogenasa ya que los equivalentes redox, generados por la conversión enzimática catalizada por la deshidrogenasa, son transferidos al reactivo indicador por el agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica del reactivo indicador en presencia de equivalentes redox en la composición comprendida. El cambio en la al menos una propiedad óptica del reactivo indicador se puede medir. Dependiendo del elemento de ensayo de diagnóstico, la medición del cambio de la propiedad óptica se puede conseguir mediante técnicas diferentes descritas en otra parte del presente documento con más detalle. Para detectar el cambio de una propiedad óptica tal como el color, se puede usar un detector óptico que resuelve espacialmente. Un "detector óptico que resuelve espacialmente" se ha de entender que significa un detector óptico que tiene una multiplicidad de sensores ópticos que son capaces de registrar regiones de la cara de detección de la capa de detección que no son completamente congruentes. Más en particular, el detector óptico que resuelve espacialmente puede comprender al menos un sensor de imagen, es decir, un grupo de detectores ópticos que puede ser unidimensional o bidimensional. Más en particular, el detector óptico puede comprender, por tanto, un chip CCD y/o un chip CMOS. Además, el detector óptico que resuelve espacialmente puede comprender al menos un elemento óptico para la formación de imágenes de la cara de detección y/o la capa de detección sobre una superficie sensible a las imágenes del detector óptico que resuelve espacialmente.

60 Un cambio en al menos una propiedad óptica medido mediante el método descrito anteriormente será indicativo de la presencia del analito. El experto en la materia entenderá que a fin de determinar la cantidad de un analito, podría ser necesario comparar el grado del cambio de la propiedad óptica. Para este fin, además, podría ser necesario comparar una señal detectada asociada al cambio óptico con señales asociadas a cambios ópticos inducidos por cantidades conocidas de los analitos, es decir, señales de calibración. El modo en que se puede establecer tal calibración es bien conocido por el experto habitual en la materia.

65

El término "cantidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad absoluta o relativa del analito presente en una muestra aplicada al elemento de ensayo de diagnóstico. Una cantidad relativa preferente de acuerdo con la presente invención es la concentración, es decir, la cantidad en relación con el volumen.

5 FIGURAS

Fig. 1: Se indican los valores promedio de la actividad en comparación con la cantidad de estabilizante (soluto compatible). Se ha restado la actividad determinada en los elementos de ensayo sin estabilizante.

10 Fig. 2: Vista gráfica del efecto estabilizante de la ectoína y la hidroxiectoína sobre la glucosa deshidrogenasa y la diaforasa.

15 Fig. 3: Vista gráfica de la temperatura de almacenamiento en comparación con el nivel de glucosa medido como indicador de la actividad enzimática. A) sin estabilizante; B) ectoína; 1 g/100 g de composición; C) hidroxiectoína, 1 g/100 g de composición;

20 Fig. 4: Influencia de diferentes tampones usados en las composiciones de recubrimiento. A) tampón PO4, pH 6,8, sin estabilizante; tras 45 días; de 45 °C a 4 °C; B) tampón PO4, pH 6,8, 2 g de ectoína por 100 g de RF; tras 45 días; de 45 °C a 4 °C; C) HEPES pH 7,1, sin estabilizante; tras 45 días; de 45 °C a 4 °C; D) HEPES pH 7,1, 2 g de ectoína por 100 g de RF; tras 45 días; de 45 °C a 4 °C;

Fig. 5: El efecto estabilizante de la ectoína sobre la Gluc-DOR y el mutante 31 de la Gluc-DOR ya es observable al cabo de 3 semanas a 45 °C.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de tiras de ensayo

30 Se produjeron cuatro películas de reacción diferentes para determinar los niveles de glucosa y se aplicaron como recubrimiento sobre una lámina esencialmente tal como se describe en el documento EP 0 821 234, Ejemplo 1. La formulación de la composición se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Componentes por 100 g de la película del primer recubrimiento antes del secado

|  |        |        |        |        |
|--|--------|--------|--------|--------|
| Glucosa deshidrogenasa de <i>Bacillus subtilis</i>       | 1,09 g | 1,09 g | 1,09 g | 1,09 g |
| Diaforasa de <i>Bacillus subtilis</i>                    | 0,77 g | 0,77 g | 0,77 g | 0,77 g |
| NAD  | 0,58 g | 0,58 g | 0,58 g | 0,58 g |
| Tampón fosfato de Na/K o HEPES                           | 0,35 g | 0,35 g | 0,35 g | 0,35 g |
| ectoína o hidroxiectoína                                 | 0,00 g | 1,00 g | 2,00 g | 4,00 g |
| Goma de xantano  | 0,29 g | 0,29 g | 0,29 g | 0,29 g |
| Sílice FK 320DS  | 5,80 g | 5,80 g | 5,80 g | 5,80 g |
| N-metil-n-oleoil-taurato de sodio                        | 0,03 g | 0,03 g | 0,03 g | 0,03 g |
| N-octanoil-N-metil-glucamida                             | 0,17 g | 0,17 g | 0,17 g | 0,17 g |
| Polivinilpirrolidona                                     | 0,86 g | 0,86 g | 0,86 g | 0,86 g |
| Cloruro de tetraetilamonio                               | 0,07 g | 0,07 g | 0,07 g | 0,07 g |
| Sal de hexasodio del ácido 2,18-fosforomolibdénico       | 0,33 g | 0,33 g | 0,33 g | 0,33 g |
| Dispersión - Propionato de polivinilo (50 % p/p en agua) | 5,00 g | 5,00 g | 5,00 g | 5,00 g |
| K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]                    | 0,01 g | 0,01 g | 0,01 g | 0,01 g |
| 2-metil-2-butanol  | 1,00 g | 1,00 g | 1,00 g | 1,00 g |
| añadir agua hasta 100 g                                  |        |        |        |        |

35 Se ajustó el pH a 6,8 y la composición se aplicó como recubrimiento en forma de película (aproximadamente 120 micrómetros) sobre una lámina de policarbonato (125 micrómetros). La composición aplicada como recubrimiento se secó posteriormente a 50 °C.

Se aplicó un segundo recubrimiento al primer recubrimiento sobre la lámina tal como sigue:

Tabla 2: Componentes de la película del segundo recubrimiento

|  |         |
|--|---------|
| Gantrez  | 1,47 g  |
| N-metil-n-oleoil-taurato de sodio  | 0,03 g  |
| PVP K25  | 2,01 g  |
| Mega 8   | 0,37 g  |
| Cloruro de tetraetilamonio   | 0,45 g  |
| Sílice FK 320DS  | 2,00 g  |
| Dióxido de titanio E171  | 22,00 g |
| Dispersión- Propionato de polivinilo (50 % p/p en agua)                        | 6,25 g  |
| Cloruro de bis-(2-hidroxietil)-(4-hidroxiiminociclohexa-2,5-dienilidin)-amonio | 0,48 g  |
| Sal de hexasodio del ácido 2,18-fosforomolibdénico                             | 1,41 g  |
| K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]  | 0,01 g  |
| 2-metil-2-butanol  | 1,00 g  |
| añadir agua hasta 100 g  |         |

Se ajustó el pH a 6,8 y la composición se aplicó como recubrimiento en forma de una segunda película (aproximadamente 25 micrómetros) sobre la primera película aplicada como recubrimiento sobre la lámina. La composición aplicada como recubrimiento se secó posteriormente a 50 °C. Se produjeron tiras de ensayo para la determinación de glucosa tal como se describe en el documento EP 0 821 234, secciones ([0063 -0067]).

Ejemplo 2: Determinación de la actividad enzimática en el elemento de ensayo

Los elementos de ensayo se almacenaron en viales de plástico en presencia de un agente desecante durante 6 semanas a 45 °C. En una etapa posterior, el área de ensayo de un elemento de ensayo se eluyó con ultrasonidos usando tampón de elución. En el sobrenadante se determinó la actividad enzimática.

Tabla 3: Tampón de elución y técnica de detección para las diferentes actividades enzimáticas

|                        | Tampón de elución              | técnica de detección                     |
|------------------------|--------------------------------|--|
| Glucosa deshidrogenasa | Tris/HCl, NaCl, NAD; pH 8,5    | Detección UV a 340 nm                    |
| Diaforasa              | Tris/HCl, NaCl, Triton; pH 8,8 | INT → Sal Tetrazolio; detección a 492 nm |

Los resultados se muestran en la Fig. 1. La Figura muestra que hay un efecto estabilizante significativo (más de un 10 %) para las concentraciones de ectoína mayores de 0,3 g por 100 g de composición de recubrimiento. Se puede observar el mismo efecto para la hidroxiectoína tal como se muestra en la Fig. 2. Asimismo, la Figura muestra que la deshidrogenasa al igual que la diaforasa están estabilizadas.

Ejemplo 3: Determinación de la actividad enzimática en el elemento de ensayo

Los elementos de ensayo se almacenaron en viales de plástico en presencia de un agente desecante durante 63 días a 4 °C (KS), 24 °C (RT), 35 °C (DT), y 45 °C (HT). Los elementos de ensayo se usaron para determinar los niveles de glucosa en sangre en una pluralidad de muestras de sangre venosa. Las muestras se midieron con un método de referencia (Hitachi) en paralelo. Los resultados se normalizaron con respecto a los elementos de ensayo almacenados en condiciones KS.

En la Figura 3, se indica la temperatura de almacenamiento así como el nivel de glucosa medido como indicador de la actividad enzimática. Como es evidente, la ectoína y la hidroxiectoína actúan como estabilizantes y preservan las actividades enzimáticas.

Ejemplo 4: Determinación de la actividad enzimática en el elemento de ensayo con diferentes tampones

Los elementos de ensayo se almacenaron y se trataron esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 3. Se usaron diferentes tampones, principalmente un tampón fosfato pH 6,8, sin estabilizante, un tampón fosfato pH 6,8, 2 g de ectoína por 100 g de película del primer recubrimiento, un tampón HEPES pH 7,1, sin estabilizante, y un tampón HEPES pH 7,1, 2 g de ectoína por 100 g de película del primer recubrimiento, en las composiciones de recubrimiento tal como se indica en la Figura 4. Como resulta evidente a partir de la Figura, se observó la actividad

estabilizante de la ectoína, independiente del sistema de tamponado.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad enzimática de un mutante 2 de glucosa deshidrogenasa en solución y dependencia de la ectoína o la hidroxiectoína

5 Se combinaron alícuotas de una solución que comprendía el mutante 2 de glucosa deshidrogenasa tal como se divulga en el documento WO2011/020856 con diferentes cantidades de ectoína o hidroxiectoína tal como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4: Soluciones estabilizantes

| Ej. N.º | contenido  | Estabilizante y concentración |
|---------|--|-------------------------------|
| 1       | Glucosa deshidrogenasa Mut. 2 3000 U/ml, NAD 10 mg/ml; Fosfato K-Na 15 mM, pH 6,8. | 0 (referencia)                |
| 2       | ídem   | ectoína 4 % (p/v)             |
| 3       | ídem   | ectoína 2 % (p/v)             |
| 4       | ídem   | ectoína 1 % (p/v)             |
| 5       | ídem   | hidroxiectoína 4 % (p/v)      |
| 6       | ídem   | hidroxiectoína 2 % (p/v)      |
| 7       | ídem   | hidroxiectoína 1 % (p/v)      |

Las alícuotas se almacenaron en diferentes condiciones de almacenamiento (8 días a 4 °C; 8 días a 35 °C, 4 días a 4 °C seguido de 4 días a 45 °C) y se determinó la actividad enzimática tras el almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 5. No se pudo determinar un efecto estabilizante ni de la ectoína ni de la hidroxiectoína en solución.

Tabla 5: Resultados

| Ej. N.º | Nota                      | Unidades | 8 días a 4 °C | 8 días a 35 °C | 4 días a 4 °C, 4 días a 45 °C |
|---------|---------------------------|----------|---------------|----------------|-------------------------------|
| 1       | referencia                | kU/g     | 213           | 126            | 50                            |
| 2       | ectoína aprox. 4 %        | kU/g     | 207           | 137            | 57                            |
| 3       | ectoína aprox. 2 %        | kU/g     | 222           | 149            | 59                            |
| 4       | ectoína aprox. 1 %        | kU/g     | 222           | 144            | 60                            |
| 5       | hidroxiectoína aprox. 4 % | kU/g     | 207           | 131            | 56                            |
| 6       | hidroxiectoína aprox. 2 % | kU/g     | 221           | 141            | 60                            |
| 7       | hidroxiectoína aprox. 1 % | kU/g     | 208           | 122            | 52                            |

Ejemplo 6: Evaluación de los elementos de ensayo con Gluc-DOR (= Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ)

20 Se produjo un elemento de ensayo con Gluc-DOR y un mutante de la misma (Gluc-DOR 31) tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior. El elemento de ensayo se analizó tal como se describe en el Ejemplo 2 anterior. La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo usando nitrosoanilina tal como se describe en el documento EP 0 620 283 B1. Como resulta evidente a partir de la Figura 5, se observa ya un efecto estabilizante tras 3  
25 semanas a 45 °C.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición seca que comprende los componentes:

- 5 (a) una deshidrogenasa;  
 (b) un cofactor redox;  
 (c) un agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox;  
 (d) un reactivo indicador; y  
 10 (e) al menos un soluto compatible que es ectoína o un derivado de la misma,

en la que dicha deshidrogenasa es una glucosa deshidrogenasa y  
 en la que dicho derivado de ectoína se selecciona entre el grupo que consiste en: hidroxiectoína, homoectoína, un éster de hidroxiectoína, un éter de hidroxiectoína, un derivado de sulfonilo de ectoína o un derivado de sulfonilo esterificado de ectoína y una amida de un derivado de sulfonilo de ectoína.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha glucosa deshidrogenasa se selecciona del grupo que consiste en: glucosa deshidrogenasa (número EC 1.1.1.47), quinoproteína glucosa deshidrogenasa (número EC 1.1.5.2), en particular, glucosa deshidrogenasa dependiente de pirrolo quinolina quinona (PQQ) (número EC 1.1.5.2), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (número EC 1.1.1.49), glucosa deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (número EC 1.1.1.119) y glucosa deshidrogenasa dependiente de flavina adenina dinucleótido (FAD) (número EC 1.1.99.10) o mutantes enzimáticamente activos de las mismas.

3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicho un agente capaz de inducir un cambio en la al menos una propiedad óptica en presencia de equivalentes redox es capaz de transferir dichos equivalentes redox del cofactor redox al reactivo indicador.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho agente es (i) una diaforasa, preferentemente una lipoamida deshidrogenasa o una NADH deshidrogenasa, (ii) una fenazina, preferentemente etosulfato de fenazina, metosulfato de fenazina, trifluorometanosulfonato de 1-(3-carboxipropoxi)-5-etilfenazinio o metosulfato de 1-metoxifenazina, (iii) una nitrosoanilina, preferentemente clorhidrato de [(4-nitrosfenil)imino]dimetanol o (iv) una quinona, preferentemente, fenantrenoquinona, fenantrolinquinona, o benzo[h]-quinolinquinona.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho cofactor redox se selecciona entre el grupo que consiste en: carba-NAD, NAD, FAD y PQQ.

6. Un elemento de ensayo de diagnóstico para la determinación de un analito en una muestra de fluido corporal que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 sobre un soporte.

7. El elemento de ensayo de la reivindicación 6, en el que dicho soporte comprende un área de ensayo que contiene dicha composición, en el que el área de ensayo tiene una cara de aplicación de la muestra sobre la que se aplica la muestra de fluido corporal y una cara de detección que permite la detección del cambio en al menos una propiedad óptica del reactivo cuando el analito reacciona con la composición.

8. Un método para la fabricación de un elemento de ensayo de diagnóstico que comprende la etapa de producir una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 sobre un soporte.

9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha producción comprende las etapas de:

- 50 (i) aplicar una composición que comprende los componentes (a) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte; y  
 (ii) eliminar dicho disolvente de la composición;

55 o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

- 60 (ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;  
 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (c) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y  
 (iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa;

65 o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

5 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa;

10 o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

15 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa;

20 o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (c) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

25 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa.

30

o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

35 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (b), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa.

40

o

(i) aplicar una composición que comprende los componentes (b) a (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) a un área de ensayo sobre el soporte en una primera capa;

(ii) eliminar dicho disolvente de la composición de la primera capa;

45 (iii) aplicar una composición que comprende los componentes (a), (d) y (e) de la composición de la invención y un disolvente (es decir, una composición que comprende los componentes en estado disuelto en vez de en estado seco) en una segunda capa sobre la primera capa; y

(iv) eliminar dicho disolvente de la composición de la segunda capa.

50

10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que el soluto compatible reduce una disminución de la actividad enzimática de al menos una enzima en la composición en condiciones secas.

55

11. Uso de al menos un soluto compatible que es ectoína o un derivado de la misma para reducir una disminución de la actividad enzimática de al menos una enzima en una composición en condiciones secas, en la que dicha composición comprende una deshidrogenasa, un cofactor redox, un agente capaz de inducir un cambio en al menos una propiedad óptica de un reactivo indicador en presencia de equivalentes redox, y un reactivo indicador, en el que dicho derivado de ectoína se selecciona entre el grupo que consiste en:

60

hidroxiectoína, homoectoína, un éster de hidroxiectoína, un éter de hidroxiectoína, un derivado de sulfonilo de ectoína o un derivado de sulfonilo esterificado de ectoína y una amida de un derivado de sulfonilo de ectoína, y en el que dicha deshidrogenasa es una glucosa deshidrogenasa.

65



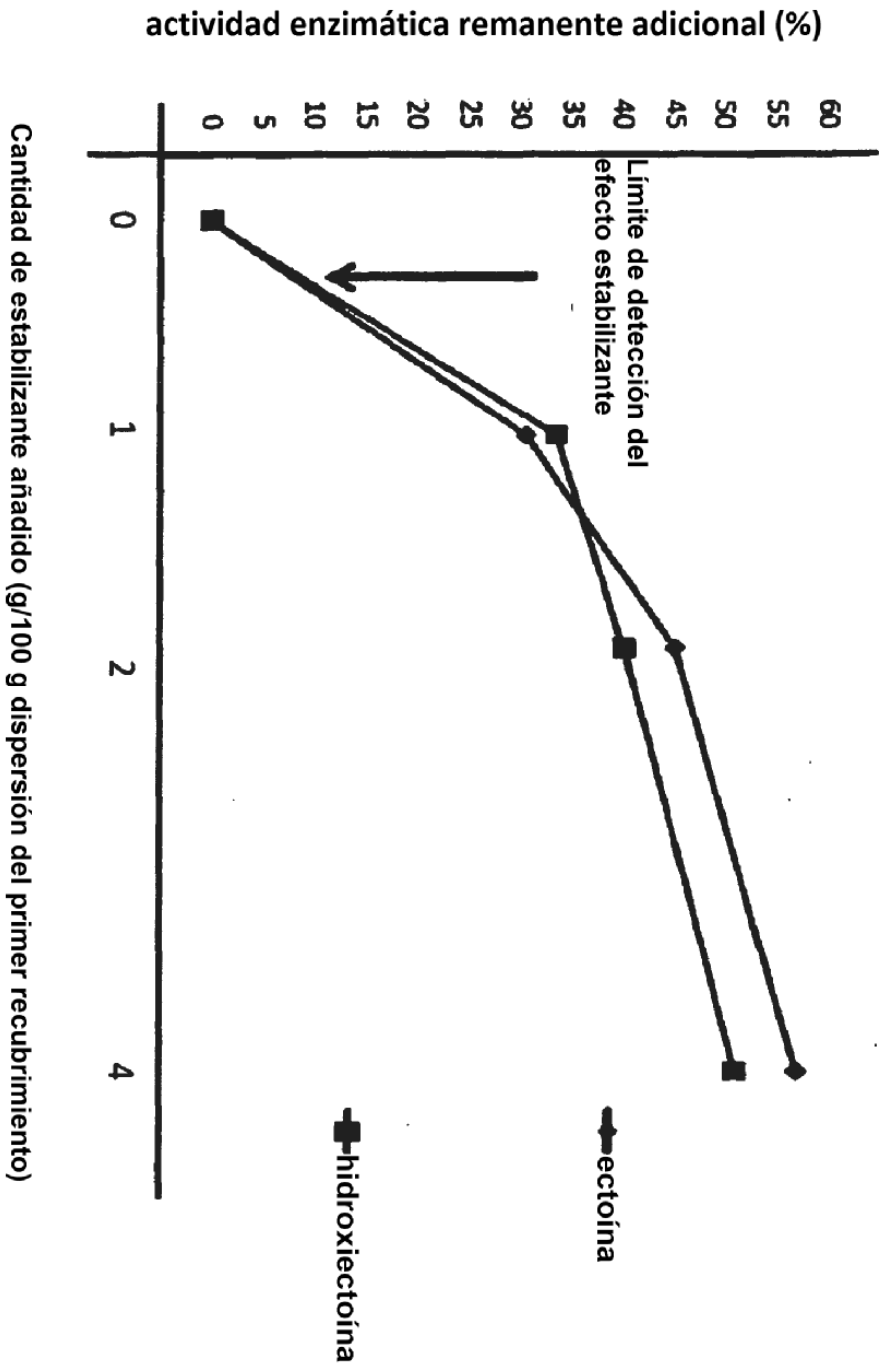
12. El uso de la reivindicación 11, en el que dicho al menos un soluto compatible en la composición en condiciones secas está comprendido en un elemento de ensayo de diagnóstico, preferentemente, un elemento de ensayo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7.

5 13. Un método para determinar la presencia o la cantidad de un analito en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:

10 (a) poner en contacto el elemento de ensayo de diagnóstico de la reivindicación 6 o 7 con un fluido corporal del que se sospecha que comprende el analito en condiciones adecuadas para transformar la al menos una enzima a su estado reconstituido;

(b) medir un cambio en al menos una propiedad óptica del reactivo indicador en la composición humedecida que comprende al menos una enzima en estado reconstituido sobre el elemento de ensayo de diagnóstico, mediante el cual se determinará la presencia o la cantidad del analito en la muestra de fluido corporal.

**Fig. 1** Actividad enzimática remanente adicional causada por la presencia de estabilizantes



**Fig. 2** GlucDH, Diaforasa: actividad enzimática remanente en tiras de ensayo almacenadas durante 12 semanas a 45 °C en comparación con tiras de ensayo almacenadas durante 12 semanas a 4 °C

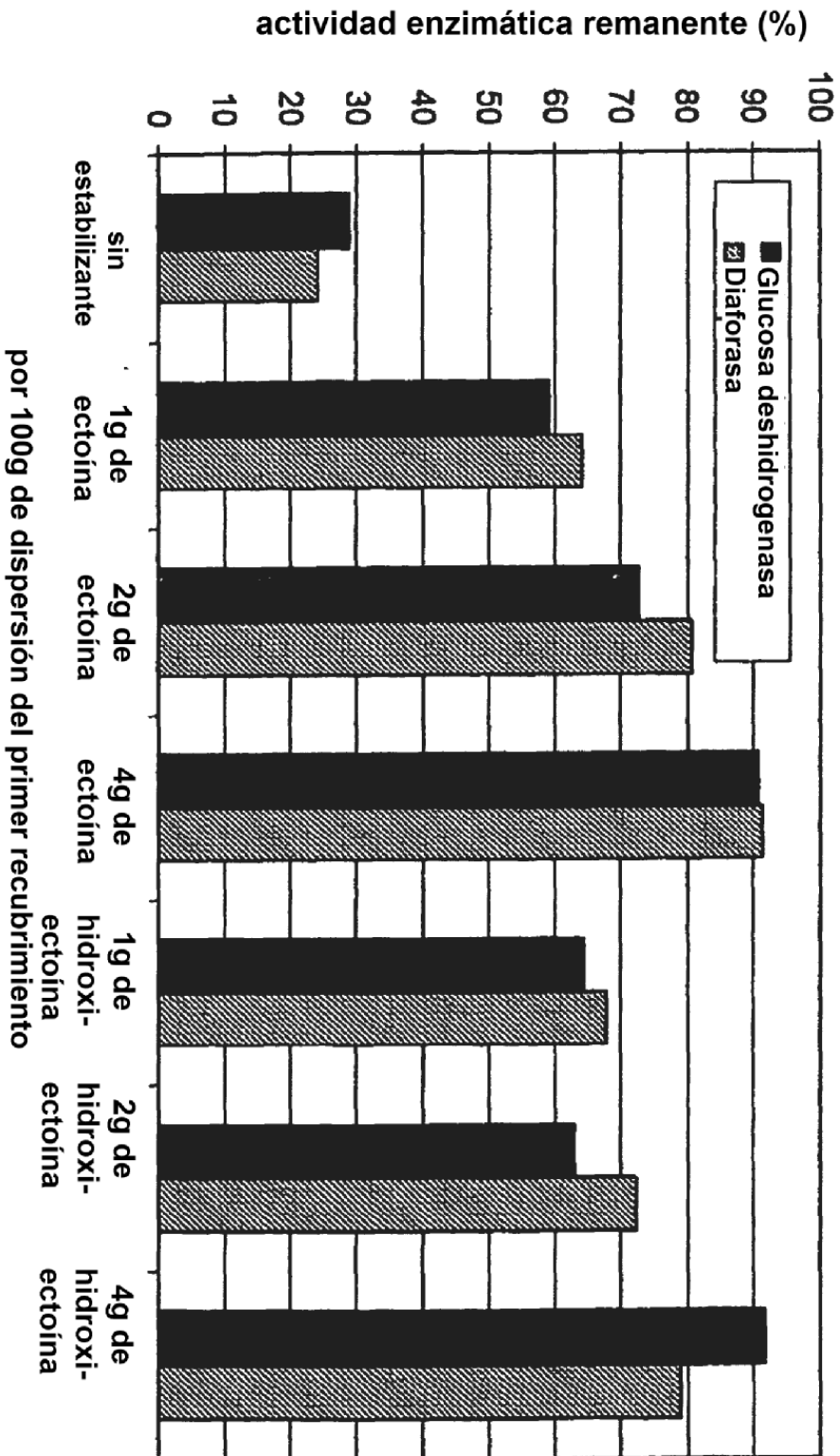


Fig. 3 Prueba de estabilidad de las tiras de ensayo – almacenamiento 63 días

- efecto estabilizante

A (dispersión del primer recubrimiento sin estabilizante)

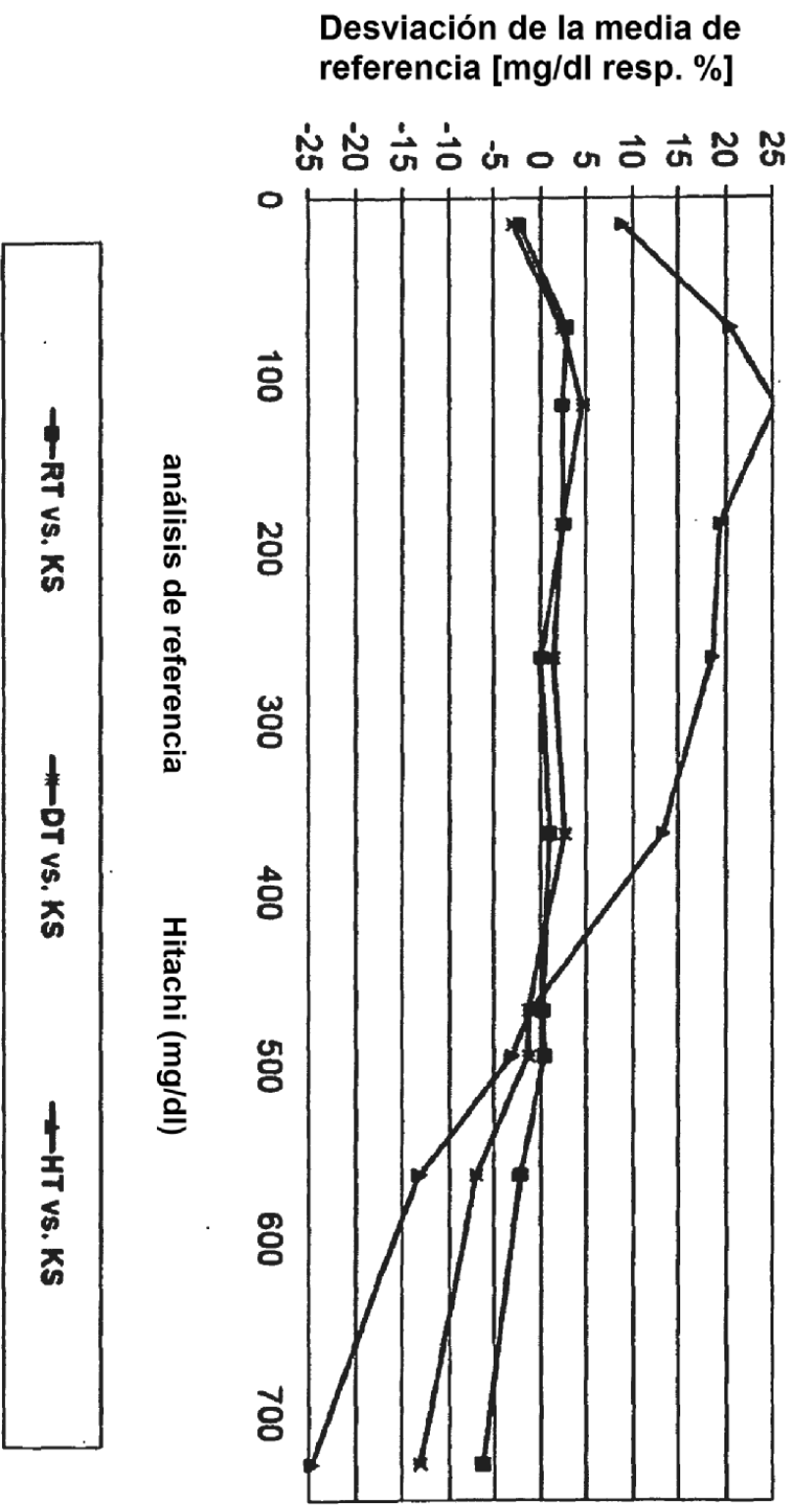


Fig. 3 cont.

B (1 g de hidroxietoína por 100 g de dispersión del primer recubrimiento)

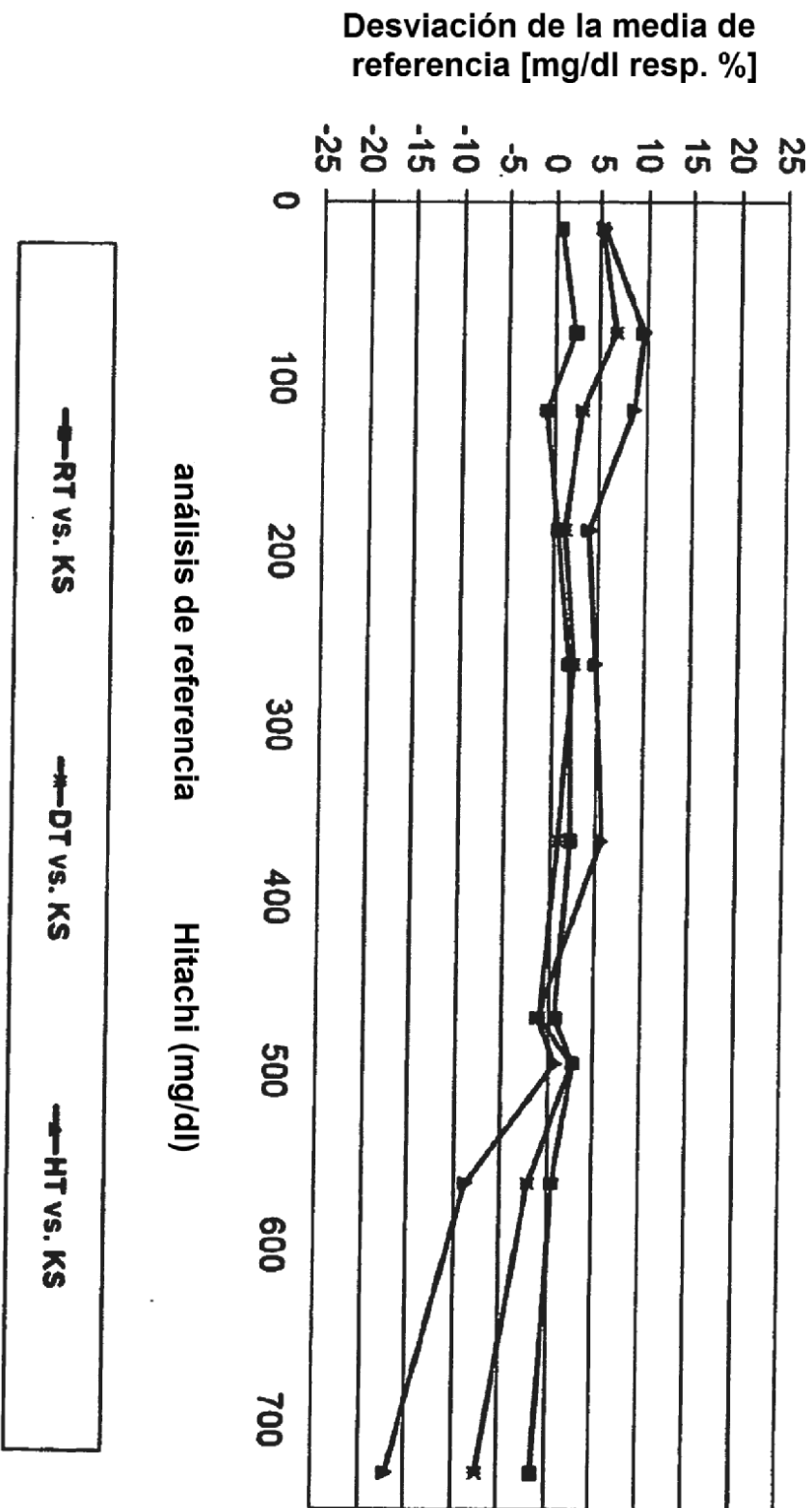
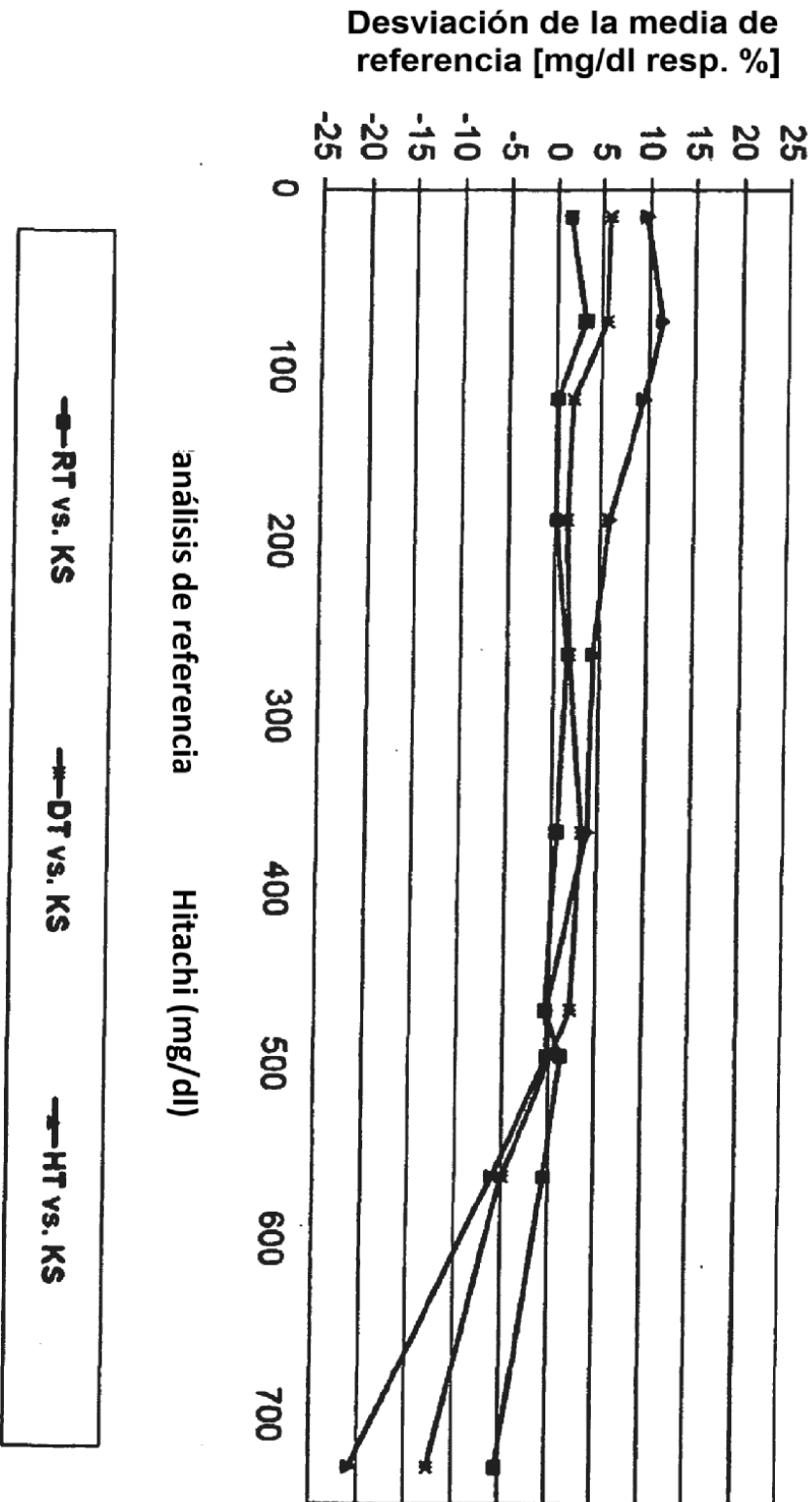


Fig. 3 cont.

C (1 g de ectoína por 100 g de dispersión del primer recubrimiento)



**Fig. 4** Prueba de estabilidad de las tiras de ensayo – almacenamiento 9 semanas

- efecto estabilizante con tampones diferentes

**A) Tampón fosfato pH 6,8, sin estabilizante**

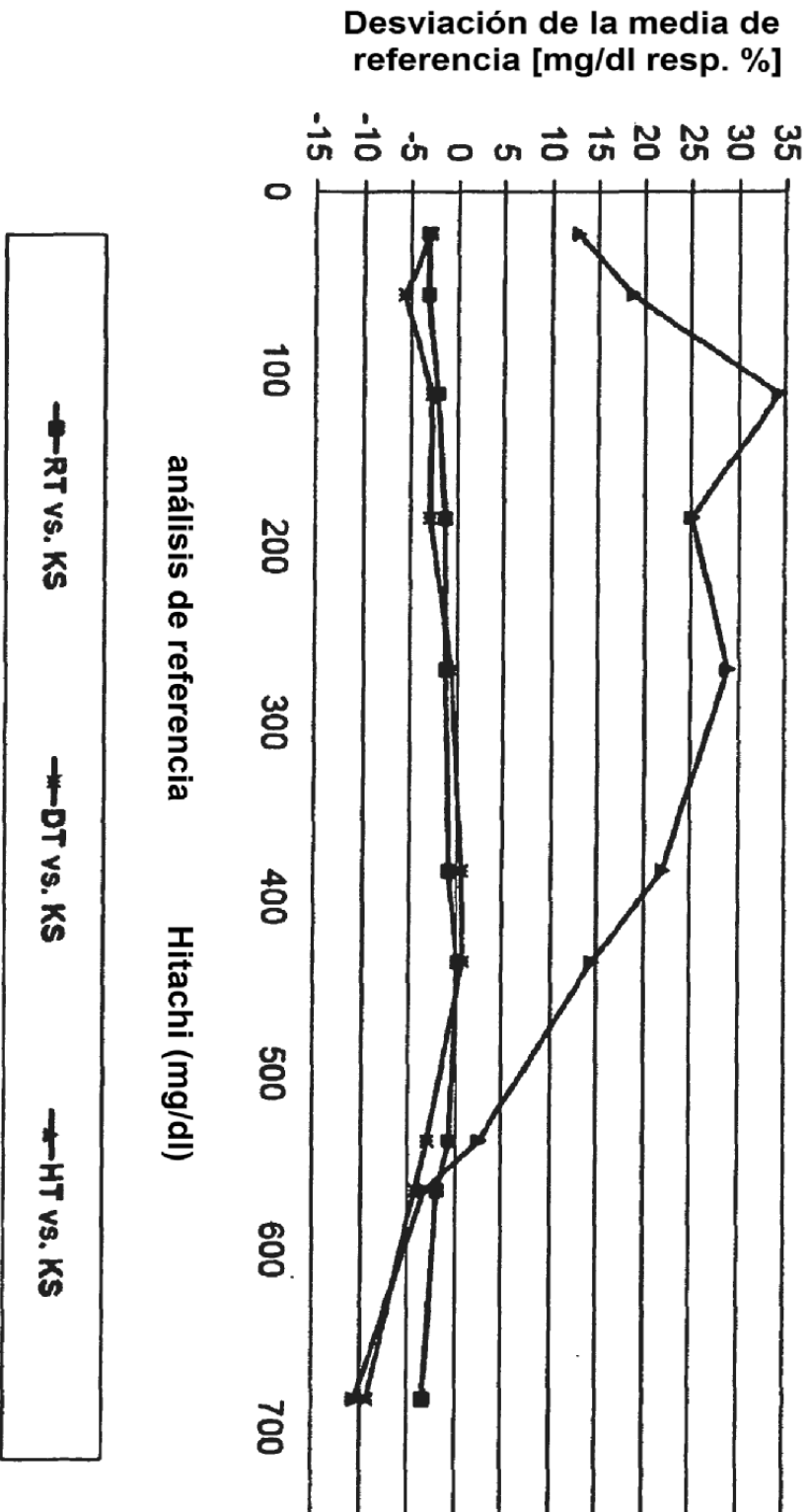


Fig. 4 cont.

B) Tampón fosfato pH 6,8 + 2 g ectoína por 100 g de dispersión del primer recubrimiento

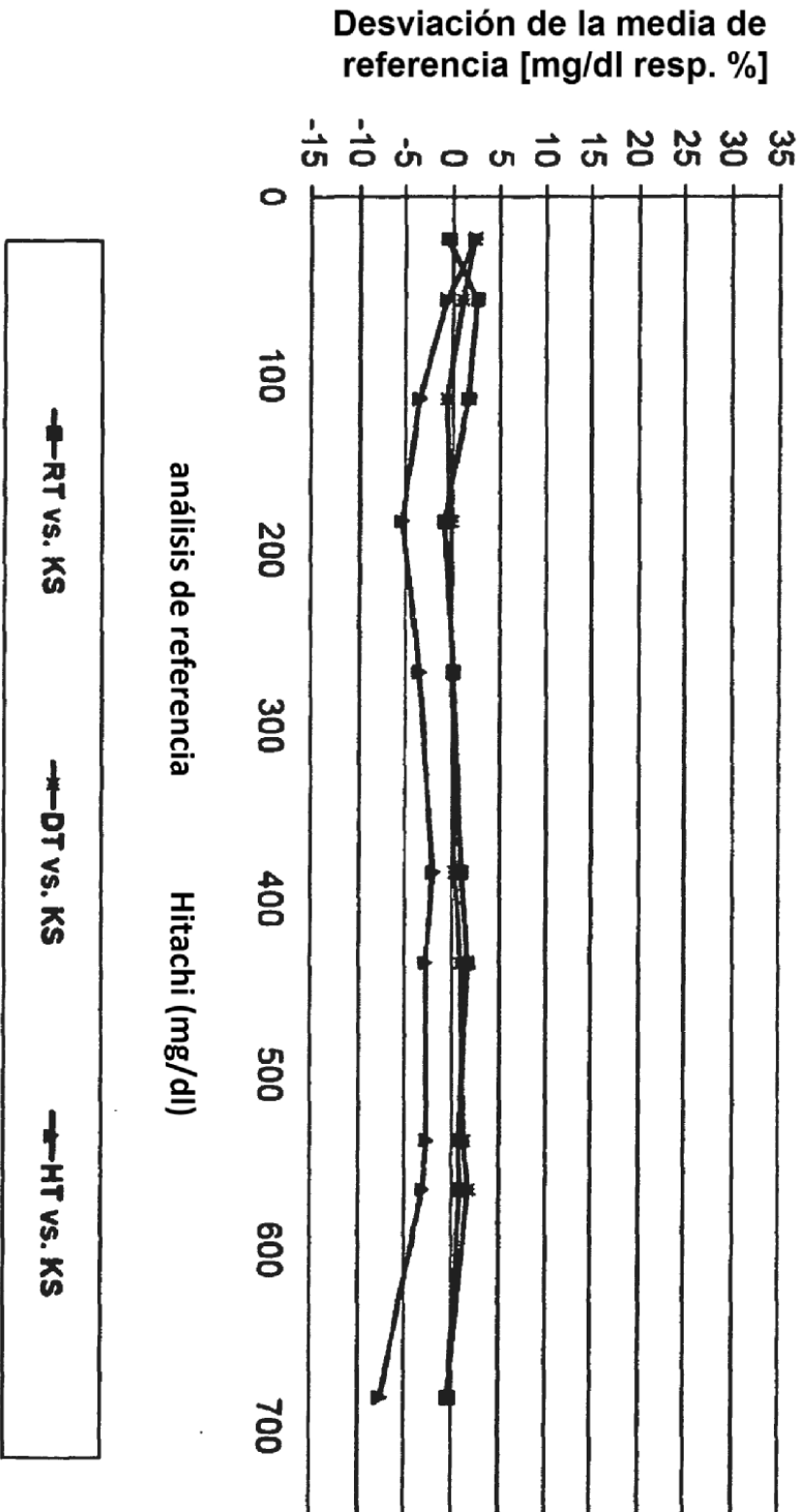




Fig. 4 cont.

C) HEPES pH 7,1, sin estabilizante

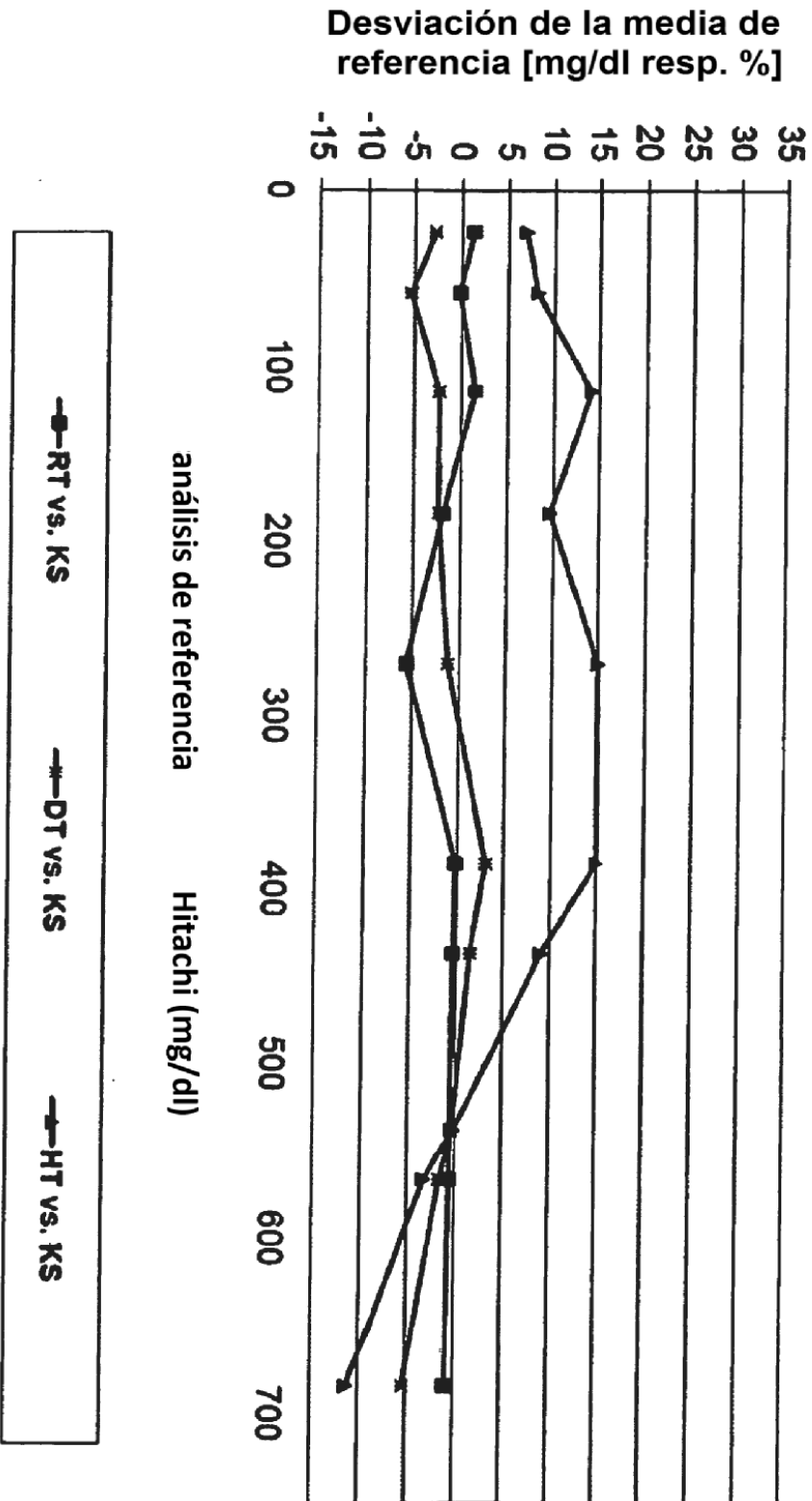


Fig. 4 cont.

D) HEPES pH 7,1 + 2 g ectoína por 100 g de dispersión del primer recubrimiento

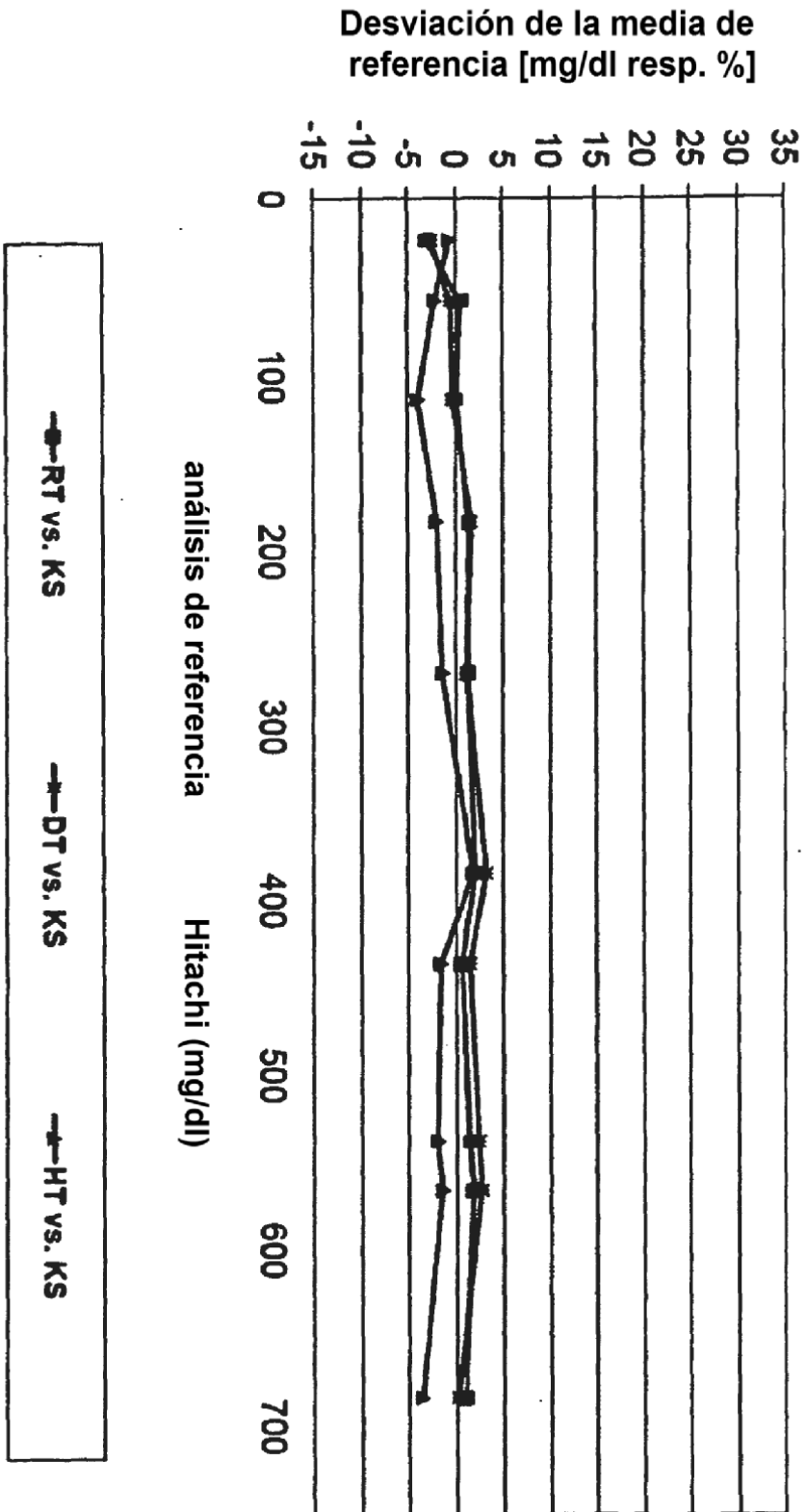


Fig. 5

**Fig. 5**

**Gluc-DOR:**  
 actividad enzimática remanente en tiras de ensayo almacenadas durante 3 semanas a 45 °C  
 en comparación con tiras de ensayo almacenadas durante 3 semanas a 4 °C

