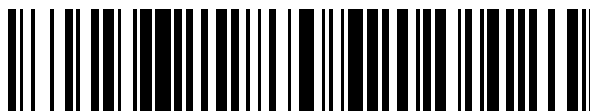


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 872**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/EP2013/072754**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13786219 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2914735**

54 Título: **Materiales de reactivo y elementos de ensayo asociados**

30 Prioridad:

02.11.2012 US 201213667057

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

05.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WILSEY, CHRISTOPHER D.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 707 872 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

Materiales de reactivo y elementos de ensayo asociados

5 Antecedentes

El uso de elementos de ensayo desechables se ha convertido en algo común para medir la presencia y/o las concentraciones de analitos seleccionados en las muestras de ensayo. Por ejemplo, los pacientes que sufren diabetes y afecciones médicas similares con frecuencia se ven implicados en el auto-control de la glucosa en sangre de manera que el paciente controla sus niveles de glucosa en sangre. La finalidad del control de los niveles de glucosa en sangre consiste en determinar el nivel de concentración y, si fuese necesario, adoptar la acción correctora si el nivel es demasiado elevado o demasiado bajo, para que dicho nivel vuelva a estar dentro de un intervalo aceptable. El fallo para adoptar la acción correctora puede suponer graves implicaciones médicas. El control de la glucosa es un hecho cotidiano de los sujetos diabéticos, y la precisión de dicho control puede significar literalmente la diferencia entre la vida y la muerte. El fallo a la hora de mantener la glucosa en sangre en niveles aceptables de forma regular puede tener como resultado graves complicaciones relacionadas con la diabetes, incluyendo enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal, daños en los nervios y ceguera.

La gente con diabetes que gestiona su nivel de azúcar en sangre percibe ventajas de larga duración. El Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) fue un estudio clínico llevado a cabo de 1983 a 1993 por el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). El DCCT comparó los tratamientos intensivos con los convencionales. Los pacientes con tratamiento intensivo mantuvieron los niveles de glucosa en valores más próximos a la normalidad siempre que resultó posible con al menos tres inyecciones de insulina al día o una bomba de insulina, y auto-control frecuente de los niveles de glucosa en sangre. El tratamiento intensivo pretendió mantener la hemoglobina A1c (HbA1c), que refleja la glucosa promedio en sangre durante un período de 2 a 3 meses, en un valor tan próximo a la normalidad siempre que fue posible. El tratamiento convencional consistió en una o dos inyecciones de insulina al día con un ensayo de glucosa en sangre u orina una vez al día. Los resultados del estudio DCCT mostraron que el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre en valores próximos a la normalidad siempre que fue posible ralentiza la aparición y la evolución de enfermedades oculares, renales y nerviosas provocadas por la diabetes. De hecho, se demostró que cualquier rebaja prolongada de la glucosa en sangre ayuda, incluso sin la persona tiene un historial de escaso control.

Un número de instrumentos analíticos o biosensores, tales como medidores de glucosa, se encuentran actualmente disponibles para permitir que la persona someta a ensayo el nivel de glucosa en una pequeña muestra de sangre. Muchos de los diseños de medidor actualmente disponibles hacen uso del elemento de ensayo desechable que, en combinación con el medidor, mide la cantidad de glucosa en la muestra de sangre de forma electroquímica u óptica. En los medidores de glucosa actuales, la información desplegada como consecuencia de la medición satisfactoria de la glucosa en sangre es el respectivo valor de glucosa en sangre, típicamente mostrado en unidades de mg/dl o mmol, y quizás el momento y la fecha en que se llevó a cabo la medición. Esta información, en combinación con el cálculo de la ingesta conocida o planificada de carbohidratos o actividades conocidas o planificadas y el conocimiento de otros factores individuales u ocupacionales, es en la mayoría de los casos suficiente para permitir a las personas diabéticas el ajuste o la consecución de la ingesta diaria y/o la dosis inmediata de insulina a inyectar para controlar el nivel de glucosa en sangre a corto plazo. Además, en caso de niveles bajos de glucosa, los diabéticos pueden detectar la necesidad de ingerir azúcar para evitar la hipoglucemia.

Una ausencia o cantidad insuficiente de insulina evita que el cuerpo use la glucosa como fuente de combustible para producir energía. Cuando esto sucede, el cuerpo produce energía por medio de la ruptura de ácidos grasos, lo cual tiene como resultado subproductos de cetona y mayores niveles de cetona. Los niveles elevados de cetona en los diabéticos también pueden venir provocados por un ataque cardíaco, apoplejía, uso recreativo de drogas o enfermedad intercorriente tal como neumonía, gripe, gastroenteritis o infección urológica. Los niveles excesivos de cetona en los diabéticos conducen a un episodio de cetoacidosis diabética (DKA), una emergencia médica que puede tener como resultado la muerte si no se trata. Los síntomas de DKA incluyen náuseas, vómitos, sed y producción de orina excesivas, dolor abdominal, dificultad respiratoria, fatiga y coma, entre otras. Dada la gravedad de DKA, resulta deseable administrar un tratamiento para reducir los niveles de cetona antes de la aparición completa de un episodio de DKA. Además, debido a que es posible que los síntomas relacionados con un episodio de DKA no se presenten hasta que el episodio de DKA haya dado comienzo o los niveles de cetona por el contrario sean contrariamente elevados, generalmente es preferible no comenzar el tratamiento de reducción de cetona como respuesta a estos síntomas.

Evitar los episodios de DKA se puede lograr midiendo los niveles de cetona y buscando atención médica en caso de superen una determinada concentración. Se pueden utilizar los ensayos de orina para determinar los niveles de cetona. El sitio web ADA recomienda la comprobación de los niveles de cetona cada 4-6 horas cuando el diabético se encuentra enfermo (tal como un resfriado o gripe) o cuando su nivel de glucosa en sangre es mayor de 240 mg/dl. Sin embargo, para diabéticos que llevan a cabo ensayos múltiples diarios de glucosa en sangre, la realización de ensayos de orina por separado además de los ensayos de glucosa en sangre resulta tedioso y engorroso.

El hecho de disponer de un ensayo dual para medir los niveles de glucosa y cetona con la misma tira de ensayo, permite al diabético mayor capacidad para cumplir las recomendaciones de ensayo y llevar a cabo una terapia más segura por medio de la detección temprana de los niveles elevados de cetona. Por ejemplo, es recomendable evitar el ejercicio cuando la cetona y la glucosa en sangre son elevados, ya que los niveles elevados de estos analitos pueden ser un indicativo de que la gestión de diabetes resulta insatisfactoria. Sin embargo, la mayoría de los diabéticos no tienen ensayos de cetona fácilmente disponibles para el ensayo, y con frecuencia carecen de información fácilmente disponible sobre el modo de gestionar dichas situaciones.

El uso de ensayos de orina por separado para determinar los niveles de cetona también requiere suministros diagnósticos adicionales y sus costes de atención, y dificulta la correlación entre los niveles de glucosa en sangre y los niveles de cetona. También es posible determinar los niveles de cetona a partir de muestras de sangre. Cuando se usan muestras de sangre, se determinan los niveles de cetona de forma común midiendo la concentración de hidroxibutirato, que es la cetona predominante en sangre. Las concentraciones de hidroxibutirato por debajo de 0,6 mM en sangre se consideran normales, mientras que concentraciones de hidroxibutirato que están entre 0,6 mM y 1,5 mM indican que se puede desarrollar un problema y más de 1,5 mM indican un riesgo de desarrollar DKA. Las concentraciones de hidroxibutirato por encima de 3 mM en sangre son indicativas de DKA y requieren un tratamiento médico de emergencia.

Las técnicas actuales para determinar los niveles de cetona en sangre implican elementos de ensayo de función individual que son apropiados por ejemplo para detectar las concentraciones de hidroxibutirato. Como el ensayo de orina descrito anteriormente no obstante, los diabéticos que llevan a cabo una magnitud relativamente elevada de ensayos de glucosa en sangre al día pueden encontrar tediosa y engorrosa la separación de los ensayos del nivel de cetona en sangre además de los ensayos de glucosa en sangre, en particular debido a que los ensayos de cetona en sangre actuales son más lentos que los ensayos de glucosa en sangre del estado del arte. Los ensayos de nivel de cetona en sangre que se llevan a cabo de forma independiente de los ensayos de glucosa en sangre también requieren suministros diagnósticos adicionales y se puede incurrir en costes de atención adicionales. Además, la realización de ensayos por separado para la determinación de los niveles de glucosa en sangre y cetona en sangre dificulta la correlación de la medición de los valores de glucosa en sangre y cetona en sangre.

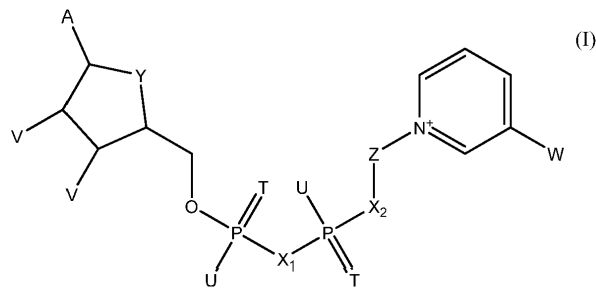
Otras técnicas para la determinación de los niveles de cetona en sangre implican elementos de ensayo apropiados para detectar los niveles de glucosa en sangre y cetona en sangre. No obstante, en estos elementos de ensayo actuales se miden los niveles de glucosa en sangre más rápidamente que los niveles de cetona en sangre, de forma que los resultados del ensayo de cetona en sangre tardan más y se proporcionan después de los resultados del ensayo de glucosa en sangre. Como alternativa, los resultados de ambos ensayos de cetona en sangre y glucosa en sangre no se proporcionan hasta completar el ensayo de cetona en sangre. En cualquier caso, la espera de los resultados de uno o ambos ensayos hasta completar el ensayo de cetona en sangre puede resultar engorroso y tedioso para el diabético que lleva a cabo una magnitud relativamente elevada de ensayos al día, en particular cuando se considera que en algunos casos el ensayo de cetona en sangre puede durar casi el doble que el ensayo de glucosa en sangre. Además, cuando se proporcionan los resultados de ensayo de glucosa en sangre antes y por separado de los resultados de ensayo de cetona en sangre, surge la posibilidad de que el usuario interrumpa el ensayo antes de completarse el ensayo de cetona en sangre y/o pierda la atención después de haberse proporcionado los resultados del ensayo de glucosa en sangre pero antes de que haber considerado de manera apropiada los resultados del ensayo de cetona en sangre.

Dadas las ramificaciones del registro preciso, el informe y análisis de las mediciones de cetona en sangre además de las mediciones de glucosa en sangre, mejoras en las técnicas, procedimientos y equipo para el ensayo de los niveles de cetona en sangre y/o los niveles de glucosa en sangre resultan deseables.

Sumario

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. En una realización, un elemento de ensayo que tiene funcionalidad dual incluye una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) (definido posteriormente). El primer analito es hidroxibutirato y la primera enzima es hidroxibutirato deshidrogenasa, y el segundo analito es glucosa y la segunda enzima es glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa. Otros aspectos de la aplicación al sujeto van destinados a materiales de reactivo únicos.

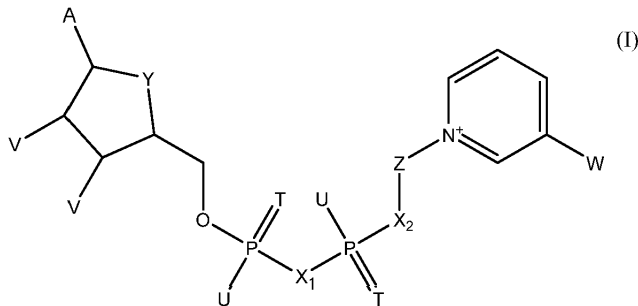
El elemento de ensayo configurado para determinar el primer y segundo analitos incluyen una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima y una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima. El elemento de ensayo también incluye una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I):



en la que

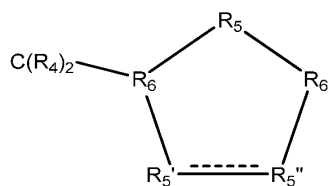
- 5 A = adenina o un análogo de la misma,
T = en cada caso independientemente indica O o S,
U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,
V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,
10 W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,
X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,
Y = NH, S, O o CH₂,
Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo
seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄ donde CR₄ está unido
15 al grupo cíclico y a X₂, y
donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de
piridina no estén unidos por un enlace glicosídico,
o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

20 En un forma de esta realización, el primer analito es hidroxibutirato y la primera enzima es una hidroxibutirato
deshidrogenasa. En un aspecto de esta forma, la hidroxibutirato deshidrogenasa es 3-hidroxibutirato
deshidrogenasa. La segunda enzima es una glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa. En un aspecto
adicional, la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



25 en la que

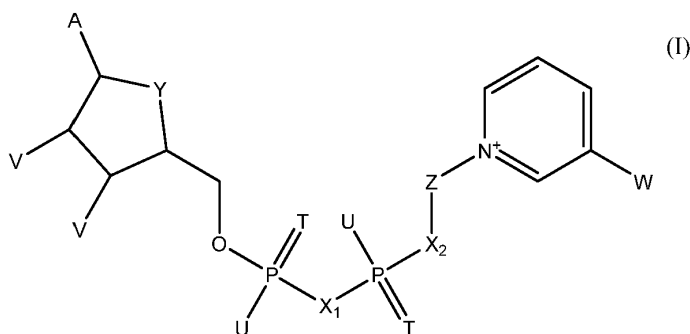
- 30 A = adenina,
T = en cada caso indica O,
U = en cada caso indica OH,
V = en cada caso indica OH,
W = CON(R)₂ en la que R indica H,
X₁ = O,
X₂ = O,
35 Y = O y
Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)



en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

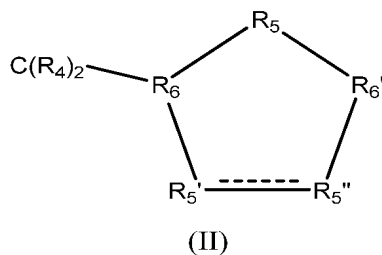
- 5
 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

10 En otro aspecto adicional, la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

- 15
 A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 20 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 25 Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)



en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

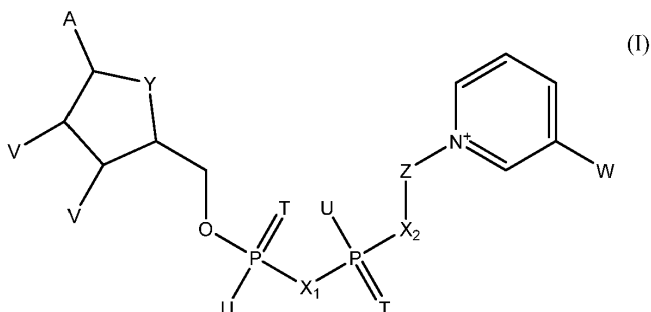
- 30
 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 35 R6' = CH.

En otro aspecto adicional, la coenzima es tio-NAD. En otro aspecto adicional, la coenzima es tio-NADP.

40 En una forma adicional de la presente realización, el elemento de ensayo incluye un primer material de reactivo que incluye la primera enzima o el sustrato para la primera enzima, y la coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. El elemento de ensayo incluye también un segundo material de reactivo que incluye la segunda enzima o el sustrato para la segunda enzima, y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en FAD, NAD, NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo.
 45 En un aspecto adicional, el elemento de ensayo incluye una tira de ensayo configurada para transportar el primer y segundo materiales de reactivo. En otro aspecto adicional, la tira de ensayo incluye un primer sistema de electrodos asociado al primer material reactivo y un segundo sistema de electrodo asociado al segundo material reactivo. En

otro aspecto de esta forma, el primer material reactivo incluye además uno de nitrosoanilina, ferricianuro de potasio y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio.

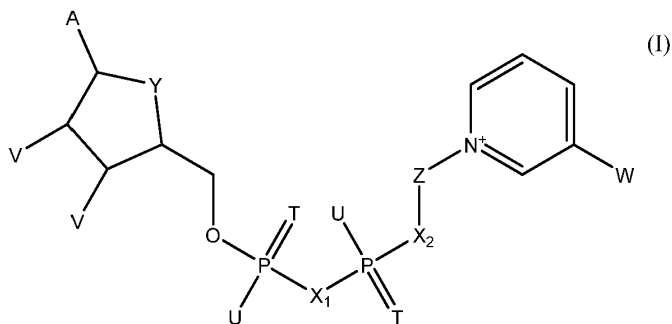
5 En otra realización, un material de reactivo incluye 3-hidroxiubutirato deshidrogenasa y un compuesto de coenzima de acuerdo con la fórmula (I):



en la que

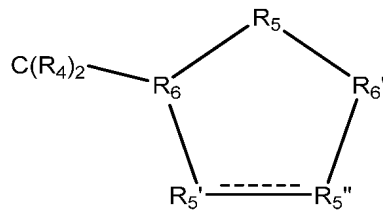
- 10 A = adenina o un análogo de la misma,
 T = en cada caso independientemente indica O o S,
 U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,
 V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,
 15 W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,
 X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,
 Y = NH, S, O o CH₂,
 Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo
 20 seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄ donde CR₄ está unido
 al grupo cíclico y a X₂, y
 donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de
 piridina no estén unidos por un enlace glicosídico,
 o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

25 En un forma de esta realización, el compuesto de coenzima es de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

- 30 A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en cada caso indica OH,
 35 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 40 Z = un anillo carbocíclico saturado de 5 miembros de fórmula general (II)

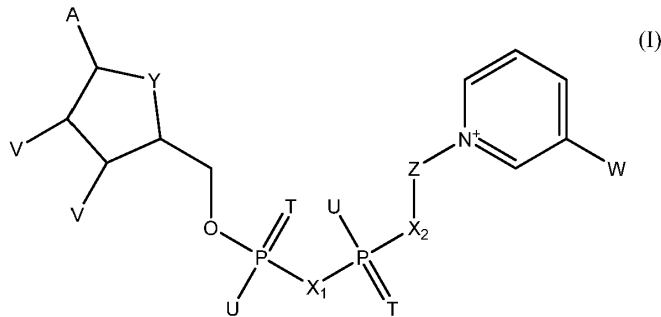


(II)

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

- 5 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 10 R6' = CH.

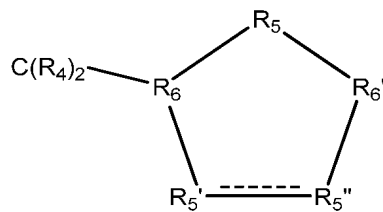
En otra forma de esta realización, el compuesto de coenzima es de acuerdo con la fórmula (I)



(I)

15 en la que

- A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 20 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 25 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico saturado de 5 miembros de fórmula general (II)



(II)

30 en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

- R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 35 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

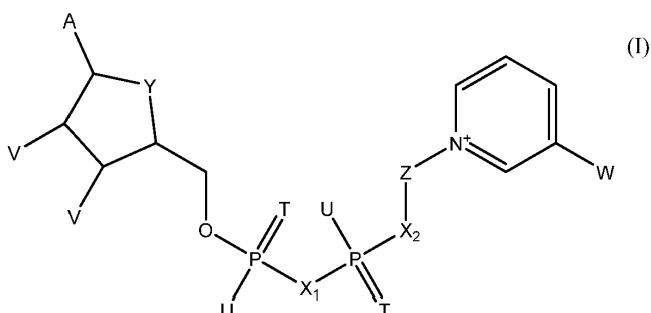
En una forma adicional, el material reactivo incluye además uno de nitrosoanilina, ferricianuro de potasio y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio.

5 En otra forma de esta realización, el elemento de ensayo incluye una tira de ensayo que transporta el material reactivo para determinar un primer analito y un segundo analito.

En otro aspecto adicional, la tira de ensayo está configurada para la determinación electroquímica del primer y segundo analitos.

10 En otra realización más, un método para determinar el primer y segundo analitos en una muestra incluye proporcionar un elemento de ensayo configurado para determinar el primer y segundo analitos y que incluye una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tío-NAD, tío-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I):

15



en la que

- 20 A = adenina o un análogo de la misma,
 T = en cada caso independientemente indica O o S,
 U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,
 V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,
 W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,
 25 X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,
 Y = NH, S, O o CH₂,
 Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄₂ donde CR₄₂ está unido al grupo cíclico y a X₂, y
 30 donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de piridina no estén unidos por un enlace glicosídico,
 o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos;

poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra; detectar el primer analito; y detectar el segundo analito.

35

En una forma de esta realización, el primer analito es hidroxibutirato y el segundo analito es glucosa. En un aspecto de esta forma, las etapas de detección del primer analito y detección del segundo analito se llevan a cabo de forma simultánea. En otro aspecto de esta forma, las etapas de detección del primer analito y detección del segundo analito se completan en cinco segundos tras poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra.

40

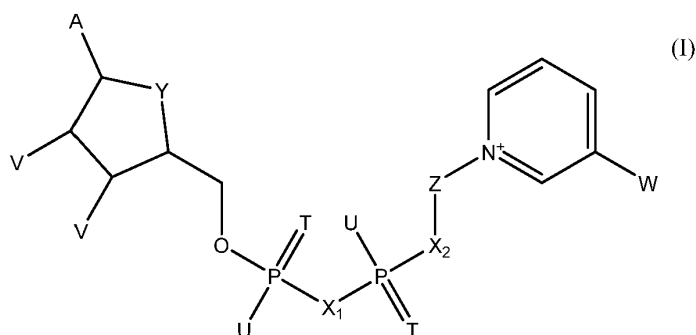
En otra realización más, un método incluye las etapas de proporcionar un elemento de ensayo configurado para determinar los valores de glucosa y cetona en una muestra; poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra; y determinar los valores de glucosa y cetona en la muestra en 7,5 segundos tras el contacto del elemento de ensayo con la muestra. En una forma, el elemento de ensayo incluye un primer material de reactivo para determinar el valor de glucosa y un segundo material de reactivo para determinar el valor de cetona. En un aspecto de esta forma, el segundo material de reactivo incluye una hidroxibutirato deshidrogenasa. En una forma, la etapa de determinación de los valores de glucosa y cetona en la muestra se completa en 5 segundos tras el contacto del elemento de ensayo con la muestra. En otra forma, los valores de glucosa y cetona se determinan en 2 segundos uno con respecto a otro durante la etapa de determinación. En otra forma, la muestra comprende sangre.

45

En otra forma del presente método, el elemento de ensayo incluye una primera enzima dependiente de co-enzima o un sustrato para la primera enzima y una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima. El elemento de ensayo también incluye una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tío-NAD, tío-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I):

50

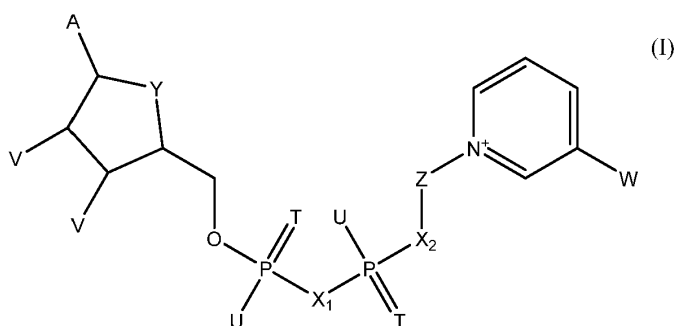
55



en la que

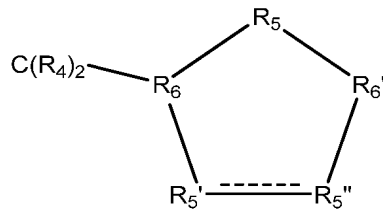
- 5 A = adenina o un análogo de la misma,
T = en cada caso independientemente indica O o S,
U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,
V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,
10 W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,
X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,
Y = NH, S, O o CH₂,
Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo
seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄ donde CR₄ está unido
al grupo cíclico y a X₂, y
15 donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de
piridina no estén unidos por un enlace glicosídico,
o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

20 En un aspecto, el primer analito es hidroxibutirato y la primera enzima es una hidroxibutirato deshidrogenasa. En un
aspecto adicional, la hidroxibutirato deshidrogenasa es 3-hidroxibutirato deshidrogenasa. En un aspecto adicional, la
segunda enzima es una deshidrogenasas seleccionada entre el grupo que consiste en glucosa deshidrogenasa,
lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, sorbitol
deshidrogenasa y una amino ácido deshidrogenasa que comprende L-amino ácido deshidrogenasa. En otro aspecto
25 más, el segundo analito es glucosa y la segunda enzima es glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa. En un
aspecto adicional, la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

- 30 A = adenina,
T = en cada caso indica O,
U = en cada caso indica OH,
V = en cada caso indica OH,
35 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
X₁ = O,
X₂ = O,
Y = O y
Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)
- 40

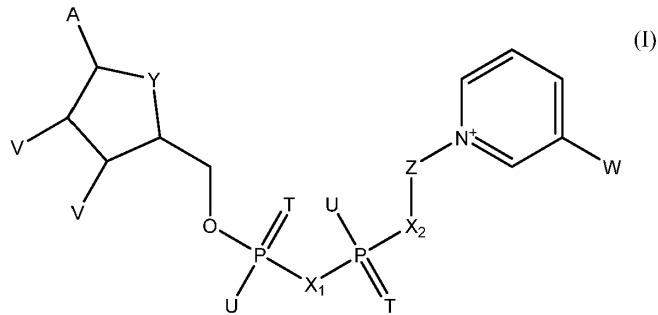


(II)

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

- 5 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 10 R6' = CH.

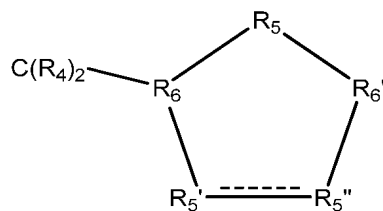
En otro aspecto adicional, la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



(I)

15 en la que

- A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 20 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 25 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)



(II)

30 en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

- R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 35 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

En otro aspecto adicional, la coenzima es tio-NAD. En otro aspecto adicional, la coenzima es tio-NADP.

En un aspecto adicional, el elemento de ensayo incluye un primer material de reactivo que incluye la primera enzima o el sustrato para la primera enzima, y la coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. En un aspecto adicional, el elemento de ensayo incluye también un segundo material de reactivo que incluye la segunda enzima o el sustrato para la segunda enzima, y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en FAD, NAD, NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. En un aspecto adicional, el elemento de ensayo incluye una tira de ensayo configurada para transportar el primer y segundo materiales de reactivo. En otro aspecto adicional, la tira de ensayo incluye un primer sistema de electrodos asociado al primer material reactivo y un segundo sistema de electrodo asociado al segundo material reactivo. En otro aspecto, el primer material reactivo incluye además uno de nitrosoanilina, ferricianuro de potasio y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio.

Otro aspecto de la presente solicitud es una técnica única para medir la presencia y/o la concentración de analitos múltiples en las muestras de ensayo. Otros aspectos incluyen métodos únicos, sistemas, dispositivos, estuches, conjuntos, equipo y/o aparato relacionado con la detección de analitos en una muestra.

Otros aspectos, las realizaciones, formas, características, beneficios, objetivos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y las figuras proporcionadas en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una vista en perspectiva de un primer elemento de ensayo de realización.

La Figura 2 es una vista en despiece, en perspectiva de diversas características del elemento de ensayo de la Figura 1.

La Figura 3 es una vista en despiece, en perspectiva de un segundo elemento de ensayo de realización.

La Figura 4 es una vista parcial, de corte transversal del elemento de ensayo de la Figura 3.

La Figura 5 es una ilustración esquemática de un instrumento analítico estructurado para el uso con el elemento de ensayo de la Figura 1.

Las Figuras 6-18 son ilustraciones gráficas de respuestas de hidroxibutirato determinadas con varios materiales de reactivo.

Descripción detallada de las realizaciones ilustradas

Con fines de favorecer la comprensión de los principios de la invención, ahora se hace referencia a las realizaciones ilustradas en los dibujos y al lenguaje específico a usar para la descripción de las mismas. No obstante, se comprende que no se pretende limitación alguna al alcance de la invención, dichas alteraciones y modificaciones adicionales en el dispositivo ilustrado, y dichas aplicaciones adicionales de los principios de la invención tal y como se ilustran en la presente memoria se contemplan como acontecen normalmente para el experto en la técnica a la cual pertenece la invención.

Se proporcionan materiales de reactivos y elementos de ensayo asociados. En una realización, un elemento de ensayo que tiene funcionalidad dual incluye una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima, una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima, y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I). En un aspecto, el primer analito es hidroxibutirato y la primera enzima es hidroxibutirato deshidrogenasa, y el segundo analito es glucosa y la segunda enzima es glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa. En otra realización, el elemento de ensayo es parte de un sistema que también incluye un medidor configurado para interactuar con el elemento de ensayo con el fin de evaluar el primer y segundo analitos en la muestra. Esta evaluación puede variar entre detectar la presencia del primer y segundo analitos hasta la determinación de la concentración del primer y segundo analitos. El primer y segundo analitos y el fluido de muestra pueden ser cualquiera para los cuales el sistema de ensayo resulte apropiado, aunque en una forma particular pero no limitante del primer analito sea hidroxibutirato, el segundo analito sea glucosa y el fluido de muestra sea sangre o un fluido intersticial. Otros aspectos de la aplicación al sujeto van destinados a materiales de reactivo únicos. Se describen aspectos y características adicionales de la presente solicitud con respecto a las realizaciones ilustradas como se muestra a continuación.

En referencia a las FIGS. 1 y 2, ahora se proporcionan detalles adicionales de un primer elemento 10 de ensayo de realización configurado para evaluar los primer y segundo analitos en una muestra. Se proporciona el elemento de ensayo 10 como sensor electroquímico que incluye una cámara de recepción de muestra para el fluido de muestra, y un primer y segundo materiales de reactivo para la producción de señales electroquímicas en presencia del primer y segundo analitos. En la forma ilustrada, el elemento de ensayo 10 se extiende entre un extremo 12 de inserción de medidor y un extremo de dosificación 14. En una forma no ilustrada, la forma del extremo de dosificación 14 se puede distinguir del extremo 12 de inserción de medidor para ayudar a los usuarios a la manipulación apropiada del

elemento de ensayo 10. El elemento de ensayo 10 también puede incluir uno o más gráficos (no mostrados) para proporcionar al usuario una recomendación sobre la manipulación y usos apropiados.

5 El elemento de ensayo 10 se proporciona en forma de una tira de ensayo desechable que tiene una construcción laminar incluyendo un sustrato e base 16, una capa de separación 18, una cubierta del cuerpo 20 y una cubierta de
10 cámara 22. Detalles adicionales de los elementos de ensayo que incluyen una construcción laminar similar se proporcionan en la patente de Estados Unidos N.º 7.727.467, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad. La capa de separación 18 incluye una parte hueca 24 para proporcionar una
15 cámara 26 de recepción de muestra que se extiende entre el sustrato de base 16 y la cubierta de cuerpo 20 y la cubierta de cámara 22. En esta configuración, la cámara 26 de recepción de muestra se abre en el extremo de dosificación 14 del elemento de ensayo 10 a través de una abertura 28 que está configurada para facilitar el paso de un fluido de muestra al interior de la cámara 26 de recepción de muestra. También se contemplan formas en las que la cámara 26 de recepción de muestra se abre a través de una abertura ubicada a lo largo de un lado del elemento de ensayo 10. También se contemplan las formas en las que la cámara 26 de recepción de muestra se abre a través de una abertura ubicada a lo largo de la longitud completa del extremo de dosificación 14 y que incluye una parte de los lados.

20 La cubierta de cuerpo 20 y la cubierta de cámara 22 se superponen a la capa de separación 18 y definen un rendija 30 entre ellas que proporciona un abertura de purga que comunica con la cámara 26 de recepción de muestra, para permitir que el aire salga de la cámara 26 de recepción de muestra a medida que el fluido entra en la cámara 26 de recepción de muestra a través de la abertura 28. La rendija 30 se encuentra ubicada en una posición relativa con respecto a la cámara 26 de recepción de muestra que está en el interior de la ubicación de los sistemas de electrodo (descritos anteriormente) ubicados en la cámara 26 de recepción de muestra. El fluido de muestra que penetra en la cámara 26 de recepción de muestra avanza tan lejos como la abertura de purga, pero no más. Cuando se observa desde la parte superior, la rendija proporciona una indicación visual de una "línea llena" para confirmar que los sistemas de electrodo de la cámara 26 de recepción de muestra se han humedecido de forma apropiada o se han cubierto para que funcionen de manera adecuada. Además, o como alternativa, los electrodos de suficiencia de dosis también se pueden colocar en posición adyacente a la rendija 30 para detectar cuando el fluido de muestra ha avanzado hasta la rendija 30, para garantizar que ha tenido lugar la humectación de los electrodos de medición.

30 Aparte de los sistemas de electrodo y los materiales de reactivo, la cámara 26 de recepción de muestra puede estar vacío o puede incluir alternativamente un material sorbente. Los materiales sorbente apropiados incluyen poliéster, nailon, celulosa y derivados de celulosa tales como nitrocelulosa. Cuando se incluye, un material sorbente contribuye a facilitar la captación del fluido de muestra contribuyendo a la disipación del fluido en el interior de la cámara 26 de recepción de muestra. El uso de un material sorbente también serviría para reducir de forma adicional el volumen de huecos de la cámara 26 de recepción de muestra para la recepción del fluido de muestra. En una forma, el llenado de la cámara 26 de recepción de muestra tiene lugar por medio de acción capilar. El llenado de la cámara 26 de recepción de muestra también se puede aumentar por otros medios, tales como la aplicación de presión sobre el fluido de muestra para impulsarlo al interior de la cámara 26 de recepción de muestra y/o la creación de un vacío sobre la cámara 26 de recepción de muestra para forzar al fluido de muestra hacia el interior de la cámara 26 de recepción de muestra. Además, una o más superficies de la cámara 26 de recepción de muestra pueden estar formadas por un material hidrófilo, provisto de un revestimiento de un material hidrófilo, o sometido a un tratamiento de aumento de la naturaleza hidrófila con el fin de facilitar el llenado de la cámara 26 de recepción de muestra con la muestra de ensayo.

45 El elemento de ensayo 10 está configurado para detectar la presencia y/o medir la concentración de, el primer y segundo analitos por medio de reacciones de oxidación y reducción electroquímica. Estas reacciones se traducen en una señal eléctrica que se puede correlacionar con una cantidad o concentración del analito. Como se muestra en la figura 2, cuando únicamente se ilustran ciertas características del elemento de ensayo 10, el sustrato 16 transporta un primer sistema de electrodo 32 que incluye una pluralidad de electrodos 34 y trazas de electrodo 36 que terminan en capas de contacto 38. Los electrodos 34 quedan definidos por las partes de las trazas de electrodo 36 que están ubicadas dentro de la cámara 26 de recepción de muestra. El sustrato 16 también transporta un segundo sistema de electrodo 46 que incluye una pluralidad de electrodos 48 y trazas de electrodo 50 que terminan en capas de contacto 52. Los electrodos 48 quedan definidos por las partes de las trazas de electrodo 50 que están ubicadas dentro de la cámara 26 de recepción de muestra. Debería comprenderse que las configuraciones ilustradas de los sistemas de electrodo 32, 46 no son limitantes, y se contemplan configuraciones alternativas.

60 El elemento de ensayo 10 también incluye un primer material de reactivo 60 que se superpone en al menos una parte de los electrodos 34 del primer sistema de electrodo 32 dentro de la cámara 26 de recepción de muestra, y un segundo material de reactivo 62 que se superpone en al menos una parte de los electrodos 48 del segundo sistema de electrodo 46 dentro de la cámara 26 de recepción de muestra. El primer y segundo materiales de reactivo 60, 62 son apropiados para producir señales electroquímicas en presencia de los analitos de ensayo primero y segundo, y se disponen dentro de la cámara 26 de recepción de muestra en posición para proporcionar la señal electroquímica a los electrodos 34, 48 en la cámara 26 de recepción de muestra. En la forma ilustrada, un espacio 64 se extiende entre los materiales de reactivo primero y segundo 60, 62, aunque también se contemplan formas en las cuales el espacio 64 se encuentra ausente y el primer y segundo materiales de reactivo forman una capa continua sobre los

electrodos 34, 48. A continuación, se proporciona detalles adicionales con respecto al primer y segundo materiales de reactivo 60, 62 en la presente memoria.

Los electrodos 34 del primer sistema de electrodo 32 incluyen un conjunto de electrodos de medición en forma de electrodo de trabajo 40 y contra electrodo 42 que incluye partes 44a y 44b separadas en los lados opuestos del electrodo de trabajo 40. Como se usa en el presente documento, un "electrodo de trabajo" es un electrodo en el que un analito experimenta electro-oxidación o electro-reducción con o sin el concurso de un mediador redox, mientras que la expresión "contra electrodo" hace referencia a un electrodo que está emparejado con el electrodo de trabajo y a través del cual pasa corriente electroquímica igual en magnitud y opuesta en signo a la corriente que pasa a través del electrodo de trabajo. Se entiende que la expresión "contra electrodo" incluye contra electrodos que también funcionan como electrodos de referencia (es decir, contra electrodos/referencia). Los electrodos 48 del segundo sistema de electrodo 46 incluyen un conjunto de electrodos de medición en forma de electrodo de trabajo 54 y contra electrodo 56 que incluye partes 58a y 58b separadas en los lados opuestos del electrodo de trabajo 54. Con esta configuración, la cámara 26 de recepción de muestra está configurada de manera que el fluido de muestra que penetra en la cámara 26 de recepción de muestra está ubicado en contacto electrolítico con los electrodos de trabajo 40 y 54 y contra electrodos 42 y 56. Esta configuración también permite que la corriente eléctrica fluya entre los electrodos de medición para afectar a la electro-oxidación o electro-reducción del primer y segundo analitos. Debería apreciarse no obstante que lo anterior únicamente es una de un número de configuraciones para los electrodos de medición.

Un elemento de ensayo 110 de realización alternativa para la evaluación de los analitos primero y segundo en una muestra se ilustra en las Figuras 3 y 4. El elemento de ensayo 110 se produce utilizando una técnica de fabricación de cabeza a cabeza. Generalmente, detalles adicionales de la presente técnica, y del elemento de ensayo 110, se encuentran en la publicación de patente internacional n.º WO 2012/003306, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad. Como se ilustra en la FIG. 3, los patrones de electrodo 112 se encuentran dispuestos en dos columnas (un conjunto de patrones de electrodo en la columna A y un conjunto en la columna B) sobre una capa estirada (cinta) de un sustrato 114. El elemento de ensayo 110 también incluye patrones 116 de electrodo de cámara de muestra ubicados cerca unos de otros y cerca del centro del sustrato 114 y las capas de contacto 118 separadas una de otra y ubicadas cerca de los bordes opuestos del sustrato 114. En la forma ilustrada, los patrones de electrodo son todos similares; no obstante en formas alternativas al menos parte de los patrones de electrodos pueden ser diferentes de otros patrones de electrodo. Se aplica un primer material de reactivo 120 sobre los electrodos 116 de cámara de muestra en la columna A y un segundo material de reactivo 122 sobre los electrodos 116 de cámara de muestra en la columna B.

Una capa de separación 124 se encuentra unida a la parte superior del sustrato 114 con una capa adhesiva 126. En la forma ilustrada, un tira estirada o cinta forma la capa de separación 124 para cubrir los patrones de electrodo de ambas columnas A y B, aunque también son posibles formas en las que dos tiras separadas de capa de separación 124 se encuentran unidas individualmente al sustrato 114 en la columna A y la columna B y están alineadas a lo largo de la línea central 128. La capa de separación 124 incluye una pluralidad de partes de recorte 130 dispuestas a lo largo de la línea central 128. Cuando se conecta la capa de separación 124 con el sustrato 114, las partes de recorte 130 forman los perímetros de las cámaras de muestra 132 (Figura 4). Se une una capa 134 de sustrato superior continua individual a la parte superior de la capa de separación 124 con una capa de adhesivo 136 e incluye una pluralidad de aberturas de purga 142, 144 para facilitar la purga de las cámaras de muestra 132 a medida que se llenan con el fluido de muestra. Aunque se no se ha comentado previamente, debería apreciarse que las capas adhesivas 126, 136 incluyen una pluralidad de partes de recorte 138, 140, respectivamente, dispuestas a lo largo de la línea central 128 y que corresponden a las partes de recorte 130 de la capa de separación 124. Como alternativa, se contempla que la capa adhesiva 136 puede ser una capa sólida sin ninguna abertura o recorte.

Tras combinar y laminar el sustrato 114, los materiales de reactivo 120, 122, la capa de separación 124 y el sustrato superior 134 de manera conjunta, se separa la lámina o rollo de forma que los patrones de electrodos 116 en las columnas A y B queden unidos unos a otros, al tiempo que las tiras de ensayo de las filas adyacentes se separan (tiras de ensayo orientadas lado a lado). En otras palabras, las tiras de ensayo en la columna A no están completamente separadas de las tiras de ensayo en la columna B, y se forman pares de tiras de ensayo con cada par de tiras de ensayo dispuesto de forma cabeza con cabeza. Cada par de tiras de ensayo se puede doblar para colocar las capas de contacto 118 de la tira de ensayo de la columna A en posición adyacente con las capas de contacto 118 de la tira de ensayo de la columna B, y para colocar el extremo de muestra de la tira de ensayo de la columna A en posición adyacente y mirando en la misma dirección que el extremo de muestra de la tira de ensayo de la columna B. Usando este tipo de par de tira de ensayo cabeza con cabeza, se proporciona un biosensor de uso dual en el que el usuario puede aplicar una muestra de fluido corporal a ambas tiras de ensayo de forma simultánea con el fin de someter a ensayo un primer y segundo analitos diferentes usando una sola muestra. En una realización, se puede proporcionar un medio de filtración de sangre dentro de cámaras 132 de muestra duales antes de doblar el par de forma conjunta con el fin de evitar que la sangre y el reactivo se mezclen entre las cámaras 132.

Debería apreciarse que las cámaras 132 de cada par de orientación cabeza con cabeza de las tiras de ensayo debería quedar expuesto cuando el par de tiras de ensayo se doblan a lo largo de la línea central 128. Se pueden usar técnicas de fabricación alternativas para garantizar que ambas cámaras de muestra 132 quedan expuestas. Por

ejemplo, en una realización, una de las capas de sustrato, por ejemplo la capa superior 134, se encuentra completamente separada a lo largo de la línea central 128 durante la fabricación, al tiempo que el sustrato 114 se encuentra no modificado o modificado para doblarse de manera predecible alrededor de la línea central 128. En una realización alternativa, una de las capas de sustrato está modificada, tal como a través de perforaciones o corte parcial para separación sencilla por parte del usuario a lo largo de la línea central 128 al tiempo que el otro sustrato está modificado, tal como por medio de marcaje, deformación o rizado, para doblarse de forma predecible o separarse alrededor de una línea recta, por ejemplo, una línea central 128. En otra realización más, tanto la capa superior 134 como el sustrato inferior 114 están modificados para permitir que las tiras de ensayo de cabeza con cabeza se doblen en cualquier dirección, es decir, el usuario puede escoger doblar el par de cabeza con cabeza de las tiras de ensayo para que tengan capas superiores 134 de las dos tiras de ensayo ubicadas en posición adyacente una con respecto a la otra, o para que tengan los sustratos 114 de las dos tiras de ensayo ubicadas en posición adyacente una con respecto a la otra.

Los sustratos 16, 114 pueden estar formados por un material aislante sobre el cual se colocan, respectivamente, los sistemas de electrodo 32, 46 y los patrones de electrodo 112. Normalmente, los plásticos tales como polímeros vinílicos, poliimidas, poliésteres y estirenos proporcionan las propiedades eléctricas y estructurales que se requieren. Además, debido a que los elementos de ensayo se pueden producir en masa a partir de rollos de material, resulta deseable que las propiedades del material sean apropiadas para tener flexibilidad suficiente para el procesado en rollos, al tiempo que también proporcionan una rigidez útil al elemento terminado. El material de los sustratos 16, 114 puede estar seleccionado como un material polimérico flexible tal como poliéster, incluidos materiales de poliéster de alta temperatura; poli(naftalato de etileno) (PEN); y poliimida o mezclas de dos o más de estos. Las poliimidas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo con el nombre comercial de Kapton®, de E.I. duPont de Nemours and Company de Wilmington, Del. (duPont). Un material específico posible para los sustratos 16, 114 es MELINEX® 329 disponible en duPont.

Se pueden formar electrodos de trabajo y contraelectrodos, y las partes restantes de los sistemas de electrodo 32, 46 y patrones de electrodo 112, a partir de una diversidad de materiales. En un aspecto, los electrodos deberían tener una resistencia eléctrica relativamente baja y deberían ser electroquímicamente inertes en el intervalo de operación de los elementos de ensayo. Los conductores apropiados para el electrodo de trabajo incluyen oro, paladio, platino, carbono, titanio, dióxido de rutenio y óxido de indio y estaño, e iridio, así como otros. El contra electrodo puede estar hecho de materiales iguales o diferentes, por ejemplo, plata/cloruro de plata. En una realización específica, los electrodos de trabajo y contraelectrodos ambos son electrodos de oro.

Los sistemas de electrodo 32, 46 y los patrones de electrodo 112 se pueden aplicar a los sustratos 16, 114, respectivamente, de cualquier forma que produzca electrodos de conductividad e integridad apropiadas. Los procesos a modo de ejemplo incluyen metalizado por bombardeo e impresión, justo para proporcionar algunas posibilidades no limitantes. En una forma específica, se proporcionan electrodos de oro por medio de revestimiento de los materiales de los sustratos 16, 114 y posteriormente retirando las partes seleccionadas del revestimiento para que den lugar a los sistemas de electrodos 32, 46 y patrones de electrodo 112. Un método particular para retirar las partes del revestimiento incluye ablación por láser, y más particularmente ablación por láser de campo amplio, como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 7.073.246, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Normalmente, las técnicas de ablación con láser incluyen la ablación de una capa metálica individual o una composición de multi-capa que incluye un material aislante y un material conductor, por ejemplo, un laminado metálico de una capa metálica revestida sobre o laminada hasta obtener un material aislante. La capa metálica puede contener metales puros, aleaciones u otros materiales, que son conductores metálicos. Los ejemplos de metales o conductores de tipo metálico incluyen: aluminio, carbono (tal como grafito), cobalto, cobre, galio, oro, indio, níquel, paladio, platino, plata, titanio, mezclas de los mismos y aleaciones o disoluciones sólidas de estos materiales. En un aspecto, los materiales están seleccionados para ser esencialmente no reactivos para los sistemas biológicos, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen oro, platino, paladio, carbono y óxido de estaño e iridio. La capa metálica puede ser de cualquier espesor deseado que, en una forma específica, es de aproximadamente 500 nm.

Debería comprenderse que la forma ilustrada de los elementos de ensayo 10, 110 es no limitante, y que también se contemplan configuraciones alternativas para los elementos de ensayo de función dual de la aplicación en cuestión, incluyendo las dispuestas para las técnicas de detección óptica. A este respecto, en una forma adicional y no limitante, un elemento de ensayo de función dual puede incluir una configuración de tipo sándwich en la que el primer sustrato que transporta el primer sistema de electrodo está ubicado sobre un segundo sustrato que transporta el segundo sistema de electrodo. El primer y segundo sustratos están separados uno con respecto al otro por una capa intermedia que incluye un canal capilar o se forma un canal capilar entre el primer y segundo sustratos. En esta configuración, el fluido de muestra que penetra en el canal capilar se dirige hacia los sistemas de electrodo primero y segundo de forma que tiene lugar un cubrimiento simultáneo o casi simultáneo del primer y segundo sistemas de electrodo. Aunque se no se ha comentado previamente, debería comprenderse que el primer sustrato está provisto de un primer material de reactivo apropiado para la determinación de un primer analito y que el segundo sustrato está provisto de un segundo material de reactivo apropiado para la determinación de un segundo analito. A modo de ejemplo no limitante, una técnica para la producción de elementos de ensayo que tienen esta configuración implica

la producción por separado del primer sustrato que transporta el primer material de reactivo y el primer sistema de electrodo y el segundo sustrato que transporta el segundo material de reactivo y el segundo sistema de electrodo y posteriormente la conexión del primer y el segundo sustratos de forma conjunta.

5 En otra forma no limitante, un elemento de ensayo de función dual puede incluir una configuración de tipo sándwich ligeramente diferente. En esta configuración, un primer sustrato que transporta el primer sistema de electrodo está ubicado sobre un segundo sustrato que transporta el segundo sistema de electrodo. Sin embargo, el primer y segundo sustratos se unen por medio de una capa adhesiva y cada uno de ellos incluye una cámara de muestra por separado ubicada con respecto a su respectivo sistema de electrodo en lugar de un canal capilar individual. En esta
10 forma, el elemento de ensayo incluye una configuración que facilita el llenado simultáneo o casi simultáneo de las cámaras de muestra individuales de forma que también tenga lugar el cubrimiento simultáneo o casi simultáneo del primer y segundo sistemas de electrodo. Aunque se no se ha comentado previamente, debería comprenderse que el primer sustrato está provisto de un primer material de reactivo apropiado para la determinación de un primer analito y que el segundo sustrato está provisto de un segundo material de reactivo apropiado para la determinación de un
15 segundo analito. Este elemento de ensayo también se puede producir utilizando la técnica comentada anteriormente en conexión con la otra configuración de tipo sándwich descrita en la presente memoria. Detalles adicionales de un elemento de ensayo no limitante que tiene esta forma se proporcionan en la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2012/003306 (incorporada anteriormente en la presente memoria).

20 Ejemplos adicionales de configuraciones no limitantes que se pueden utilizar para el elemento de ensayo de la solicitud en cuestión se divulgan en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.984.307 y 4.397.956, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Se contempla que los elementos de ensayo 10, 110 pueden ser útiles para la determinación de una amplia
25 diversidad de primer y segundo analitos a partir de un fluido biológico. Por ejemplo, los elementos de ensayo 10, 110 puede adaptarse fácilmente para su uso con materiales de reactivo 60, 62 y 120, 122 que tengan cualquier química apropiada que se pueda usar para evaluar la presencia y/o la concentración del primer y segundo analitos. Los materiales de reactivo 60, 62 y 120, 122 son operativos para reaccionar con el primer y segundo analitos con el fin de producir señales electroquímicas que representen la presencia y/o la concentración del primer y segundo analitos
30 en el fluido de muestra. Como se comentará con detalle más adelante, los materiales de reactivo 60, 62 y 120, 122 pueden incluir una diversidad de componentes activos seleccionados para determinar la presencia y/o concentración de diversos primer y segundo analitos. Las químicas de ensayo de los materiales de reactivo 60, 62 y 120, 122, por tanto, están seleccionadas con respecto a los primer y segundo analitos objeto de evaluación. Dichos analitos pueden incluir, por ejemplo, glucosa, colesterol, colesterol HDL, triglicéridos, glicerina, lactatos, lactato
35 deshidrogenasa, malatos, alcohol, ácido úrico, sorbitol, aminoácidos, 1,5-anhidroglucitol y analitos representativos de cuerpos de cetona, tales como hidroxibutirato. En una realización particular, los elementos de ensayo 10, 110 incluyen materiales de reactivo 60, 62 y 120, 122, respectivamente, que están seleccionados para determinar la presencia y/o la concentración de hidroxibutirato y glucosa en sangre.

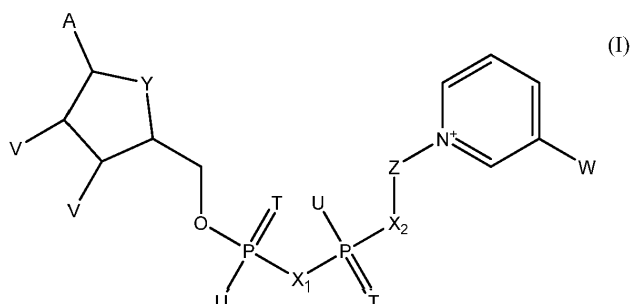
40 Los ejemplos no limitantes de fluidos biológicos en los cuales se pueden evaluar los analitos primero y segundo incluyen cualquier fluido corporal en el cual se puedan medir los analitos, tales como un fluido intersticial, lágrimas, orina y sangre. El término "sangre" en el contexto del presente documento incluyen sangre y sus componentes carentes de células, en concreto plasma y suero. Cuando los elementos de ensayo están configurados para evaluación de hidroxibutirato y glucosa, el fluido de muestra puede incluir específicamente, por ejemplo, sangre capilar nueva obtenida de la punta del dedo o puntos alternativos aprobados (por ejemplo, antebrazo, palma, lóbulo de la oreja, parte superior del brazo, pantorrilla o muslo), sangre venosa nueva u orina. Además, los elementos de ensayo también pueden ser útiles en conexión con el control de fluidos que se usan de forma convencional para verificar la integridad del sistema para ensayo.

50 El fluido corporal que contiene el analito objeto de evaluación se puede adquirir y proporcionar a los elementos de ensayo de cualquier forma. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de sangre de forma convencional por medio de incisión cutánea, tal como con una lanceta, y posteriormente contacto del elemento de ensayo con el fluido que aparece en la superficie de la piel. En un aspecto, los elementos de ensayo se encuentran operativos para la evaluación del analito deseado aunque únicamente usando muestras de fluido muy pequeñas. De forma similar, en
55 un aspecto, únicamente es necesaria una ligera incisión cutánea para producir el volumen de fluido necesario para el ensayo, y el dolor y otras cuestiones de dicho método se pueden minimizar o suprimir.

Los materiales de reactivo 60, 120 incluyen una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima y una coenzima apropiada. Normalmente, estos componentes se disuelven o suspenden en una
60 matriz. La muestra de ensayo de líquido se hidrata o disuelve en la matriz, y el primer analito difunde a través de la matriz para reaccionar con uno o más de los componentes activos. Las enzimas apropiadas que podrían incluirse en los materiales de reactivo 60, 120 son, por ejemplo, deshidrogenasas seleccionadas entre glucosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.47), lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37), glicerol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1), hidroxibutirato deshidrogenasa (HBDH), tal como 3-hidroxibutirato deshidrogenasa o beta-hidroxibutirato deshidrogenasa, alfa-hidroxibutirato deshidrogenasa y gamma-hidroxibutirato deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa y una amino ácido deshidrogenasa por ejemplo L-

65

amino ácido deshidrogenasa (E.C.1.4.1.5). Las enzimas apropiadas adicionales son oxidasas tales como glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4) o colesterol oxidasa (E.C.1.1.3.6) o aminotransferasas tales como aspartato o alanina aminotransferasa, 5'-nucleotidasa o creatina quinasa. Dependiendo de la enzima seleccionada, las coenzimas potenciales apropiadas para su uso en los materiales reactivos 60, 120 incluyen tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

A = adenina o un análogo de la misma,

T = en cada caso independientemente indica O o S,

U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,

V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,

X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,

Y = NH, S, O o CH₂,

Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄ donde CR₄ está unido al grupo cíclico y a X₂, y

donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de piridina no estén unidos por un enlace glicosídico, o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

En una realización, W = CONH₂ o COCH₃.

Los sustituyentes a modo de ejemplo en Z están seleccionados entre el grupo que consiste en OH, F, Cl y alquilo C₁-C₂ que opcionalmente está fluorado o clorado y/o con sustitución de OH, O-alquilo C₁-C₂.

En otra realización, un primer residuo V es OH y un segundo residuo V es un grupo fosfato. Opcionalmente, el grupo OH y el grupo fosfato pueden formar un anillo de forma conjunta con los átomos de carbono al cual se unen.

Ejemplos no limitantes de los análogos de adenina incluyen adenina sustituida-C₈ y sustituida-N₆, variantes desaza tales como variantes 7-desaza aza tales como 8-aza o combinaciones tales como 7-desaza u 8-aza o análogos carboxílicos tales como formicina en la que las variantes 7-desaza pueden estar sustituidas en la posición 7 con halógeno, alquínilo C₁-C₆, alquénilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆. En una realización adicional, los compuestos contienen análogos de adenosina que contienen por ejemplo 2-metoxidesoxirribosa, 2'-fluorodesoxi-ribosa, hexitol, altritol o análogos policíclicos tales como bicíclicos, LNA y azúcares tricíclicos en lugar de ribosa. En una forma, los oxígenos de (di)fosfato también pueden estar isoelectríicamente sustituidos tal como por ejemplo O⁻ por S⁻ y/o por BH₃⁻, O por NH, NCH₃ y/o por CH₂ y =O por =S. En una realización al menos un residuo U de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) es diferente de OH y en otras realizaciones al menos un residuo U=BH₃⁻.

Otro compuesto más particular pero no limitante de acuerdo con la fórmula (I) en la que:

A = adenina,

T = en cada caso indica O,

U = en cada caso indica OH,

V = en cada caso indica OH,

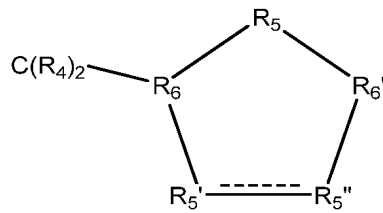
W = CON(R)₂ en la que R indica H,

X₁ = O,

X₂ = O,

Y = O y

Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)



(II)

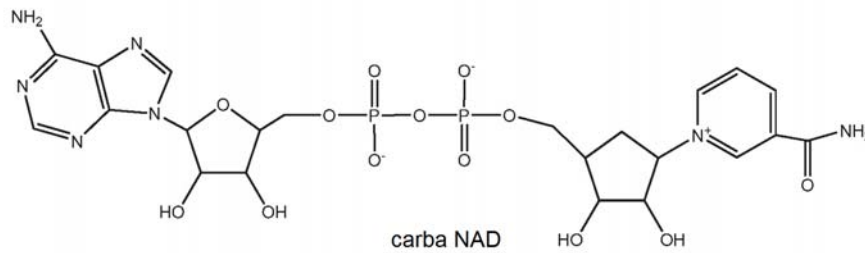
en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

- 5 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR4₂,
 R6 = CH, y
 10 R6' = CH

es carba-NAD o cNAD.

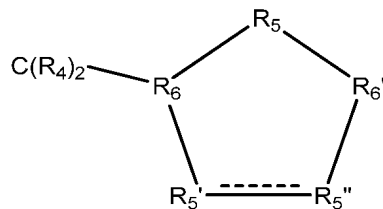
carba-NAD tiene la siguiente estructura:

15



Otro compuesto más particular pero no limitante de acuerdo con la fórmula (I) en la que:

- 20 A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 25 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)



(II)

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

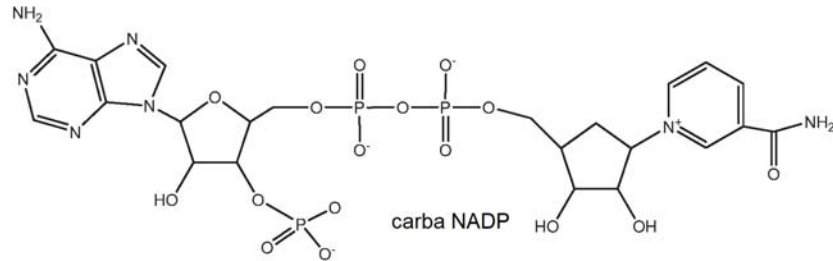
- 35 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR4₂,

R6 = CH, y
R6' = CH

es carba-NADP o cNADP.

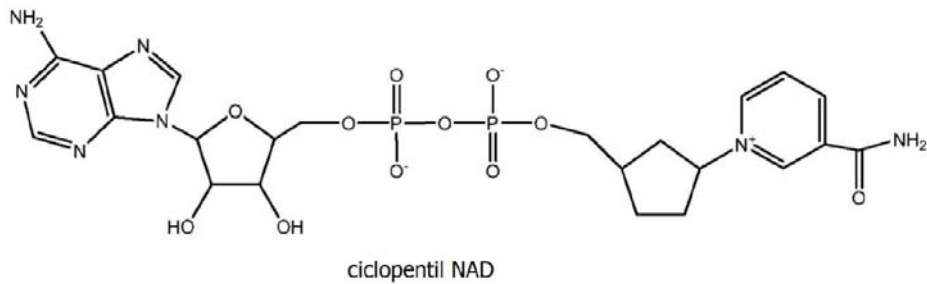
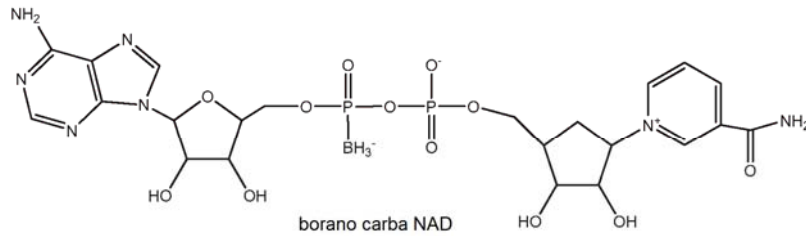
5

carba-NADP tiene la siguiente estructura:

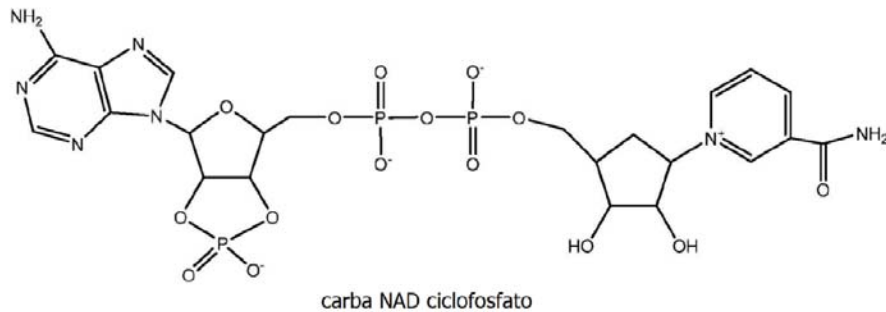


10

Otros compuestos particulares pero no limitantes de acuerdo con la fórmula (I) incluyen borano carba-NAD, ciclopentil NAD y carba-NAD ciclofosfato. Estos compuestos tienen las siguientes estructuras:



15



20

Detalles adicionales respecto a los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) y la síntesis de los mismos se proporcionan en la patente de Estados Unidos N°. publicación 2008/0231809.

En una realización, los materiales de reactivo 60, 120 están operativos para facilitar la detección de la presencia y/o concentración de hidroxibutirato e incluyen una hidroxibutirato deshidrogenasa. Los ejemplos no limitantes de hidroxibutirato deshidrogenasa incluyen alfa-hidroxibutirato deshidrogenasa, beta o 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y gamma-hidroxibutirato deshidrogenasa. En una forma específica, la hidroxibutirato deshidrogenasa es 3-

hidroxibutirato deshidrogenasa. En esta realización, los materiales de reactivo 60, 120 incluyen además una coenzima seleccionada entre tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. En una forma específica, los materiales de reactivo 60, 120 incluyen 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y uno de carbaNAD o carbaNADP. En las formas en las que el primer material de reactivo incluye una hidroxibutirato deshidrogenasa y una coenzima seleccionada entre tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo, sorprendentemente se ha descubierto que la detección de la presencia y/o la concentración de hidroxibutirato se puede complementar en aproximadamente cinco segundos después de haber puesto en contacto el elemento con la muestra, lo que generalmente corresponde al comienzo del ensayo de glucosa del arte que tarda aproximadamente cinco segundos. Detalles adicionales a este respecto se proporcionan en conexión con los "EJEMPLOS" siguientes. Debería comprenderse que el uso de materiales de reactivo que requieren más de cinco segundos para completar la detección de la presencia y/o concentración de hidroxibutirato también resultan apropiados para su uso en los elementos de ensayo de la aplicación en cuestión.

Además, aunque el uso de un material de reactivo que incluye una hidroxibutirato deshidrogenasa y una coenzima seleccionada entre tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo se ha descrito en la presente memoria en conexión con los elementos de ensayo que tienen funcionalidades duales, debería comprenderse que el uso de este material de reactivo en conexión con los elementos de ensayo que tienen funcionalidad individual también resulta posible. Los ejemplos no limitantes de las formas adicionales de los elementos de ensayo para los cuales se contempla el uso del presente material de reactivo se divulgan en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º. publicación 2005/0016844 y la patente de Estados Unidos N.º 7.008.799.

Debería también apreciarse que el material de reactivo no requiere ninguna enzima adicional, tal como diforasa, que sea operativa para la detección de la presencia y/o concentración de hidroxibutirato en formas en las que incluye una hidroxibutirato deshidrogenasa y una coenzima seleccionada entre tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. Sin embargo, la inclusión de enzimas adicionales en el primer material de reactivo también se contempla.

El primer material de reactivo también puede incluir un mediador. El mediador puede estar seleccionado como cualquier especie química (generalmente electroactiva) que puede participar en un esquema de reacción que implique la enzima, el primer analito y la coenzima y los productos de reacción de los mismos, para generar un producto de reacción electroactivo y detectable. Normalmente, la participación del mediador en la reacción implica un cambio en su estado de oxidación (por ejemplo, una reducción), tras la interacción con uno cualquiera del primer analito, la enzima, o la coenzima, o una especie que es un producto de reacción de uno de estos (por ejemplo, una coenzima que se ha hecho reaccionar hasta un estado de oxidación diferente). Una diversidad de mediadores exhiben comportamiento electroquímico apropiado. Preferentemente, un mediador puede también ser estable en su forma oxidada, puede opcionalmente exhibir electroquímica redox reversible, puede preferentemente exhibir buena solubilidad en disoluciones acuosas, y preferentemente reacciona de forma rápida para genera un producto de reacción electroactivo. Los ejemplos de mediadores incluyen benzoquinona, azul de meldola, complejos de metal de transición tales como ferricianuro de potasio y derivados de osmio (véase la patente internacional n.º. publicación WO 98/35225) y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio (véase la patente de Estados Unidos n.º. 8.008.037). El primer material de reactivo también puede incluir un compuesto basado en nitrosoanilina que actúa como precursor de mediador (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos n.º. 5.286.362). A este respecto, el precursor de mediador basado en nitrosoanilina se rompe para dar lugar a componentes de mediador reversibles cuando entra en contacto con la muestra de analito tal como sangre.

Los ejemplos adicionales de mediadores y precursores de mediador basado en nitrosoanilina incluyen N-(2-hidroxietil)-N'-p-nitrosifenil-piperazina, N,N-bis-(2-hidroxietil)-p-nitrosoanilina, o-metoxi-[N,N-bis-(2)-hidroxietil]-p-nitrosoanilina, p-hidroxinitrosobenceno, N-metil-N'-(4-nitrosifenil)-piperazina, p-quinona dioxima, N,N-dimetil-p-nitrosoanilina, N,N-dietil-p-nitrosoanilina, N-(4-nitrosifenil)-morfolina, N-bencil-N-(5'-carboxipentil)-p-nitrosoanilina, N,N-dimetil-4-nitroso-1-naftilamina, N,N,3-trimetil-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxietil)-5-nitrosoindolina, N,N-bis-(2-hidroxietil)-3-cloro-4-nitrosoanilina, 2,4-dimetoxi-nitrosobenceno, N,N-bis-(2-metoxietil)-4-nitrosoanilina, 3-metoxi-4-nitrosfenol, N-(2-hidroxietil)-6-nitroso-1,2,3,4-tetrahidroquinolina, N,N-dimetil-3-cloro-4-nitrosoanilina, N,N-bis-(2-hidroxietil)-3-fluoro-4-nitrosoanilina, N,N-bis-(2-hidroxietil)-3-metilio-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxietil)-N-(2-(2-metoxietoxi)-etil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxietil)-N-(3-metoxi-2-hidroxi-1-propil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxietil)-N-(3-(2-hidroxietoxi)-2-hidroxi-1-propil)-4-nitrosoanilina y N-(2-hidroxietil)-N-(2-(2-hidroxietoxi)-etil)-4-nitrosoanilina.

Los materiales de reactivo 62, 122 incluyen una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima y una coenzima apropiada. Normalmente, estos componentes se disuelven o suspenden en una matriz. La muestra de ensayo de líquido se hidrata o disuelve en la matriz, y el analito difunde a través de la matriz para reaccionar con uno o más de los componentes activos. Las enzimas apropiadas que podrían incluirse en los materiales de reactivo 62, 122 son, por ejemplo, deshidrogenasas seleccionadas entre glucosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.47), lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37), glicerol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1), hidroxibutirato deshidrogenasa (HBDH), tal como 3-hidroxibutirato deshidrogenasa o beta-hidroxibutirato deshidrogenasa, alfa-hidroxibutirato deshidrogenasa y

gamma-hidroxibutirato deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa y una amino ácido deshidrogenasa por ejemplo L-amino ácido deshidrogenasa (E.C.1.4.1.5). Las enzimas apropiadas adicionales son oxidasas tales como glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4) o colesterol oxidasa (E.C.1.1.3.6) o aminotransferasas tales como aspartato o alanina aminotransferasa, 5'-nucleotidasa o creatina quinasa. Dependiendo de la enzima seleccionada, las coenzimas potenciales apropiadas para su uso en los materiales reactivos 62, 122 incluyen FAD, NAD, NADP, tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo.

En una realización en la que los materiales de reactivo 60, 120 están operativos para facilitar la detección de la presencia y/o concentración de hidroxibutirato, los materiales de reactivo 62, 122 están operativos para facilitar la detección de la presencia y/o concentración de glucosa e incluyen una enzima para glucosa. En una forma específica, la enzima es una glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa. En esta realización, los materiales de reactivo 62, 122 incluyen además una coenzima seleccionada entre FAD, NAD, NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. Aunque se no se ha comentado previamente, se contemplan formas en las cuales los materiales de reactivo 60 y 62 tienen una coenzima común, por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo, y se unen de manera conjunta para formar una capa de reactivo individual de forma que el espacio 64 entre ellas quede eliminado. Debería también entenderse que los materiales de reactivo descritos en la presente memoria para detectar la presencia y/o la concentración de glucosa no son limitantes, y que se conocen otras formas para los mismos en la técnica. Los ejemplos no limitantes adicionales de materiales de reactivo operativos para detectar la presencia y/o la concentración de glucosa se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.727.467 y en la patente de Estados Unidos n.º 8.008.037. El segundo material de reactivo también puede incluir un mediador. El mediador puede estar seleccionado como cualquier especie química (generalmente electroactiva) que pueda participar en un esquema de reacción que implique la segunda enzima, el segundo analito y la coenzima, y los productos de reacción de los mismos, para generar un producto de reacción electroactivo y detectable. Normalmente, la participación del mediador en la reacción implica un cambio en su estado de oxidación (por ejemplo, una reducción), tras la interacción con uno cualquiera del segundo analito, la segunda enzima, o la coenzima, o una especie que sea un producto de reacción de uno de estos (por ejemplo, una coenzima que se ha hecho reaccionar hasta un estado de oxidación diferente). Una diversidad de mediadores exhiben comportamiento electroquímico apropiado. Preferentemente, un mediador puede también ser estable en su forma oxidada, puede opcionalmente exhibir electroquímica redox reversible, puede preferentemente exhibir buena solubilidad en disoluciones acuosas, y preferentemente reacciona de forma rápida para genera un producto de reacción electroactivo. Los ejemplos de mediadores incluyen benzoquinona, azul de meldola, complejos de metal de transición tales como ferricianuro de potasio y derivados de osmio (véase la patente internacional n.º. publicación WO 98/35225) y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio (véase la patente de Estados Unidos n.º. 8.008.037). El segundo material de reactivo también puede incluir un compuesto basado en nitrosoanilina que actúa como precursor de mediador (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos n.º. 5.286.362). A este respecto, el precursor de mediador basado en nitrosoanilina se rompe para dar lugar a componentes de mediador reversibles cuando entra en contacto con la muestra de analito tal como sangre.

Los ejemplos adicionales de mediadores y precursores de mediador basado en nitrosoanilina incluyen N-(2-hidroxi-etil)-N'-p-nitrosofenil-piperazina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-p-nitrosoanilina, o-metoxi-[N,N-bis-(2)-hidroxi-etil]-p-nitrosoanilina, p-hidroxinitrosobenceno, N-metil-N'-(4-nitrosofenil)-piperazina, p-quinona dioxima, N,N-dimetil-p-nitrosoanilina, N,N-di-etil-p-nitrosoanilina, N-(4-nitrosofenil)-morfolina, N-bencil-N-(5'-carboxipentil)-p-nitrosoanilina, N,N-dimetil-4-nitroso-1-naftilamina, N,N,3-trimetil-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-5-nitrosoindolina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-3-cloro-4-nitrosoanilina, 2,4-dimetoxi-nitrosobenceno, N,N-bis-(2-metoxietil)-4-nitrosoanilina, 3-metoxi-4-nitrosfenol, N-(2-hidroxi-etil)-6-nitroso-1,2,3,4-tetrahidroquinolina, N,N-dimetil-3-cloro-4-nitrosoanilina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-3-fluoro-4-nitrosoanilina, N,N-bis-(2-hidroxi-etil)-3-metil-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(2-(2-metoxietoxi)-etil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(3-metoxi-2-hidroxi-1-propil)-4-nitrosoanilina, N-(2-hidroxi-etil)-N-(3-(2-hidroxi-etoxi)-2-hidroxi-1-propil)-4-nitrosoanilina y N-(2-hidroxi-etil)-N-(2-(2-hidroxi-etoxi)-etil)-4-nitrosoanilina.

Los materiales de reactivo también pueden incluir una diversidad de adyuvantes para mejorar las diversas propiedades o características de los mismos. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 7.749.437 referida con anterioridad. Por ejemplo, los materiales de reactivo 60, 62 y 120, 122 pueden incluir materiales para facilitar su colocación sobre los respectivos sustratos 16, 114 y para mejorar su adherencia a los mismos, o para aumentar la velocidad de hidratación de los materiales de reactivos por parte del fluido de muestra. Adicionalmente, los materiales de reactivo pueden incluir componentes seleccionados para mejorar las propiedades físicas de la capa de reactivo seco resultante, y la captación de una muestra de ensayo líquido para el análisis. Los ejemplos de materiales adyuvantes a usar con los materiales de reactivo incluyen espesantes, moduladores de viscosidad, agentes filmógenos, estabilizadores, tampones, detergentes, agentes gelificantes, cargas, agentes de apertura de película, agentes colorantes y agentes que confieren tixotropía.

Los ejemplos no limitantes de espesantes que se pueden incluir en los materiales de reactivo incluyen (1) almidones, gomas (por ejemplo, pectina, goma guar, goma de algarrobo (semilla de carob), goma konjac, goma de xantano, alginatos y agar), caseína, gelatina y ficocoloides; (2) celulosa y derivados de celulosa semi-sintéticos (carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa); (3) poli(alcohol vinílico) y carboxi-vinilatos; y (4) bentonita, silicatos y sílice coloidal. Formas más específicas de espesantes incluyen una

combinación de goma de xantano comercializada con el nombre comercial de Keltrol F por parte de CP Kelco US, Inc., y carboximetil celulosa comercializada con el nombre comercial de AQUALON® CMC 7F PH de Hercules Inc., Aqualon Division.

5 Los agentes de tixotrópicos y de formación de película que se pueden incluir en los materiales de reactivo incluyen polímeros y sílice. Uno o más agentes tixotrópicos específicos incluyen sílice comercializada con el nombre comercial de Kieselsaure Sipemate FK 320 DS de Degussa AG, aunque un agente de formación de película más específico incluye polivinilpirrolidona, comercializada con el nombre comercial de polivinilpirrolidona Kollidon 25, de BASF, y dispersión de poli(propionato de vinilo).

10 Los estabilizadores para las enzimas en los materiales de reactivos pueden estar seleccionadas entre sacáridos y sales de ácidos mono- y di-grasos. Los estabilizadores más específicos incluyen trehalosa comercializada con el nombre comercial de dihidrato de D(+)-Trehalosa por Sigma Chemical Co. y succinato de sodio.

15 Los ejemplos no limitantes de detergentes que se pueden incluir en los materiales de reactivo incluyen jabones solubles en agua, así como también compuestos tensioactivos sintéticos solubles en agua tales como sales alcalinas, alcalino térrea o de amonio opcionalmente sustituidas de ácidos grasos superiores, por ejemplo, ácido oleico o esteárico, mezclas de ácidos grasos naturales, por ejemplo, aceite de coco o de sebo, sulfatos grasos, ésteres de ácido sulfónico, sales de ácidos alquil sulfónico, sales de taurina de ácidos grasos, amidas de ácido graso y amidas de éster. Formas más específicas de detergentes incluyen una amida de éster, n-octanoil-N-metilglucamida, comercializada con el nombre comercial de Mega-8 de Dojindo Molecular Technologies, Inc., y una sal de ácido graso, sal de N-metil oleil taurato de sodio, comercializada con el nombre comercial de Geropon T77 de Rhodia HPCII (Home, Personal Care and Industrial Ingredients).

25 En una forma, los materiales de reactivo se formulan en forma de disolución viscosa que incluye espesantes y agentes tixotrópicos para mejorar sus propiedades físicas. Los espesantes están seleccionados para proporcionar una matriz espesa, líquida que tiene el resto de componentes dispersados homogéneamente en la misma. Los agentes tixotrópicos y espesantes también inhiben el desplazamiento o dispersión del material líquido o semipastoso sobre la superficie de los sustratos 16, 114 una vez que se han depositado y antes de producirse el secado. Una vez
30 que se han depositado los materiales de reactivo, se secan de forma rápida hasta obtener una matriz fácilmente hidratable.

Como se ha indicado anteriormente, sorprendentemente se ha descubierto que la detección de la presencia y/o la concentración de hidroxibutirato se puede completar en aproximadamente cinco segundos después de haber puesto
35 en contacto el elemento con la muestra en formas en las que el primer material de reactivo incluye una hidroxibutirato deshidrogenasa y una coenzima seleccionada entre tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo. El estado actual de la técnica para el ensayo de glucosa facilita la detección de la presencia y/o concentración de glucosa en aproximadamente cinco segundos después de producirse el contacto entre el elemento y la muestra. La patente de Estados Unidos nº.
40 8.008.037 describe una forma no limitante de ensayo de glucosa que facilita la detección de la presencia y/o concentración de glucosa en este marco temporal. Adicionalmente, las formas no limitantes de ensayo de glucosa que facilitan la detección de la presencia y/o concentración de glucosa en este marco temporal se describen en las patentes de Estados Unidos nos. 7.276.146 y 7.276.147. Debería comprenderse no obstante que se podrían usar otros materiales de reactivo conocidos que faciliten la detección de la presencia y/o concentración de glucosa en
45 este marco temporal o en otros en los elementos de ensayo divulgados en la presente memoria.

En vista de lo anterior, debería apreciarse que la detección de la presencia y/o concentración de hidroxibutirato y glucosa se pueden completar en cinco segundos después de producirse el contacto entre el elemento y la muestra cuando el elemento de ensayo incluye un primer material de reactivo que tiene una hidroxibutirato deshidrogenasa y una coenzima seleccionada entre tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u
50 opcionalmente una forma reducida del mismo, y un segundo material de reactivo que resulte apropiado para la detección de glucosa y formulado de manera apropiada. Sin embargo, también debería comprenderse que también son posibles variaciones en el tiempo de terminación de la detección de hidroxibutirato y glucosa con estos elementos de ensayo y que dependen de, por ejemplo, la formulación específica de los materiales de reactivo, entre otros aspectos. En una forma por ejemplo, la detección de hidroxibutirato y glucosa se completa en 10 segundos después de producirse el contacto entre el elemento de ensayo y la muestra. En una forma, la detección de hidroxibutirato y glucosa se completa en 7,5 segundos después de producirse el contacto entre el elemento de ensayo y la muestra. debería también apreciarse que el tiempo de terminación de la detección de hidroxibutirato y la detección de glucosa pueden ser diferentes. Por ejemplo, en una o más de las formas anteriores u otras formas, la
55 detección de hidroxibutirato se completa en 4 segundos antes o después de completarse la detección de glucosa. En otra variante, la detección de hidroxibutirato se completa en 2 segundos antes o después de completarse la detección de glucosa. En otra variante, la detección de hidroxibutirato se completa en el mismo tiempo, o casi el mismo tiempo, que la detección de glucosa. Debería comprenderse, no obstante, que se contemplan otras variaciones en el marco temporal para la terminación de la detección de hidroxibutirato y glucosa.

65

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son únicamente con fines de ilustración y no se pretende que limiten la invención divulgada en el presente documento a únicamente las realizaciones divulgadas en los mismos.

5

Formulación de Material de Reactivo

Material de Reactivo de la Figura 6

10 Se preparó una disolución tampón de reserva por medio de adición de 7,344 g de sal de sodio MOPS, 0,125 g de Triton™ X-100 (un detergente no iónico de Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO), 2,400 g de trehalosa y 2,026 g de succinato de sodio hexahidratado a 400 ml de agua con doble destilación y se ajustó el pH de la disolución a 8,14. Se añadió la presente disolución a un matraz volumétrico de 500 ml y se diluyó con agua con doble destilación para preparar una disolución de 500 ml.

15

Se completó la preparación de una disolución de tampón/Natrosol/polímero PEO por medio de combinación de 396 g de disolución de tampón inicial con 2 g de poli(óxido de etileno) (300K) y 2 g de Natrosol® 250 M (un polímero de hidroxietilcelulosa soluble en agua no iónico de Ashland, Inc., Covington, KY). La mezcla se agitó durante la noche antes de uso.

20

Se preparó un material de reactivo de nitrosoanilina/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 5,0595 g de disolución de reserva de tampón/polímero de forma seriada: a) se añadieron 0,0415 g de un derivado de nitrosoanilina sustituida (NA 1144 proporcionada por Roche Diagnostics, Inc.) al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,7; b) 25 se añadieron 0,0692 g de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y c) se añadieron 0,2134 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

30 Material de Reactivo de la Figura 7

Se preparó una disolución tampón de reserva por medio de adición de 9,086 g de base de Tris, 0,125 g de Triton™ X-100, 0,625 g de Tergitol® 15-S-9 (un tensioactivo no iónico de The Dow Chemical Company, Midland, MI), 2,400 g de trehalosa y 2,026 g de succinato de sodio hexahidratado a 400 ml de agua con doble destilación y se ajustó el pH 35 de la disolución a 7,95. Se añadió la presente disolución a un matraz volumétrico de 500 ml y se diluyó con agua con doble destilación para preparar una disolución de 500 ml.

40

Se completó la preparación de una disolución de tampón/Natrosol®/polímero PEO por medio de combinación de 396 g de disolución de tampón inicial con 2 g de poli(óxido de etileno) (300K) y 2 g de Natrosol® 250 M. Se homogeneizó la mezcla durante la noche antes de uso. Se preparó un material de reactivo de hexaminorutenio/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 4,048 g de disolución de reserva de tampón/polímero de forma seriada: a) se añadieron 0,0619 g de cloruro de hexaminorutenio y b) 0,0034 g de 1-(3-carboxipropiloxi)-5-etil fenazina al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,9; y c) se añadieron 0,0791 g de ácido libre de carba-NAD a un recipiente 45 de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de hexaminorutenio/fenazina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,24. y se añadieron 0,0862 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y posteriormente se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

50 Material de Reactivo de la Figura 8 y 9

Se preparó un material de reactivo de hexaminorutenio/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 4,048 g de disolución de reserva de tampón de Tris/PEO/polímero de Natrosol® descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 7 de 55 forma seriada: a) se añadieron 0,062 g de cloruro de hexaminorutenio y b) 0,003 g de 1-(3-carboxipropiloxi)-5-etil fenazina al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,9; y c) se añadieron 0,079 g de ácido libre de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de hexaminorutenio/fenazina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,24. y se añadieron 0,259 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y posteriormente se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

60

Material de Reactivo de la Figura 10

65 Se preparó una disolución tampón de reserva por medio de adición de 9,086 g de base de Tris, 0,125 g de Triton™ X-100, 0,625 g de Tergitol® 15-S-9, 2,40 g de trehalosa y 2,026 g de succinato de sodio hexahidratado a 400 ml de

agua con doble destilación y se ajustó el pH a 7,95. Se añadió la presente disolución a un matraz volumétrico de 500 ml y se diluyó con agua con doble destilación para preparar una disolución de 500 ml.

5 Se completó la preparación de la disolución de tampón/polímero Kollidon® VA 64 por medio de combinación de 392 g de disolución tampón inicial con 8 g de Kollidon® VA 64 (un copolímero de vinilpirrolidona-acetato de vinilo de BASF Corporation, Florham Park, NJ). La mezcla se agitó durante la noche antes de uso.

10 Se preparó un material de reactivo de nitrosoanilina/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,071 g de disolución de reserva de tampón/polímero de forma seriada: a) se añadieron 0,0600 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA) y b) 0,050 g de un derivado de nitrosoanilina sustituida (NA 1144 proporcionado por Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN) al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,9; c) se añadieron 0,069 g de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y d) se añadieron 15 0,259 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

Material de Reactivo de la Figura 11

20 Se preparó un material de reactivo de hexaminorutenio/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 4,049 g de disolución de reserva polimérica de tampón Tris/Kollidon® descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) se añadieron 0,040 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA), b) 0,062 g de cloruro de hexaminorutenio y c) 0,003 g de 1-(3-carboxipropiloxi)-5-etil fenazina al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 25 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,9; d) se añadieron 0,079 g de ácido libre de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de hexaminorutenio/fenazina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y e) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

30 Material de Reactivo de la Figura 12

35 Se preparó un material de reactivo de nitrosoanilina/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,074 g de disolución de reserva polimérica de Tris/Kollidon® tampón/polímero descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) 0,060 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA) y b) 0,050 g de un derivado de nitrosoanilina sustituida (NA 1144 proporcionado por Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN) al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,8; c) se añadieron 0,069 g de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y e) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 40 24.000 rpm.

Material de Reactivo de la Figura 13

45 Se preparó un material de reactivo de hexaminorutenio/tio-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,074 g de disolución de reserva polimérica de tampón Tris/Kollidon® descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) 0,060 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA), b) 0,093 g de cloruro de hexaminorutenio y c) 0,005 g de 1-(3-carboxipropiloxi)-5-etil fenazina al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 50 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,9; d) se añadieron 0,079 g de ácido libre de tio-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de hexaminorutenio/fenazina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y e) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

55 Material de Reactivo de la Figura 14

60 Se preparó un material de reactivo de nitrosoanilina/tio-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,074 g de disolución de reserva de Tris/tampón Kollidon®/polímero descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) se añadieron 0,060 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA) y b) 0,050 g de un derivado de nitrosoanilina sustituida (NA 1144 proporcionado por Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN) al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,8, se añadieron c) 0,079 g de ácido libre de tio-NAD a un recipiente de mezcla de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,2; y d) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 65 24.000 rpm.

Material de Reactivo de la Figura 15

Se preparó un material de reactivo de hexaminorutenio/carba-NADP mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,074 g de disolución de reserva polimérica de tampón Tris/Kollidon® descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) se añadieron 0,060 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA), b) 0,093 g de cloruro de hexaminorutenio y c) 0,005 g de 1-(3-carboxipropilo)-5-etil fenazina al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,9; c) se añadieron 0,076 g de ácido libre de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de hexaminorutenio/fenazina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y d) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxi-butirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

Material de Reactivo de la Figura 16

Se preparó un material de reactivo de nitrosoanilina/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,074 g de disolución de reserva de Tris/tampón Kollidon®/polímero descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) se añadieron 0,060 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA) y b) 0,050 g de un derivado de nitrosoanilina sustituida (NA 1144 proporcionado por Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN) al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,8; c) se añadieron 0,076 g de ácido libre de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y d) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxi-butirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

Material de Reactivo de la Figura 17

Se preparó un material de reactivo de ferricianuro/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 4,049 g de disolución de reserva de Tris/tampón Kollidon®/polímero descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) se añadieron 0,040 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA) y b) 0,026 g de ferricianuro de potasio al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm y se ajustó el pH a 7,8; c) se añadieron 0,076 g de ácido libre de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y d) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxi-butirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

Material de Reactivo de la Figura 18

Se preparó un material de reactivo de nitrosoanilina/carba-NAD mediante adición de los siguientes ingredientes a un recipiente de mezcla de velocidad de 20 ml que contenía 6,074 g de disolución de reserva polimérica de Tris/Kollidon® tampón/polímero descrita anteriormente en conexión con el material de reactivo de la Figura 10 de forma seriada: a) se añadieron 0,060 g de sílice pirógena no tratada (Cabosil®, Cabot Corporation, Boston, MA) y b) 0,050 g de un derivado de nitrosoanilina sustituida (NA 1144 proporcionada por Roche Diagnostics, Inc.) al recipiente y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 brpm y se ajustó el pH a 7,8; c) se añadieron 0,079 g de carba-NAD a un recipiente de mezcla de velocidad de 10 ml que contenía 3 ml de disolución de nitrosoanilina, y se mezcló la matriz durante 1 minuto a 24.000 rpm, y se ajustó el pH a 7,2; y d) se añadieron 0,259 g de beta-hidroxi-butirato deshidrogenasa de *alcaligenes faecalis* al recipiente y se mezcló con velocidad durante 2 minutos a 24.000 rpm.

Preparación de Tiras de Ensayo

Se usaron tarjetas de electrodos de marca ACCU-CHECK® Aviva con espaciador y diseños capilares para producir las tiras de ensayo. Se proporcionan 1,5 µl de los materiales de reactivo, descritos anteriormente, en cada uno de los canales capilares de electrodo usando un sistema de suministro en serie PixSys™ SQ (Cartesian Technologies Irvine California) y se secaron durante 1,5 minutos a 45 °C. Se almacenaron las tarjetas secas en atmósfera seca durante la noche y se laminaron las tiras de papeles metalizados hidrófilos de forma manual en la capa de separación sobre la capilar. Se cortaron posteriormente las tarjetas en sensores individuales y se almacenaron en viales desecados hasta su uso.

Preparación de Disoluciones de Ensayo

Se preparó una disolución tampón salina de reserva de fosfato por medio de adición de 0,1829 g de sal monobásica de fosfato de potasio, 0,2007 g de sal dibásica de fosfato de potasio y 2,7956 g de cloruro de potasio a 200 ml de agua con doble destilación y se ajustó el pH de la disolución a 7,00. Se añadió la presente disolución a un matraz volumétrico de 250 ml y se diluyó con agua con doble destilación para preparar una disolución de 250 ml.

Se preparó una disolución de reserva con 21 réplicas de hidroxibutirato por medio de adición de 1,3372 g de sal de sodio de hidroxibutirato a 40 ml de disolución tampón salina de fosfato. Se añadió la disolución a un matraz volumétrico de 50 ml y se diluyó con disolución tampón salina de fosfato hasta 50 ml. Se diluyó de forma seriada la disolución de reserva resultante con tampón salino de fosfato para producir 11 réplicas de reserva de ensayo de hidroxibutirato.

Se prepararon las disoluciones de ensayo finales por medio de adición de 1 ml de disolución salina de fosfato o sangre con 0,05 ml de las disoluciones de reserva de ensayo.

Respuestas de Dosis Cinética

Se midieron muestras de sangre y disolución salina que contenían diversos niveles de hidroxibutirato (mM) utilizando las tiras de ensayo preparadas con anterioridad. Se aplicó el potencial necesario (222 mV para las tiras de hexaaminorutenio y 450 mV para las tiras de nitrosoanilina) tras producirse el contacto de la muestra sobre la tira. El tiempo total de ensayo fue de 6 segundos. El punto final del ensayo se tomó 0,5 segundos (Figura 7) y 5 segundos (Figuras 9 y 10) después de producirse el contacto de la tira de ensayo con la muestra.

Respuestas de Dosis de Punto Final

Se midieron muestras de sangre y disolución salina que contenían diversos niveles de hidroxibutirato (0 hasta 10 mM) utilizando las tiras de ensayo preparadas con anterioridad. El ensayo consistió en un retardo de 4,5 segundos después del contacto de la muestra con la tira de ensayo seguido de aplicación de potencial, 450 mV para las tiras de nitrosoanilina y 222 mV para las tiras de hexaaminorutenio durante 6 segundos después de un período de retardo. El punto final del ensayo se tomó 5 segundos después de producirse el contacto de la tira de ensayo con la muestra.

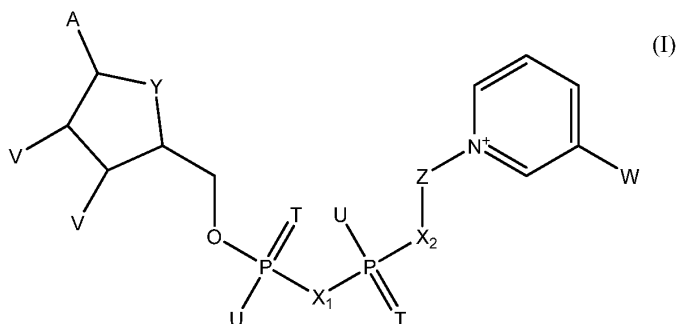
Aunque se no se ha comentado previamente, debería apreciarse que la relación entre la concentración de hidroxibutirato y corriente medida facilita la utilización de materiales de reactivo a modo de ejemplo para analizar el hidroxibutirato.

Debería comprenderse que aunque el uso de términos tales como preferido, preferentemente, o más preferido usado en la descripción anterior indica que la característica descrita puede resultar más deseable, no obstante puede suceder que no sea necesario y se puedan contemplar realizaciones que carezcan del mismo dentro del alcance de la invención, estando definido el alcance por medio de las reivindicaciones siguientes. En la lectura de las reivindicaciones, se pretende que cuando se usan los términos "un/uno/una", "al menos un/uno/una", o "al menos una parte" no existe intención alguna de limitar la reivindicación a únicamente un aspecto, a menos que se afirme específicamente lo contrario en la reivindicación. Cuando se usa el lenguaje "al menos una parte" y/o "una parte" el aspecto puede incluir una parte y/o toda la parte del aspecto, a menos que se afirme específicamente lo contrario.

Se muestran a continuación realizaciones de la invención.

1. Un elemento de ensayo configurado para determinar un primer y segundo analitos, que comprende:

una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima;
 una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima; y
 una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I):



en la que

- A = adenina o un análogo de la misma,
- T = en cada caso independientemente indica O o S,
- U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,
- V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,

X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,

Y = NH, S, O o CH₂,

Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄₂ donde CR₄₂ está unido al grupo cíclico y a X₂, y

donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de piridina no estén unidos por un enlace glicosídico, o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

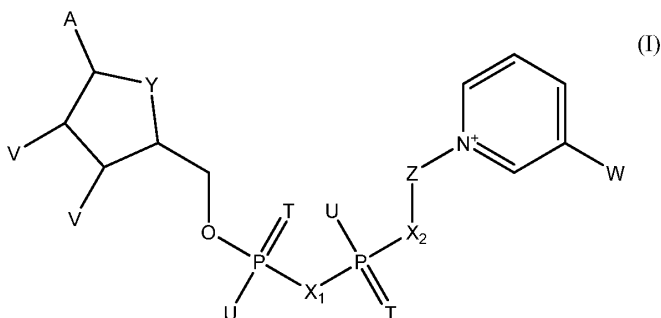
2. El elemento de ensayo de la realización 1, donde el primer analito es hidroxibutirato y la primera enzima es una hidroxibutirato deshidrogenasa.

3. El elemento de ensayo de la realización 2, donde la hidroxibutirato deshidrogenasa es 3-hidroxibutirato deshidrogenasa.

4. El elemento de ensayo de la realización 2, donde la segunda enzima es una deshidrogenasa seleccionada entre el grupo que consiste en glucosa deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa y una amino ácido deshidrogenasa que comprende L-amino ácido deshidrogenasa.

5. El elemento de ensayo de la realización 2, donde el segundo analito es glucosa y la segunda enzima es una glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa.

6. El elemento de ensayo de la realización 5, donde la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

A = adenina,

T = en cada caso indica O,

U = en cada caso indica OH,

V = en cada caso indica OH,

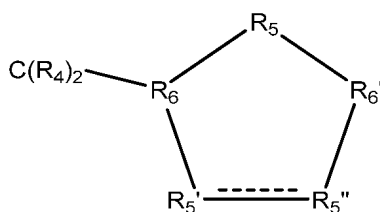
W = CON(R)₂ en la que R indica H,

X₁ = O,

X₂ = O,

Y = O y

Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)



(II)

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

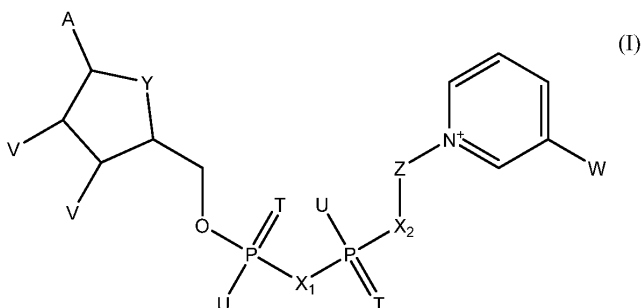
R₄ = H,

R₅' = CHOH,

R5" = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

5

7. El elemento de ensayo de la realización 5, donde la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



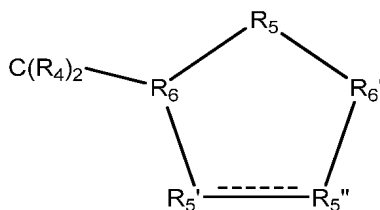
10

en la que

A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)

15

20



(II)

25

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

30

8. El elemento de ensayo de la realización 5, donde la coenzima es tio-NAD.

35

9. El elemento de ensayo de la realización 5, donde la coenzima es tio-NADP.

40

10. El elemento de ensayo de la realización 1, que además comprende un primer material de reactivo, incluyendo el primer material de reactivo la primera enzima o el sustrato para la primera enzima y la coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo.

45

11. El elemento de ensayo de la realización 10, que además comprende un segundo material de reactivo, incluyendo el segundo material de reactivo la segunda enzima o el sustrato para la segunda enzima y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en FAD, NAD, NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo.

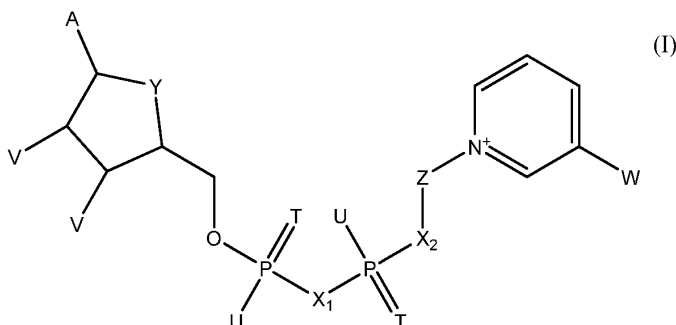
12. El elemento de ensayo de la realización 11, que comprende además una tira de ensayo configurada para transportar el primer y segundo materiales de reactivo.

13. El elemento de ensayo de la realización 12, donde la tira de ensayo incluye un primer sistema de electrodos asociado al primer material reactivo y un segundo sistema de electrodo asociado al segundo material reactivo.

14. El elemento de ensayo de la realización 10, donde el primer material reactivo comprende además uno de nitrosoanilina, ferricianuro de potasio y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio.

15. Un material de reactivo, que comprende:

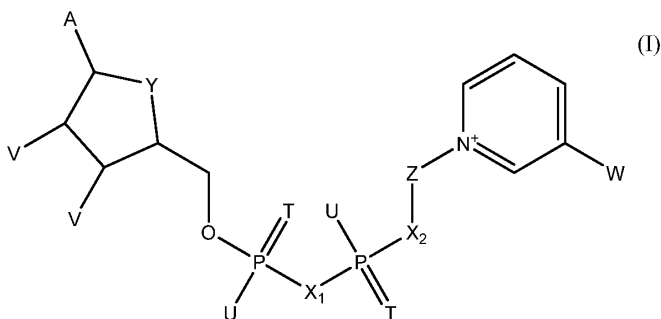
3-hidroxibutirato deshidrogenasa; y
un compuesto de coenzima de acuerdo con la fórmula (I):



en la que

A = adenina o un análogo de la misma,
T = en cada caso independientemente indica O o S,
U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH_3^- , o $BCNH_2^-$,
V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,
W = COOR, $CON(R)_2$, COR, o $CSN(R)_2$ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C_1-C_2 ,
 X_1, X_2 = en cada caso independientemente indica O, CH_2 , $CHCH_3$, $C(CH_3)_2$, NH o NCH_3 ,
Y = NH, S, O o CH_2 ,
Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR_4 donde CR_4 está unido al grupo cíclico y a X_2 , y donde R_4 = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH_3 , con la condición de que Z y el residuo de piridina no estén unidos por un enlace glicosídico, o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

16. El material de reactivo de la realización 15, donde el compuesto de coenzima es de acuerdo con la fórmula (I)

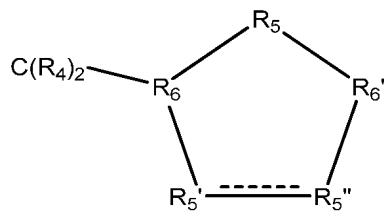


en la que

A = adenina,
T = en cada caso indica O,
U = en cada caso indica OH,
V = en cada caso indica OH,
W = $CON(R)_2$ en la que R indica H,

X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico saturado de 5 miembros de fórmula general (II)

5



(II)

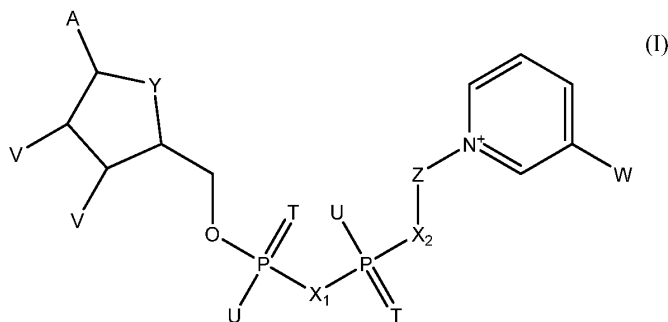
en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

10

R₄ = H,
 R_{5'} = CHOH,
 R_{5''} = CHOH,
 R₅ = CR₄₂,
 R₆ = CH, y
 R_{6'} = CH.

15

17. El material de reactivo de la realización 15, donde el compuesto de coenzima es de acuerdo con la fórmula (I)



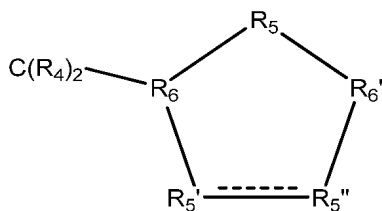
(I)

20

en la que

A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico saturado de 5 miembros de fórmula general (II)

30



(II)

35

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

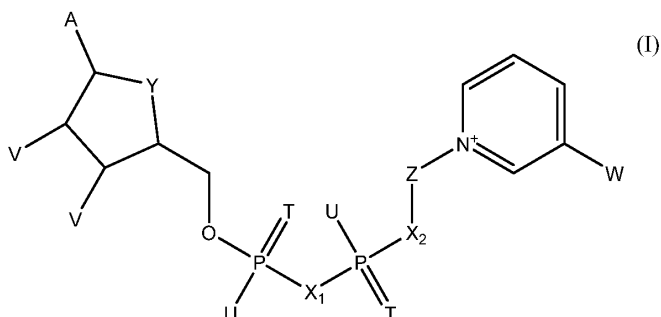
18. El material de reactivo de la realización 15, que además comprende uno de nitrosoanilina, ferricianuro de potasio y una combinación de un derivado de fenazina y cloruro de hexaaminorutenio.

19. Un elemento de ensayo, que comprende una tira de ensayo que transporta un primer material de reactivo de acuerdo con la realización 15 para determinar un primer analito.

20. El elemento de ensayo de la realización 19, donde la tira de ensayo transporta además un segundo material de reactivo para determinar un segundo analito.

21. El elemento de ensayo de la realización 20, donde el segundo material de reactivo incluye una enzima de deshidrogenasa seleccionada entre el grupo que consiste en glucosa deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa y una amino ácido deshidrogenasa que comprende L-amino ácido deshidrogenasa.

22. El elemento de ensayo de la realización 21, donde el segundo material de reactivo incluye además una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en FAD, NAD, NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I):



en la que

A = adenina o un análogo de la misma,
 T = en cada caso independientemente indica O o S,
 U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,
 V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,
 W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,
 X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,
 Y = NH, S, O o CH₂,
 Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄ donde CR₄ está unido al grupo cíclico y a X₂, y donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de piridina no estén unidos por un enlace glicosídico, o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos.

23. El elemento de ensayo de la realización 20, donde la tira de ensayo está configurada para la determinación electroquímica del primer y segundo analitos.

24. Un método de determinación del primer y segundo analitos en una muestra, que comprende las etapas de:

proporcionar un elemento de ensayo de acuerdo con la realización 1;
 poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra;
 detectar el primer analito; y
 detectar el segundo analito.

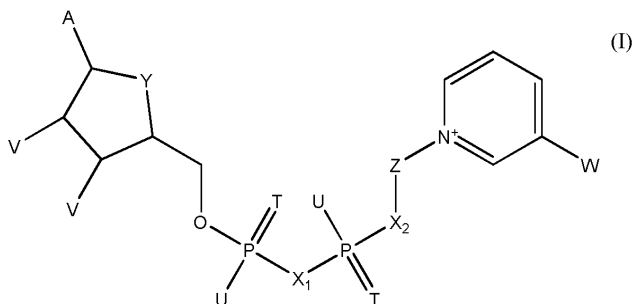
25. El método de la realización 24, donde el primer analito es hidroxibutirato y el segundo analito es glucosa.

26. El método de la realización 25, donde las etapas de detección del primer analito y detección del segundo analito se llevan a cabo de forma simultánea.
- 5 27. El método de la realización 25, donde las etapas de detección del primer analito y detección del segundo analito se completan en cinco segundos después de producirse el contacto del elemento de ensayo con la muestra.
28. Un método, que comprende:
- 10 proporcionar un elemento de ensayo configurado para determinar los valores de glucosa y cetona en una muestra;
 poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra; y
 determinar los valores de glucosa y cetona en la muestra en 7,5 segundos después de producirse el contacto del elemento de ensayo con la muestra.
- 15 29. El método de la realización 28, donde el elemento de ensayo incluye un primer material de reactivo para determinar el valor de glucosa y un segundo material de reactivo para determinar el valor de cetona.
- 20 30. El método de la realización 29, donde el segundo material de reactivo incluye una hidroxibutirato deshidrogenasa.
31. El método de la realización 28, donde la etapa de determinación de los valores de glucosa y cetona en la muestra se completa en 5 segundos después de producirse el contacto del elemento de ensayo con la muestra.
- 25 32. El método de la realización 28, donde los valores de glucosa y cetona se determinan en 2 segundos uno con respecto a otro durante la etapa de determinación.
33. El método de la realización 28, donde la muestra comprende sangre.

REIVINDICACIONES

1. Un elemento de ensayo configurado para determinar un primer y segundo analitos, que comprende:

- 5 una primera enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la primera enzima;
 una segunda enzima dependiente de coenzima o un sustrato para la segunda enzima; y
 una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y un compuesto de acuerdo con la fórmula (I):



10

en la que

15 A = adenina o un análogo de la misma, donde dicho análogo de adenina está seleccionado entre adenina con sustitución-C8; adenina con sustitución-N6; adenina 8-aza; y adenina 7-desaza, donde dicha adenina 7-desaza está opcionalmente sustituida en la posición 7 con halógeno, alquínilo C1-C6, alquénilo C1-C6 o alquilo C1-C6;

T = en cada caso independientemente indica O o S,

U = en cada caso independientemente indica OH, SH, BH₃⁻, o BCNH₂⁻,

20 V = en cada caso independientemente indica OH o un grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, o CSN(R)₂ en la que R en cada caso independientemente indica H o alquilo C₁-C₂,

X₁, X₂ = en cada caso independientemente indica O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH o NCH₃,

25 Y = NH, S, O o CH₂,

Z = un residuo que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C que opcionalmente contiene un heteroátomo seleccionado entre O, S y N y opcionalmente uno o más sustituyentes, y un residuo CR₄₂ donde CR₄₂ está unido al grupo cíclico y a X₂, y

30 donde R₄ = en cada caso independientemente indica H, F, Cl o CH₃, con la condición de que Z y el residuo de piridina no estén unidos por un enlace glicosídico,

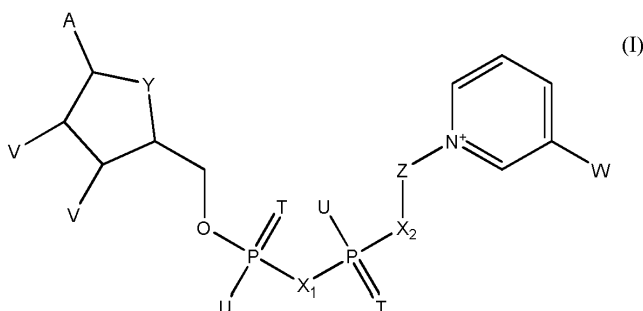
o una sal u opcionalmente una forma reducida de los mismos,

donde el primer analito es hidroxibutirato y la primera enzima es hidroxibutirato deshidrogenasa y donde el segundo analito es glucosa y la segunda enzima es glucosa deshidrogenasa o una glucosa oxidasa.

35 2. El elemento de ensayo de la realización 1, donde la hidroxibutirato deshidrogenasa es 3-hidroxibutirato deshidrogenasa.

3. El elemento de ensayo de la reivindicación 1 o 2, donde la segunda enzima es una glucosa deshidrogenasa.

40 4. El elemento de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



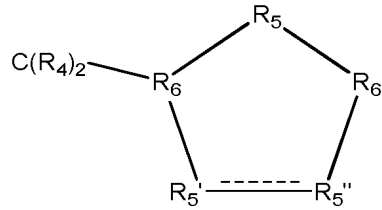
45

en la que

A = adenina,

T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en cada caso indica OH,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)

5



10

(II)

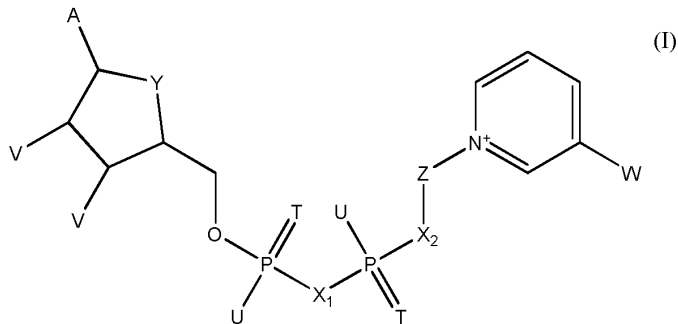
en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

15

R₄ = H,
 R_{5'} = CHOH,
 R_{5''} = CHOH,
 R₅ = CR₄₂,
 R₆ = CH, y
 R_{6'} = CH;

20

preferentemente, donde la coenzima es un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



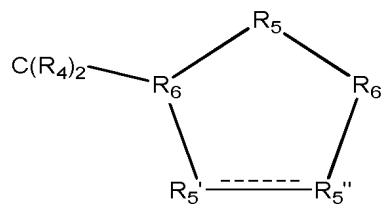
25

en la que

A = adenina,
 T = en cada caso indica O,
 U = en cada caso indica OH,
 V = en un primer caso indica OH y en segundo caso indica un grupo fosfato,
 W = CON(R)₂ en la que R indica H,
 X₁ = O,
 X₂ = O,
 Y = O y
 Z = un anillo carbocíclico de 5 miembros de fórmula general (II)

30

35



(II)

en la que un enlace sencillo está presente entre R5' y R5'', y en la que

- 5 R4 = H,
 R5' = CHOH,
 R5'' = CHOH,
 R5 = CR₄,
 R6 = CH, y
 R6' = CH.

10 5. El elemento de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la coenzima es tio-NAD o donde la coenzima es tio-NADP.

15 6. El elemento de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un primer material de reactivo, incluyendo el primer material de reactivo la primera enzima o el sustrato para la primera enzima y la coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en tio-NAD, tio-NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo y/o que además comprende un segundo material de reactivo, incluyendo el segundo material de reactivo la segunda enzima o el sustrato para la segunda enzima y una coenzima seleccionada entre el grupo que consiste en FAD, NAD, NADP y el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal u opcionalmente una forma reducida del mismo.

20 7. Un método de determinación del primer y segundo analitos en una muestra, que comprende las etapas de:

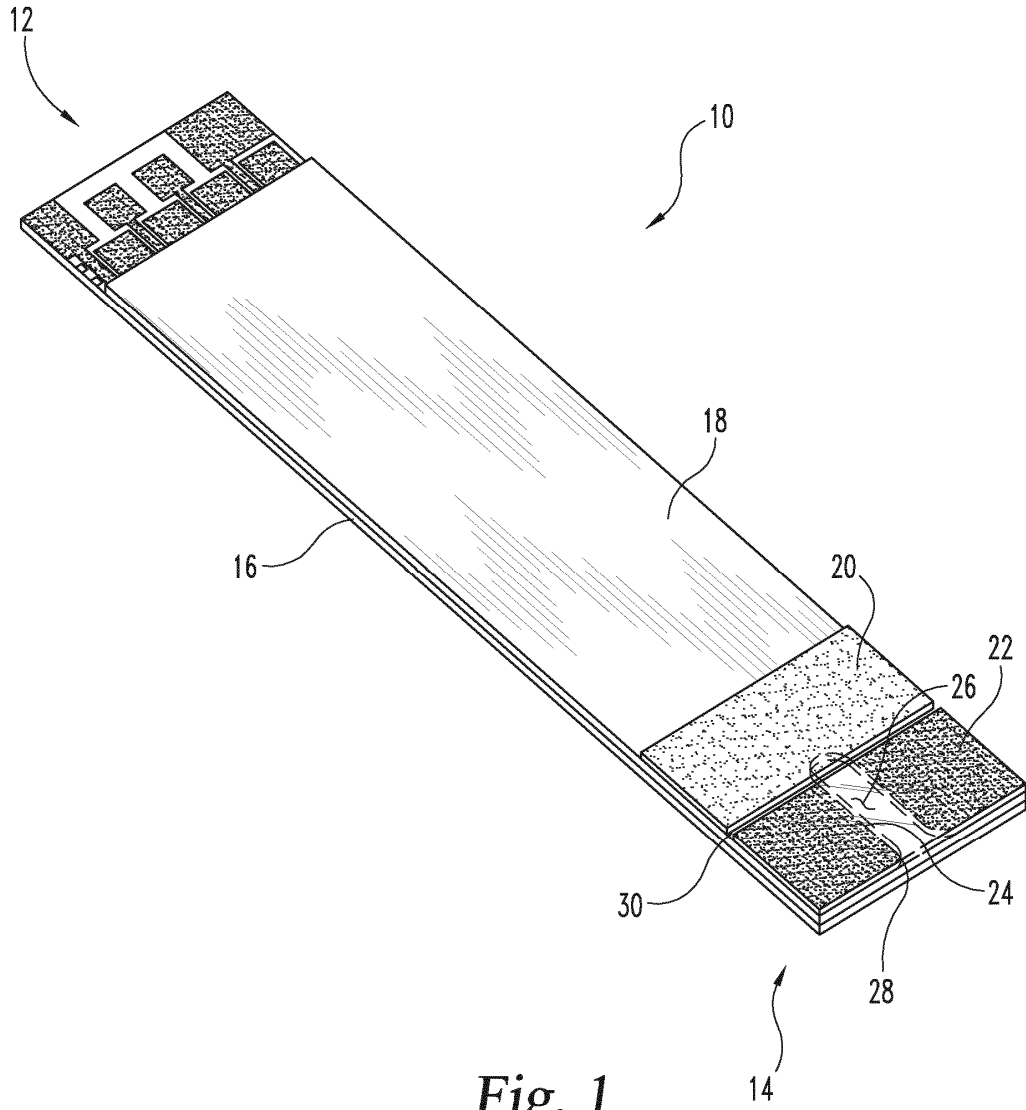
- 25 proporcionar un elemento de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
 poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra;
 detectar el primer analito; y
 y detectar el segundo analito.

8. Un método, que comprende:

- 30 proporcionar un elemento de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 configurado para determinar los valores de glucosa e hidroxibutirato en una muestra;
 poner en contacto el elemento de ensayo con la muestra; y
 determinar los valores de glucosa e hidroxibutirato en la muestra en 7,5 segundos después de producirse el contacto del elemento de ensayo con la muestra.

35 9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, donde la etapa de determinación de los valores de glucosa e hidroxibutirato en la muestra se completa en 5 segundos después de producirse el contacto del elemento de ensayo con la muestra.

40 10. El procedimiento de la reivindicación 8 u 9, donde la muestra comprende sangre.



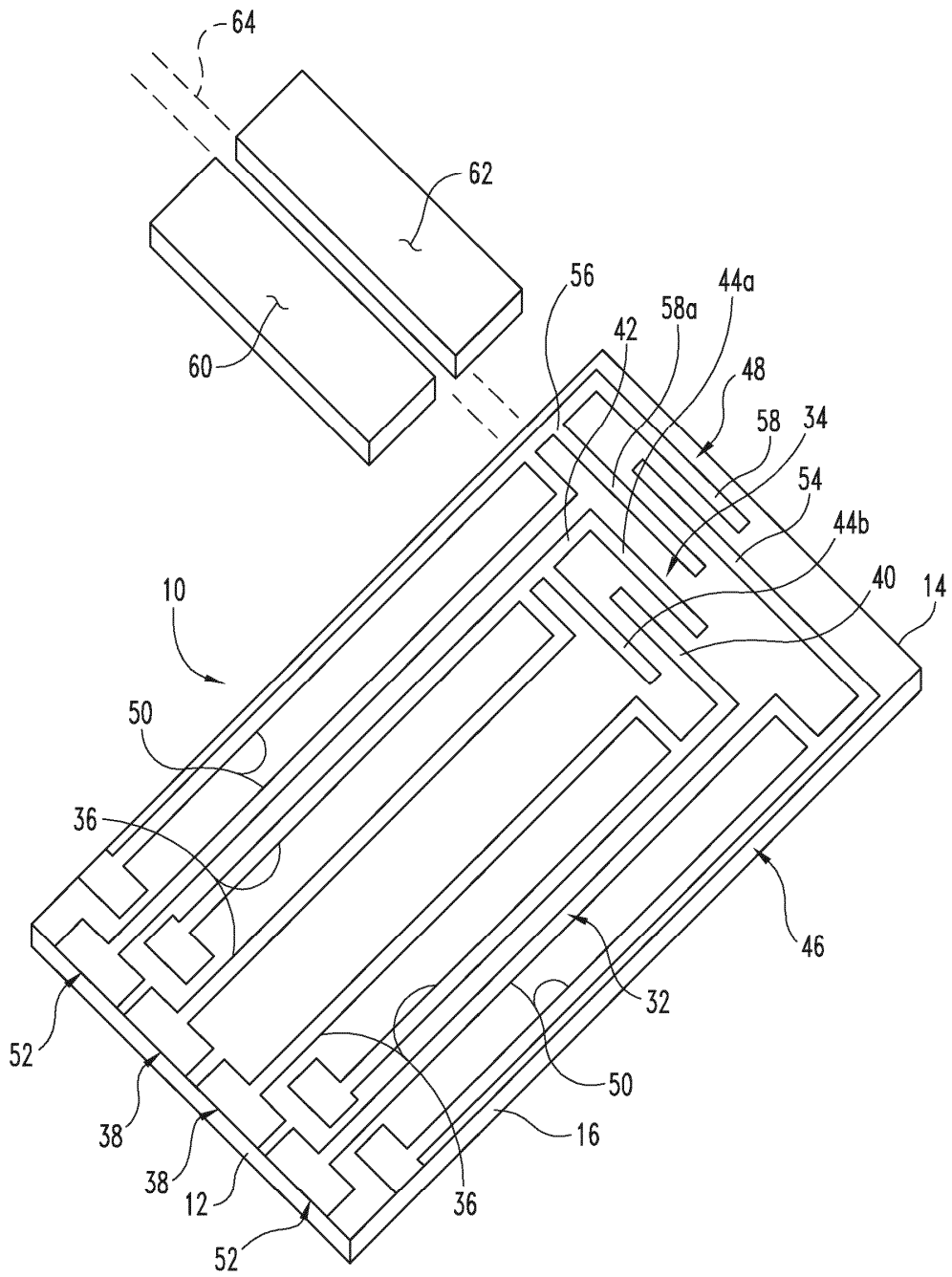


Fig. 2

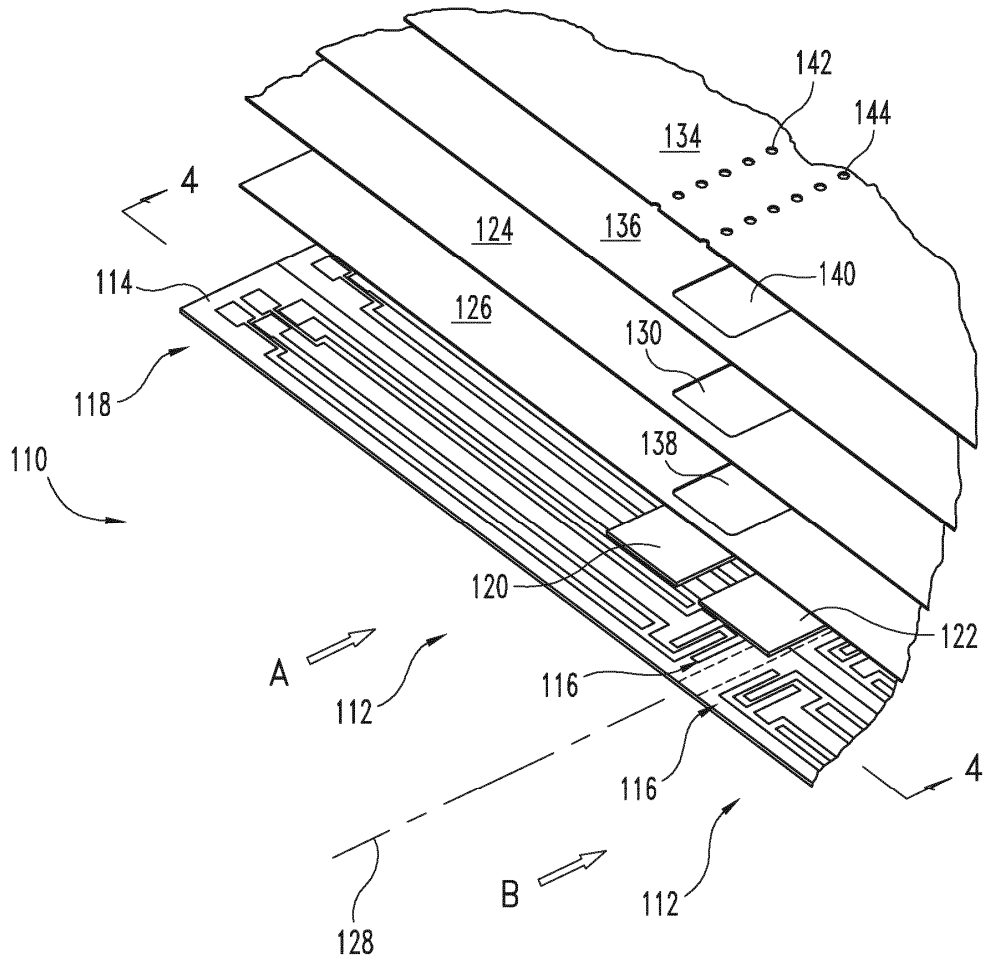


Fig. 3

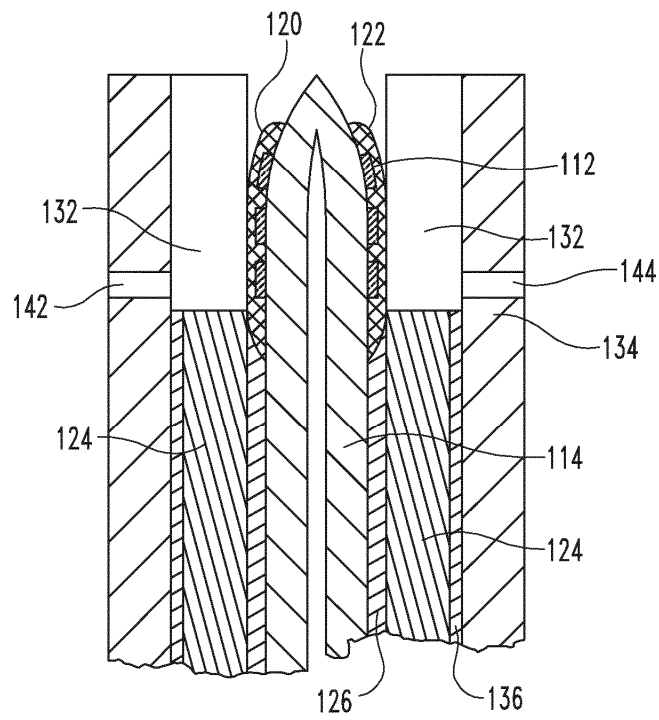


Fig. 4

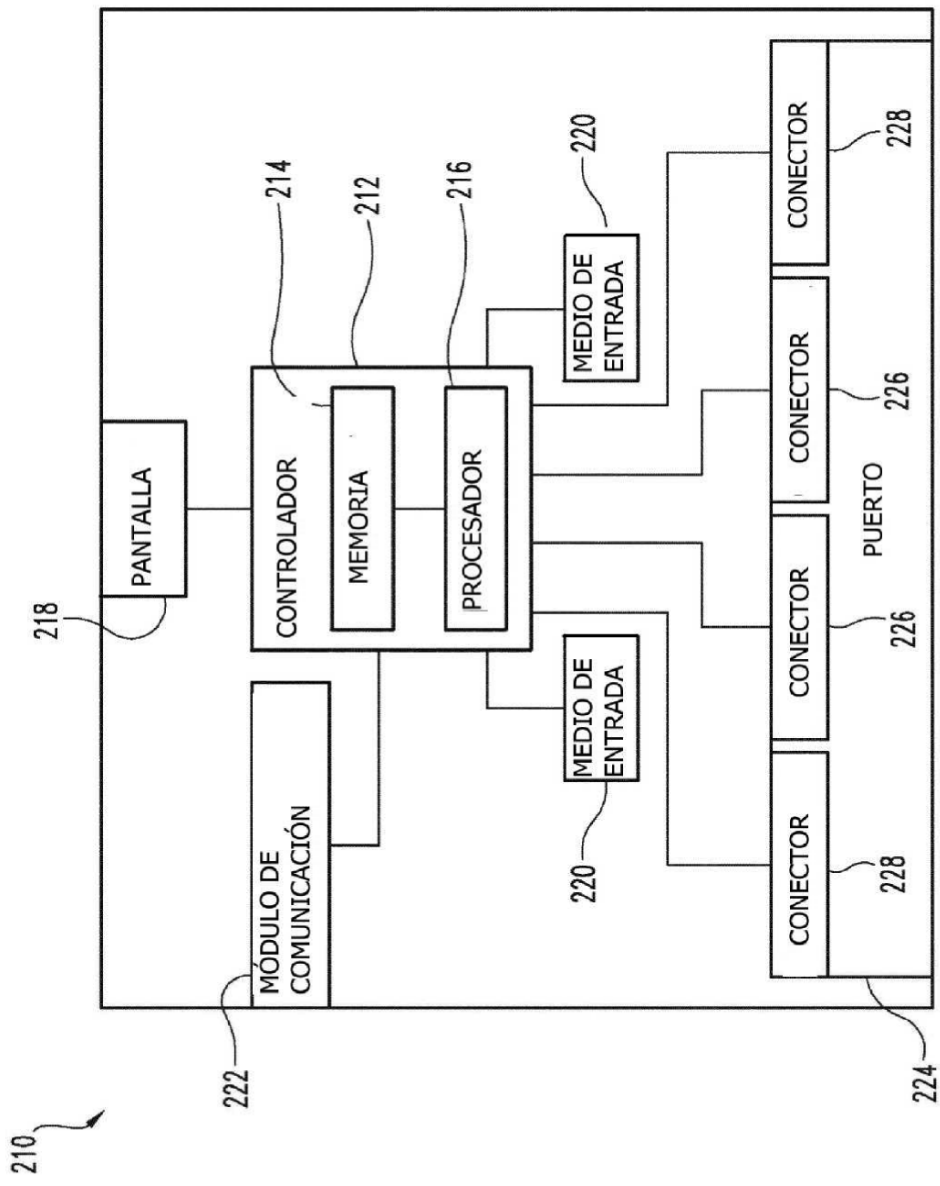


Fig. 5

Respuesta de Dosis de Hidroxibutirato
 Tampón Mops 150 nM/0,5 % de PEO/0,5 % de Natrosol®/120 u/ul de hidroxibutirato deshidrogenasa
 /30mM de NA1144/35 mM de cNAD
 pH 7,61
 Muestra - Fosfato 10 mM/KCl 150 mM/Hidroxibutirato

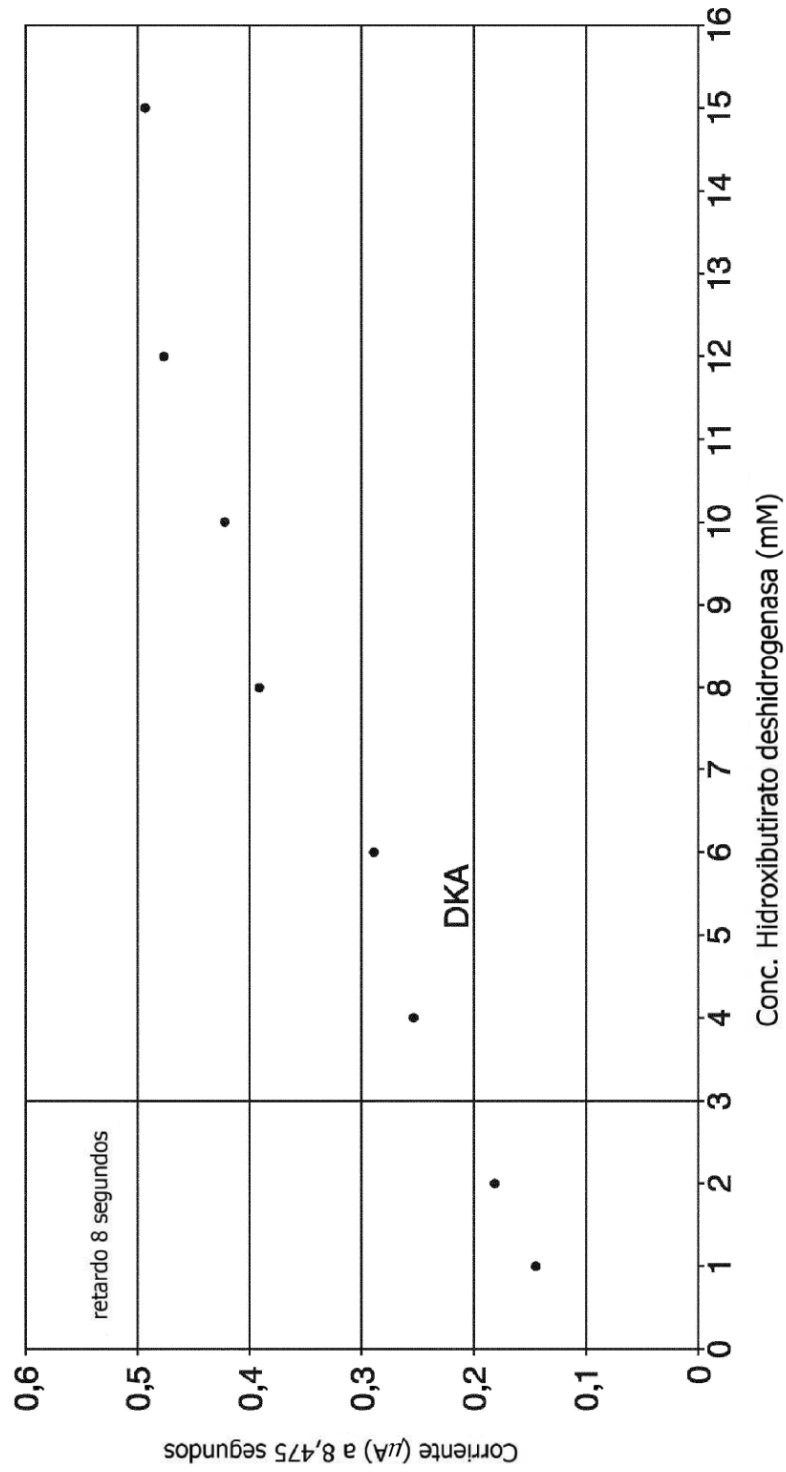


Fig. 6

Respuesta de Dosis Cinética
Tris 150 mM/0,5 % de PEO/0,5 % de Natrosol[®]/40 mM de cNAD/50 u/mg de HBDH/50 mM de RuHex/
/2mM de cPES/0,125 % de Tergitol[®] + Triton[™]X-100
Disoluciones de Ensayo - Disolución Salina/Hidroxitirato
Potencial - 220 mV

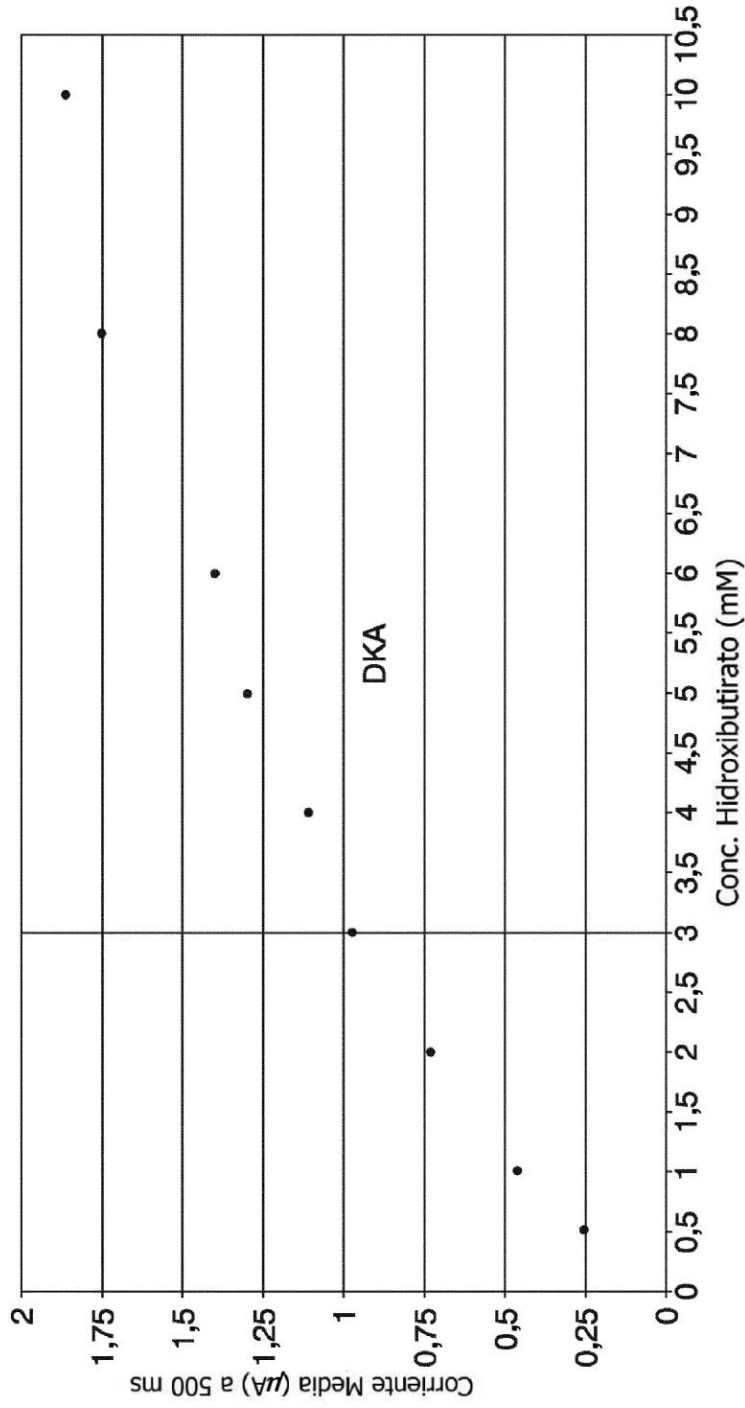


Fig. 7

Respuesta de Dosis En Sangre
 Tris 150 mM/0,5 % de PEO/0,5 % de Natrosol®/40 mM de cNAD/150 u/mg de HBDH/50 mM de RuHex/
 /2mM de cPES/0,125 % de Tergitol® + Triton™X-100
 Disoluciones de Ensayo - Sangre con adición (Hct 42)/Hidroxitirato
 Potencial - 220 mV

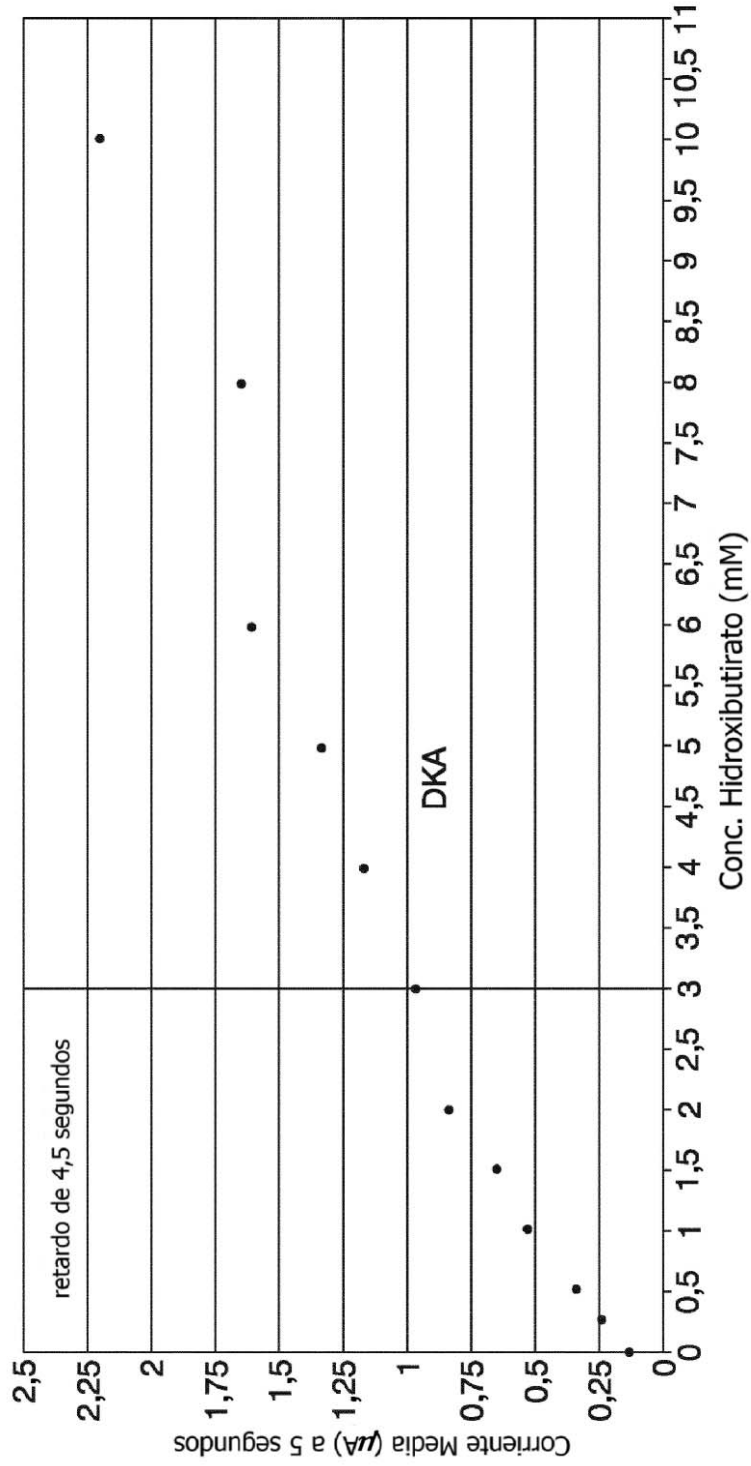


Fig. 8

Respuesta de Dosis Cinética
 Tris 150 mM/0,5 % de PEO/0,5 % de Natrosol®/40 mM de cNAD/150 u/mg de HBDH/50 mM de RuHex/
 /2mM de cPES/0,125 % de Tergitol®/0,025 % de Triton™X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxibutirato
 Potencial - 220 mV

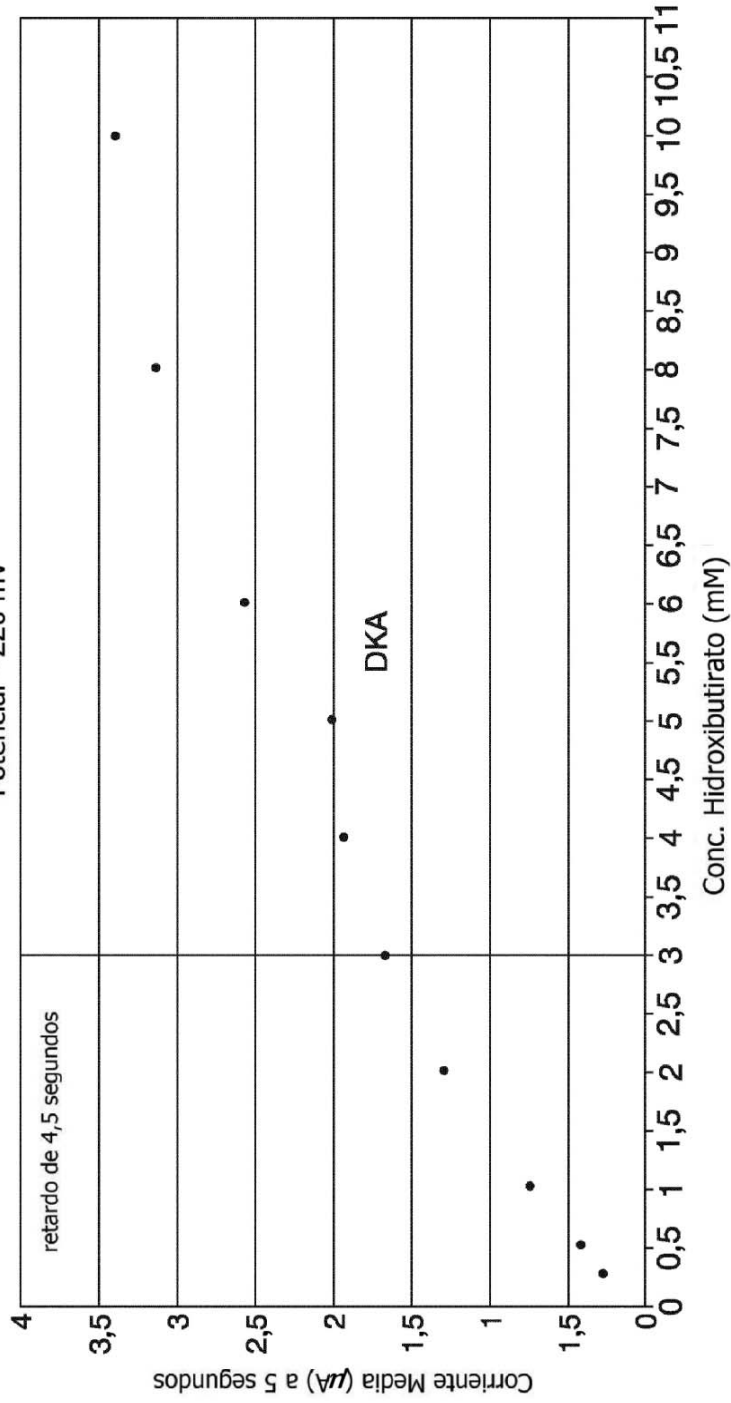


Fig. 9

Respuesta de Dosis de Hidroxibutirato
 2 % de Kollidon®/150 u/ul de Hidroxibutirato deshidrogenasa/50 mM de Rutenio hexamina/35 mM de cNAD/
 2 mM de CPES/1 % de Cabosil®/0,125 % de Tergitol®/0,025 % de Triton™X-100/150 mM de tampón Tris pH 7,61
 Muestra - Sangre (48 % de Hct)/Hidroxibutirato

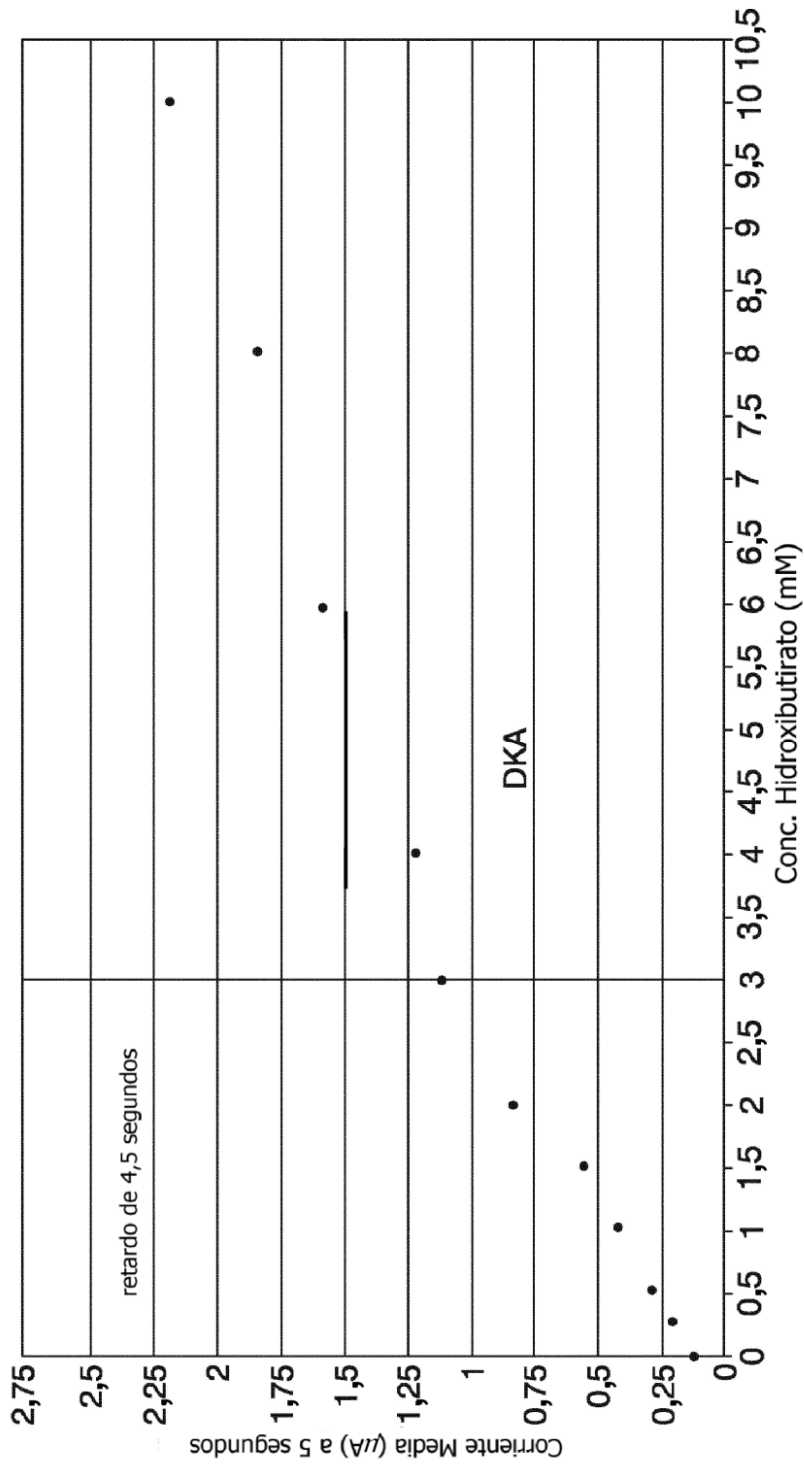


Fig. 10

Repuesta de Dosis
 Tris 150 mM/2 % de Kollidon[®]/40 mM de cNAD/150 u/mg de HBDH/2 mM de cPES/
 50 mM de Rutenio Hexamina/1 % de Cabosil[®]/0,125 % de Tergitol[®]/0,025 % de Triton[™]X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxibutirato
 Potencial - 220 mV

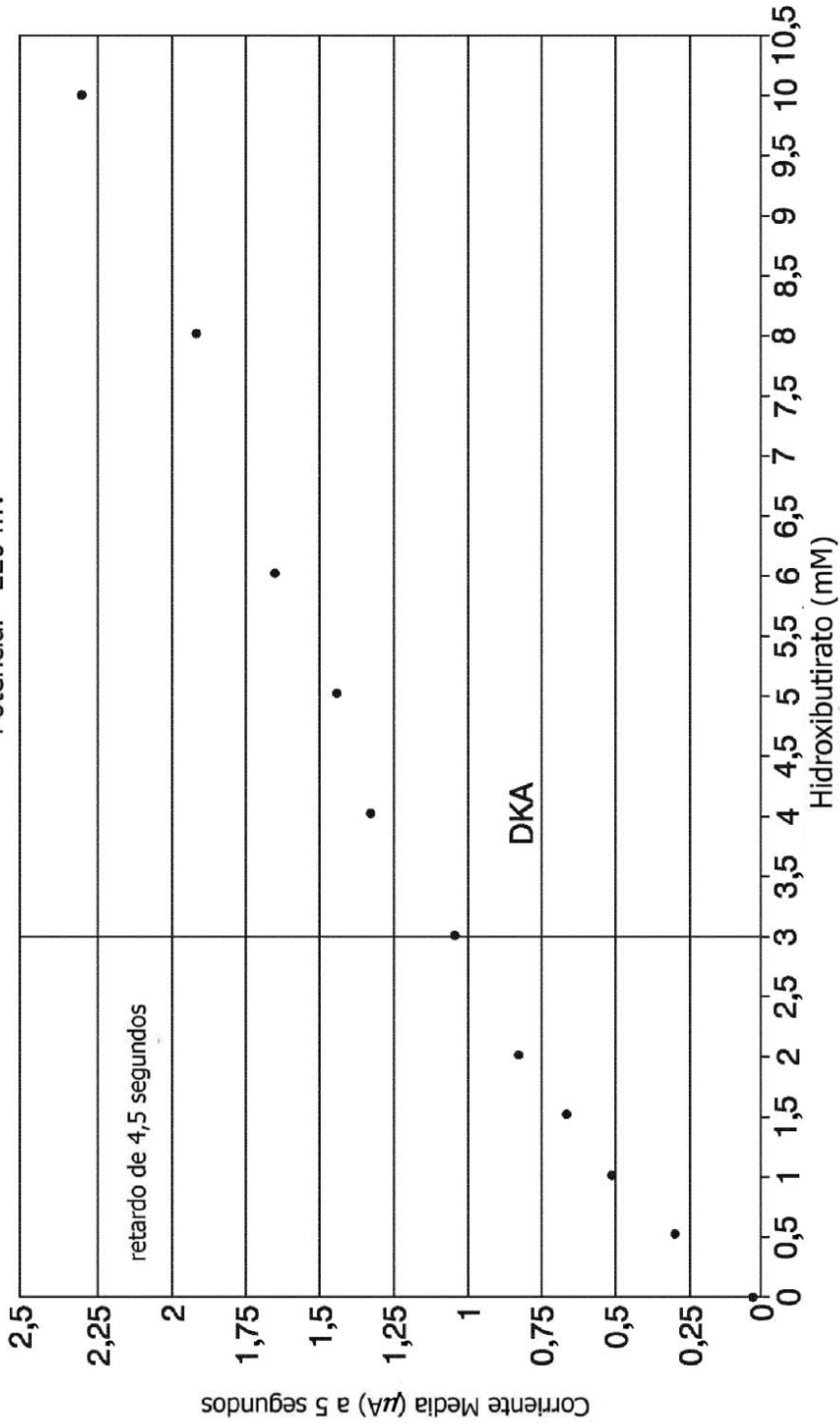


Fig. 11

Repuesta de Dosis
 Tris 150 mM/2 % de Kollidon®/40 mM de cNAD/150 u/mg de HBDH/30 mM de NA1144/
 1 % de Cabosil®/0,125 % de Tergitol®/0,025 % de Triton™ X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxitirato
 Potencial - 450 mV

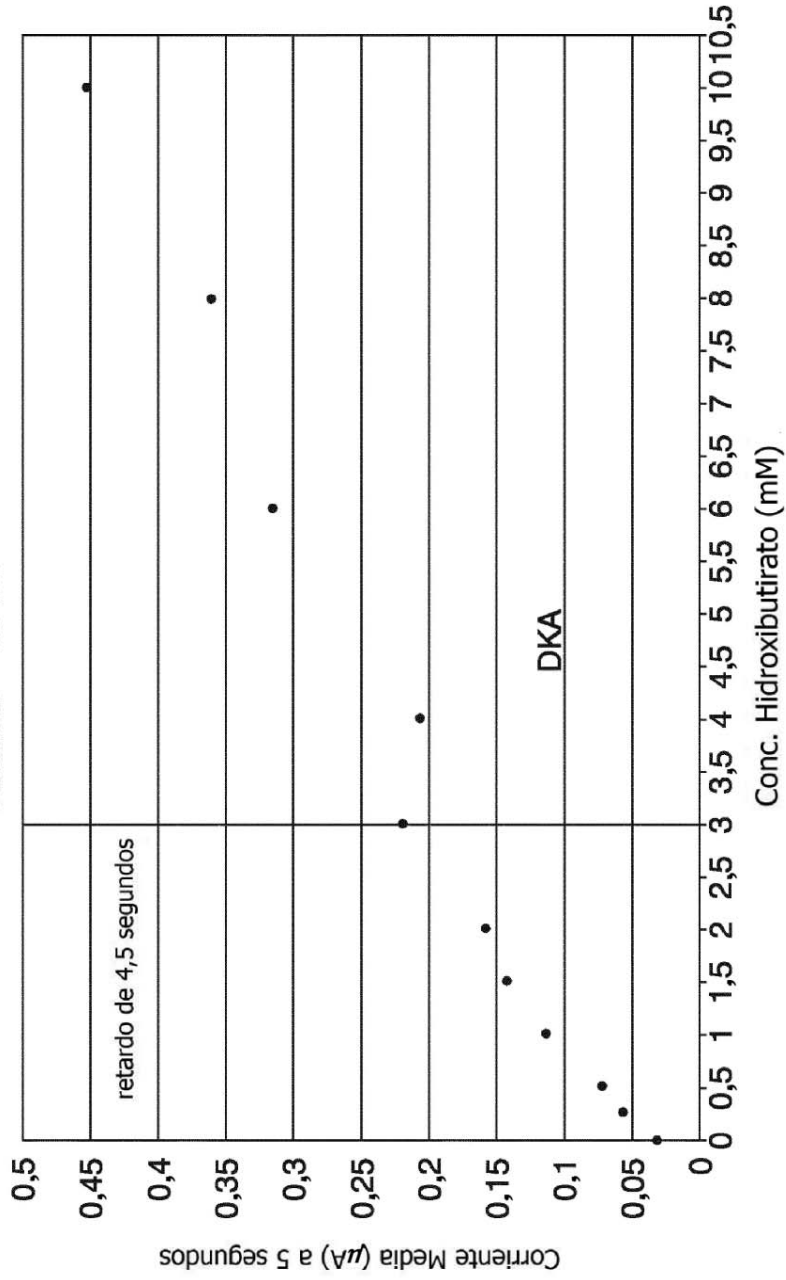


Fig. 12

Repuesta de Dosis
 Tris 150 mM/2 % de Kollidon[®] /35 mM de Tio-NAD/150 u/mg de HBDH/2 mM de cPES/
 50 mM de Rutenio Hexamina/1 % de Cabosil[®] /0,125 % de Tergitol[®] /0,025 % de Triton[™]X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxitirato
 Potencial - 220 mV

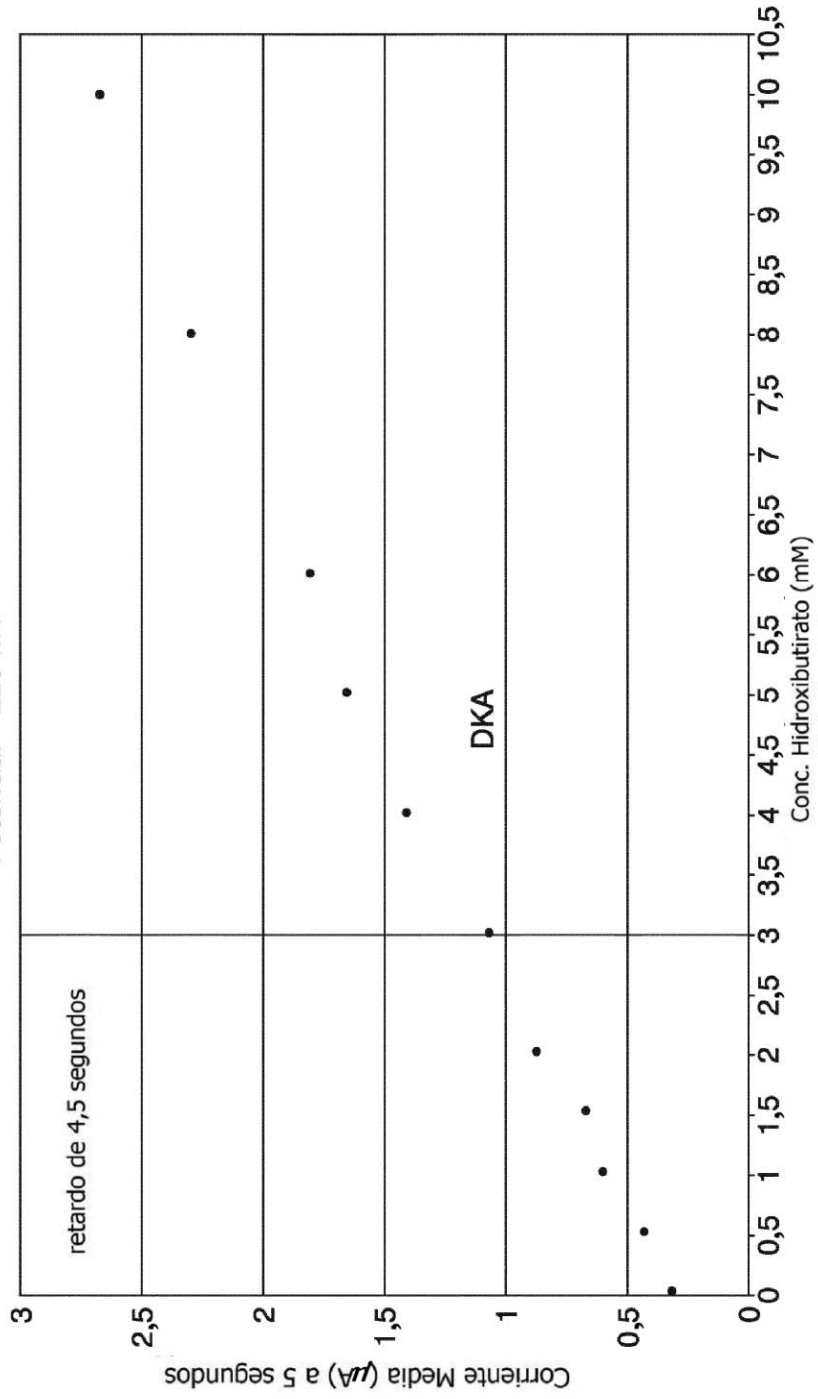


Fig. 13

Repuesta de Dosis
 Tris 150 mM/2 % de Kollidon[®]/35 mM de Tio-NAD/150 u/mg de HBDH/30 mM de NA1144
 1 % de Cabosil[®]/0,125 % de Tergitol[®] /0,025 % de Triton[™] X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxitubirato
 Potencial - 450 mV

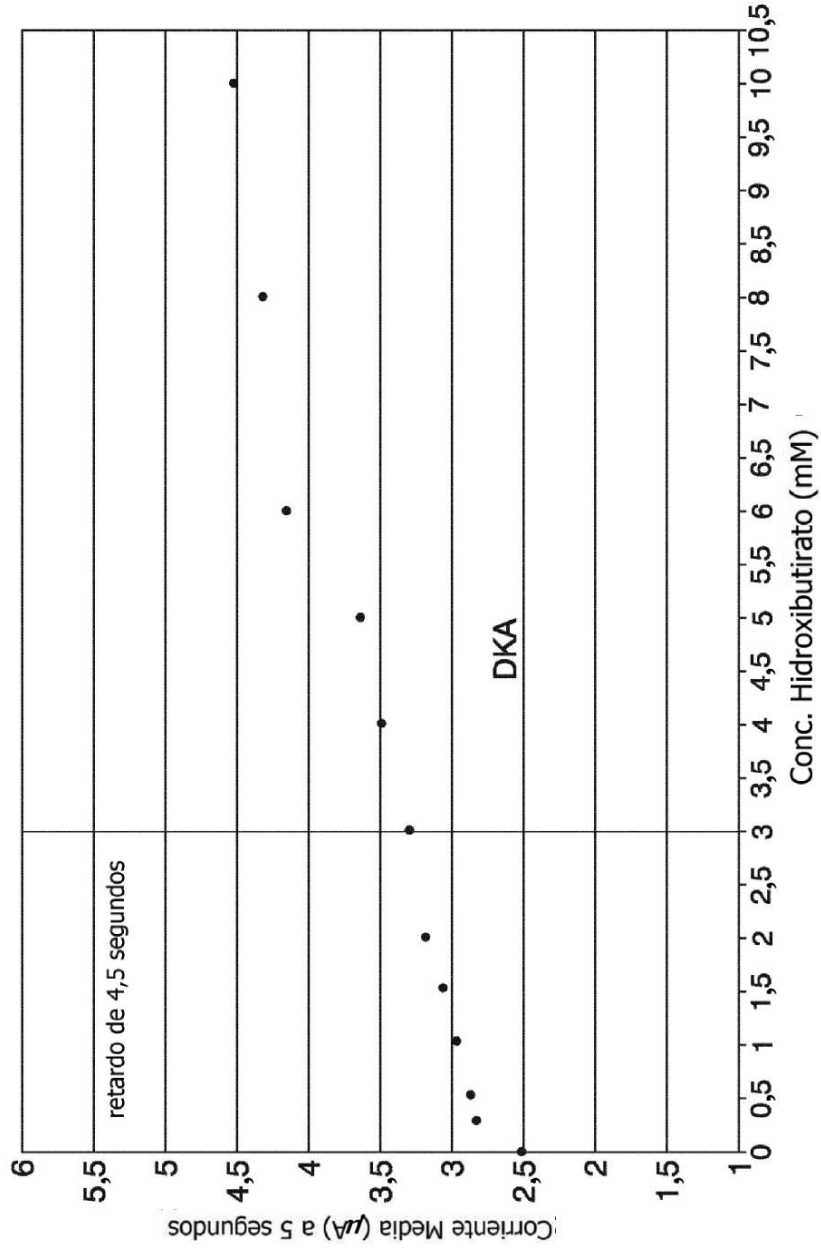


Fig. 14

Repuesta de Dosis
 Tris 150 mM/2 % de Kollidon®/35 mM de cNAD/150 u/mg de HBDH/2 mM de cPES/
 50 mM de Rutenio Hexaamina/1 % de Cabosil® /0,125 % de Tergitol® /0,025 % de Triton™X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxiacetato
 Potencial - 220 mV

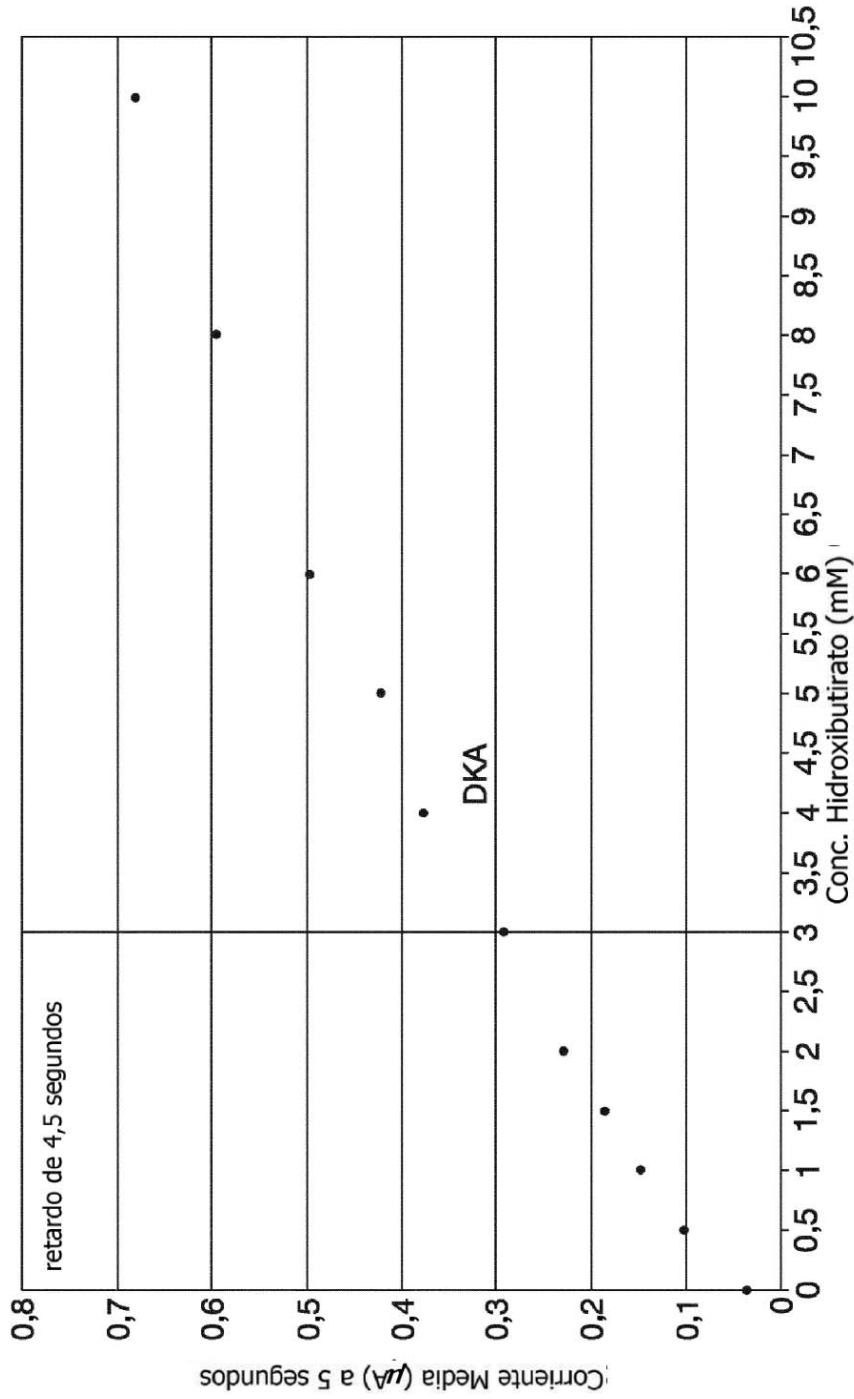


Fig. 15

Repuesta de Dosis
 Tris 150 mM/2 % de Kollidon[®]/35 mM de cNADP/150 u/mg de HBDH/30 mM de NA1144
 1 % de Cabosil[®]/0,125 % de Tergitol[®]/0,025 % de Triton[™] X-100
 Disoluciones de Ensayo - Disolución salina tamponada/Hidroxitirato
 Potencial - 450 mV

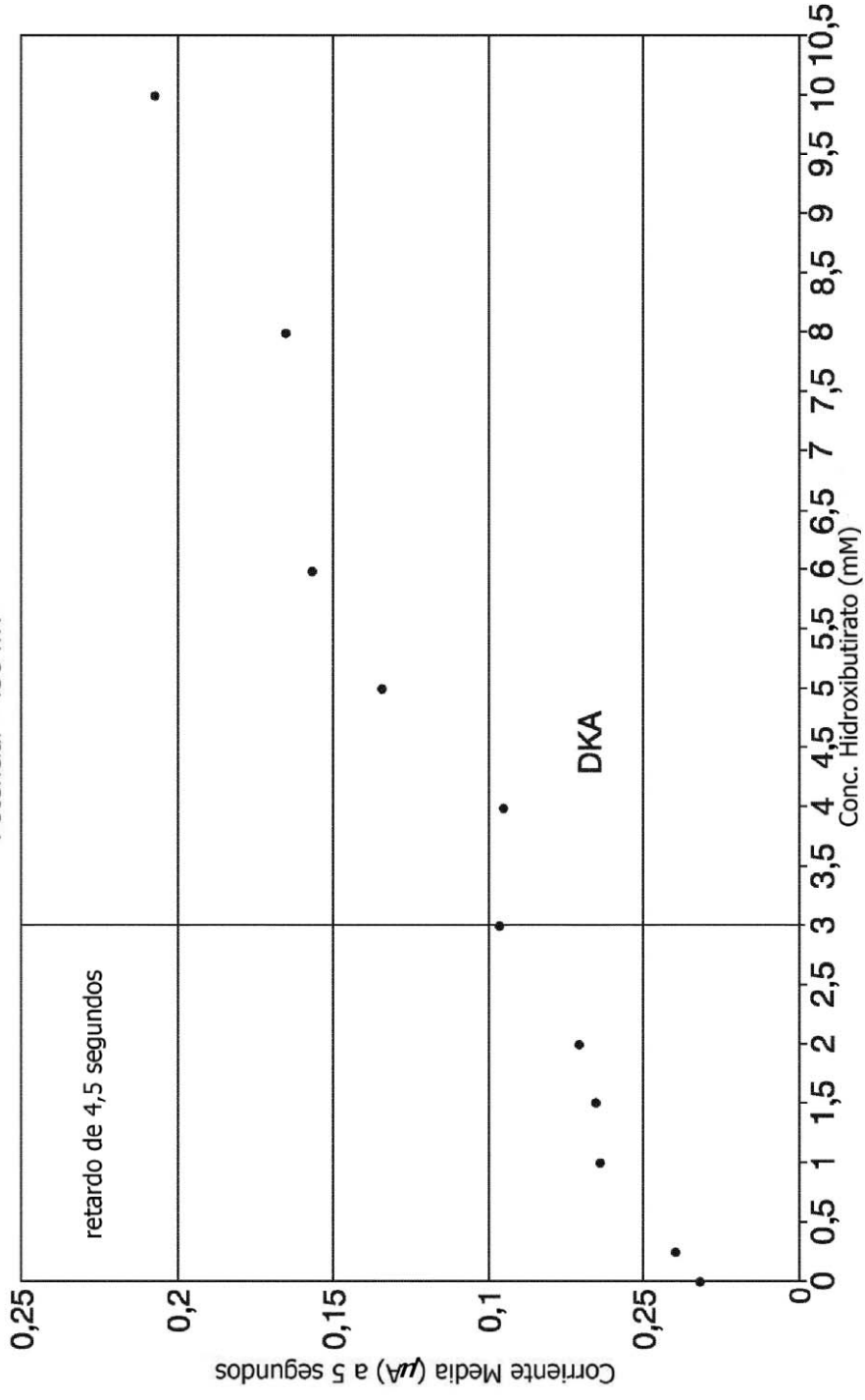


Fig. 16

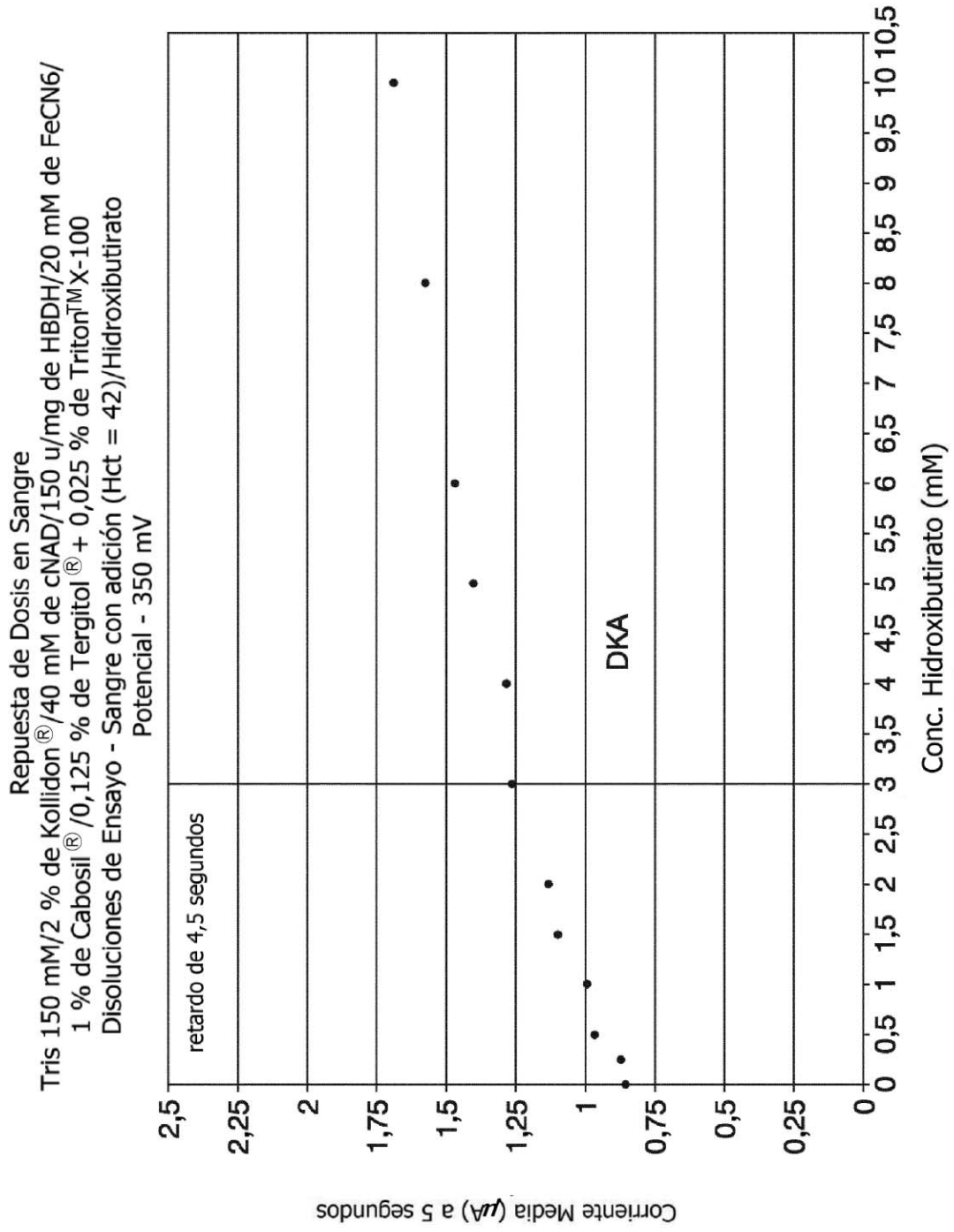


Fig. 17

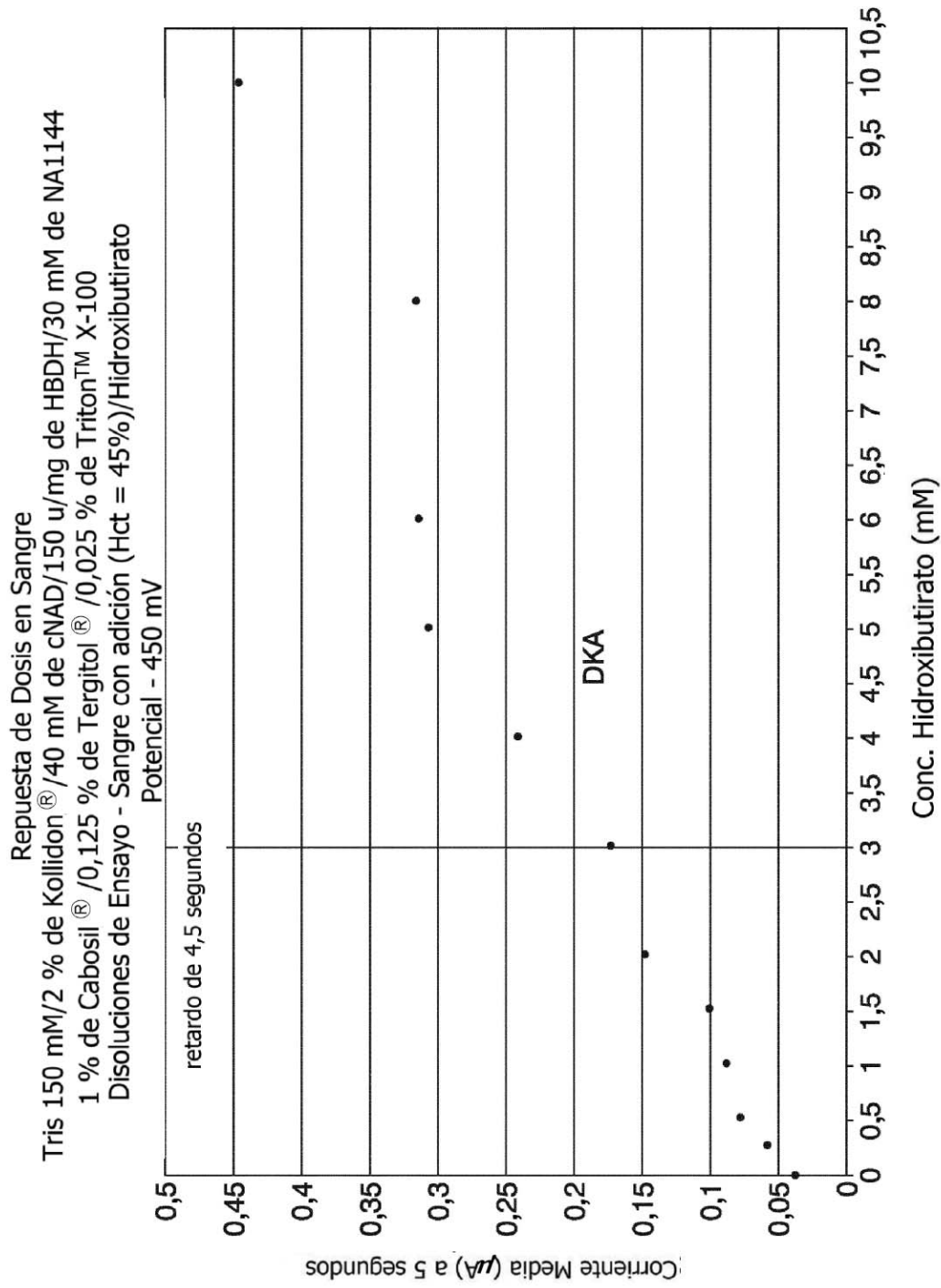


Fig. 18