

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA D STRIA Y COMERCIO



No. 07-097001- -00000-0000

Fecha: 2007-09-19 14:46:40 Dep 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Evt 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 52

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUDES DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

04/10/07

1

SOLICITUD DE:

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BAYER HEALTHCARE LLC

Dirección: 555 White Plains Road

Nacionalidad o domicilio: Tarrytown, Estado de
New York, E.U.A.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 74 60 Fax: 285 92 67

E-mail info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ X NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 79.397.879 de TP 68.995 del
Bogotá C.S.J.

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Amy H. CHU - Hope G. SPRADLIN

Dirección: 22460 Country Road - 10232 Ashley's Meadow Drive

Nacionalidad o Domicilio: Elkhart, Indiana - Granger, Indiana (E.U.A.)

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/007875

Fecha : 03/03/2006

Publicación Internacional No. WO 2006/096619 A2

Fecha: 14/09/2006

6

Título (54)

ESTABILIZACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS EN BIOSENSORES
ELECTROQUIMICOS

7

Clasificación Internacional (51)

G01N 33/487

8

Prioridad

Si

☒ X

No

☐

(33) País de origen

E.U.A.

(32) Fecha

04.03.2005

(31) Número de Solicitud

60/658,634

9

Comprobante de pago N°:

75376

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

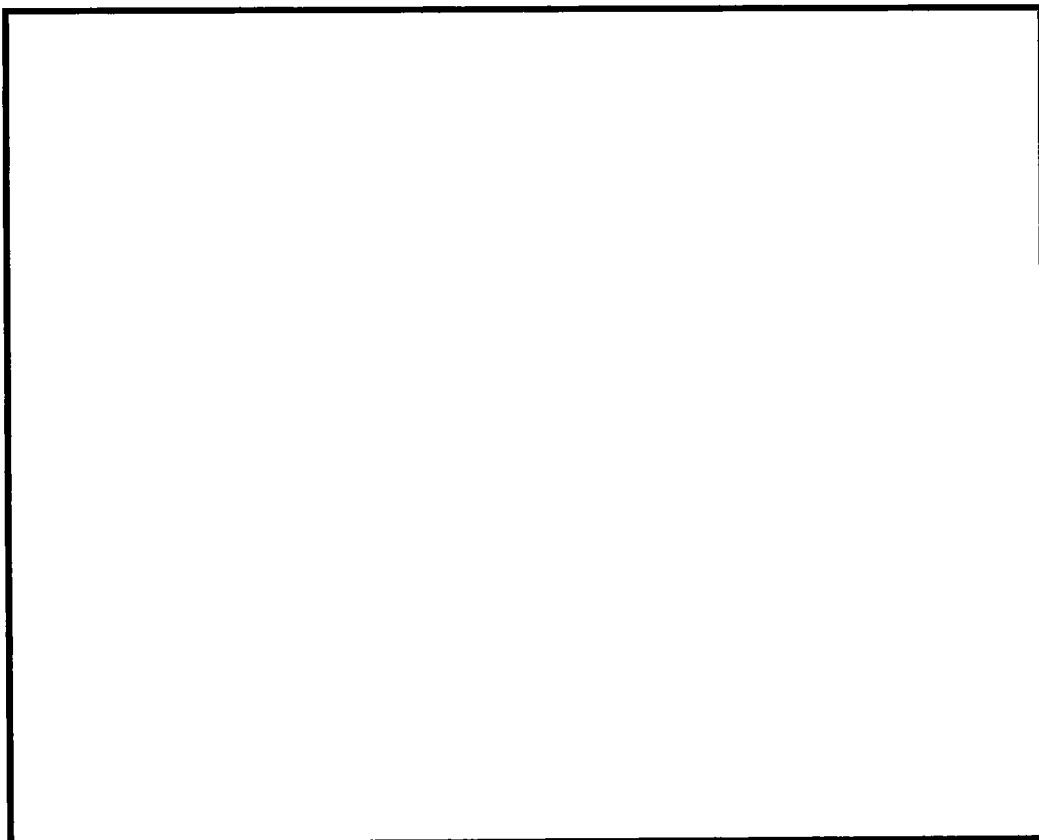
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

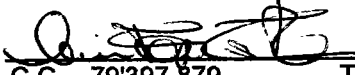
11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONEFIRMA: C.C. 79'397 879
de BogotáT.P. 68.995
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

AB

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 75,326
FECHA : SEPTIEMBRE 18 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-097001- -00000-0000
Fecha: 2007-09-19 14:46.40 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tr: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 52

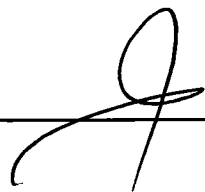
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	69421664	18/09/2007	4,586,400.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Castillo Grau & Associates

Law Offices

P.O. Box 251473

Bogotá, Colombia

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN

COLOMBIA

PODER

(1) BAYER HEALTHCARE LLC

domiciliado en (2) Tarrytown, New York
Estados Unidos de América

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana
Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12
en Santafé de Bogotá, D.C., Colombia como sus
representantes con poder especial amplio y
suficiente, para recabar de las oficinas y
autoridades Colombianas, administrativas,
judiciales o de policía, en primera o segunda
instancia, la Obtención de Patentes de
Invención, Registro de Marcas, de Diseños
Industriales, de Nombres y Enseñas
Comerciales, de Registros Sanitarios, Nombres
de Dominio, lo mismo que traspasos,
extensiones, renovaciones, cambios de nombre
y domicilio, registro de licencias de explotación y
registro de licencias de uso referentes a tales
actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar
ante dichas autoridades todos los pasos
necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar
la aplicación de medidas cautelares, aceptar en
nuestro nombre y representación la Cesión de
derechos de invención y de patente de invención
que se nos haga por cualquier persona, abonar
todos los impuestos cuotas y pagos
determinados por la ley, recibir todos los
documentos y valores dando el descargo
respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos,
desistir, y tomar en fin todas las medidas que
creyeren conducentes al resguardo de nuestros
intereses y en caso de presentarse oposiciones
para que intervengan como demandantes o
como demandados, con todas las demás
facultades legales necesarias. Este poder
comprende además las facultades de recibir,
desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar
sustituciones, recibir notificaciones y nombrar
apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)
Elkhart, Indiana Estados Unidos de América
el día 29 de Agosto, 2006

Firma/Signature

Richard L. Stadterman
Richard L. Stadterman, Vice President Global Research and Development

Corporate Seal to be Affixed

POWER OF ATTORNEY

(1) BAYER HEALTHCARE LLC

domiciled in (2) Tarrytown, NY
United States of America

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or
Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe
Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in
Bogotá, Colombia as our representatives with
special ample and sufficient power to obtain from
the offices and Colombian authorities,
administrative, judicial and police, in first or in
second instance, Patents of Invention,
registration of Trade or Service Marks, Industrial
Designs, of Commercial Names and Ensigns,
Health and Sanitary Registrations, Domain
Names, as well as assignments, extensions,
renewals, changes of names and addresses,
registration of licenses of exploitation and
licenses of use referring to said actions who are
empowered to take before said authorities all of
the necessary steps for the purposes indicated,
to file applications, to formulate descriptions,
corrections, protests, declarations, appeals and
claims, apply for precautionary measures, to
accept on our behalf and representation the
assignment of rights on invention and titles of
invention that may be done to us by any person,
to pay all taxes, quotas and payments
prescribed by law, to receive all the documents
and proceeds giving the respective acquittance
or receipt, to fulfill any other requisites to desist
and take in fact any other measures that may be
deemed conducive to the safeguard of our
interests, and in case oppositions are presented
to intervene as plaintiff or defendant, with all
necessary legal faculties. This power includes
the faculties to receive, desist, compromise,
transact, substitute it in all or in part, to revoke
substitutions, to receive notifications and to
appoint judicial or extra-judicial attorneys.

Given and signed in (4) Elkhart, Indiana
United States of America this 29th day of
August, 2006

Como Notario Veintiseis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.

12 SET 2007

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



Todd Rokita
Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Elizabeth A. Gettins*
3. acting in the capacity of notary public in & *Elkhart County*
for
4. and bears the seal/stamp of notary public in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Eleventh* day of *September, 2006*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2006 - 14090
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Todd Rokita

Todd Rokita
Indiana Secretary of State

Como Notario Veintiséis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.

12 SET 2007

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

DECLARACION NOTARIAL
(Individual)

A los días del mes de de.....
compareci... personalmente ante mí, Notario
Público.....

A quien(es) doy fé de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s)
del documento que precede, declarando ante mí
que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

El Notario Público

.....
(Sociedades)

A los 29 días del mes de Agosto de 2006
El infrascrito Notario certifica: que la firma que

antecede y dice

Richard L. Stadterman

.....
es auténtica; que el signatario desempeña el

cargo de

Vice Presidente Global de Investigación y Desa-
rrollo

de BAYER HEALTHCARE LLC

que tiene facultad para otorgar este poder; y que

dicha compañía está domiciliada en

Tarrytown, New York EUA

y actualmente existe y está organizada de

acuerdo a las leyes de

el Estado de Delaware, E.U.A.

Todos los hechos anteriores le constan por

haber examinado los documentos respectivos y

de todo ello da fe..

Dado y firmado en Elkhart, en EUA
.....

El Notario Público

(Con Apostilla)

NOTARIAL CERTIFICATE
(Individuals)

On this.....day of.....of.....
personally appeared before me, a Notary Public,
.....

to me known, and known to me be the person(s)
described in and who executed the foregoing
document, and he(they) duly acknowledged to
me that he(they) executed same for the uses
and purposes therein expressed.

Notary Public

.....
(Corporations)

On this 29 day of August of....., 2006
The undersigned Notary Public certifies: that

The preceding signature reading

Richard L. Stadterman...

is authentic; that the signor at present fills the
post of Vice President Global Research and
Development

of **BAYER HEALTHCARE LLC**

and that he/she is empowered to grant this
power; and that said company is domiciled in
Tarrytown, New York USA and actually exists
and is organized in the United States of America
accordance with the laws of the State of
Delaware, U.S.A.

All the foregoing facts are known to the Notary
due to his/her having examined the respective
documents to which he/she, the Notary, attests.

Granted and signed in..Elkhart, IN USA
.....

By Elizabeth A. Gettins

Elizabeth A. Gettins, Notary Public

Residing in Elkhart County, Indiana, USA

(seal) My Commission Expires July 20, 201

Notary Public

(With Apostilla)

Como Notario Veintiséis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que es ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.

12 SET 2007

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

7
X

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



Todd Rokita
Secretary of State

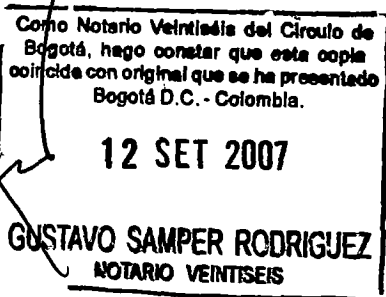
APOSTILLE

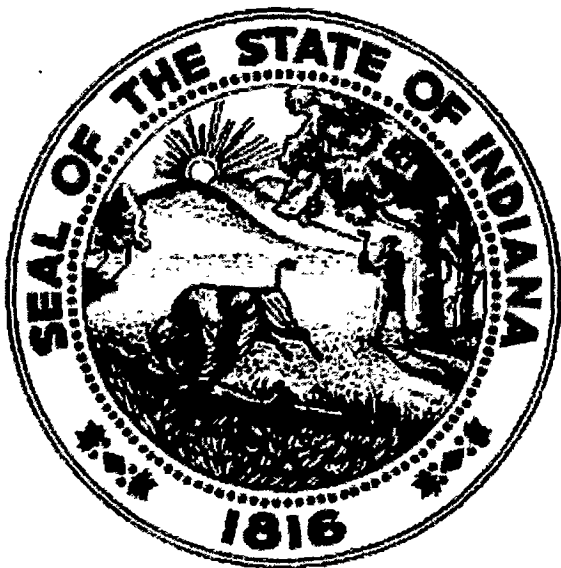
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Karen F. Singleton*
3. acting in the capacity of notary public in & for *St. Joseph County*
4. and bears the seal/stamp of notary public in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Second* day of *August*, 2007
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2007 - 010225
9. Seal/Stamp:

10. Signature:  





Todd Rokita
Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

INVENTION ASSIGNMENT

The undersigned Amy H. Chu and Hope G. Spradlin

domiciled in Elkhart, Indiana USA and Granger, Indiana USA respectively

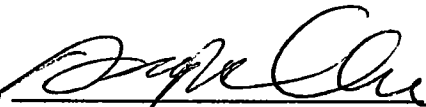
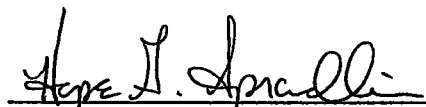
hereby appoint(s) Dr. GERMAN CASTILLO GRAU, and/or Dr. ADRIANA CASTILLO GIBSON and/or Dr. LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON, domiciled in Bogotá, Colombia, with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in Bogotá, as attorney with ample and sufficient power, including that of receiving notifications and appointing judicial and extra-judicial attorneys, to apply for and obtain from the Colombian offices and authorities the Patent of Invention for

Stabilizing Enzyme Activity in Electrochemical Biosensors

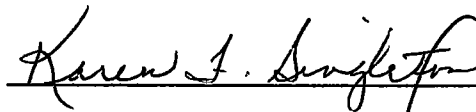
to be issued in the name of BAYER HEALTHCARE LLC

domiciled in Tarrytown, New York, United States of America to whom assignment has been made of all rights and titles on said invention/creation for the territory of Colombia, without any restriction whatsoever.

Given and signed in Mishawaka, Indiana USA

Inventor(s)  
Amy H. Chu Hope G. Spradlin

BEFORE ME, a Notary Public of the State of Indiana USA this 24th day of July, 2007.



MSE-2728

KAREN F. SINGLETON
Notary Public, State of Indiana
County of St. Joseph
My Commission Expires Sep. 26, 2012

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. - Colombia.

12 SET 2007

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

**ESTABILIZACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS EN BIOSENSORES
ELECTROQUÍMICOS**

CAMPO DE LA INVENCION

5

Esta invención se dirige generalmente al campo de dispositivos médicos que se usan para analizar fluidos biológicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Más específicamente, esta invención se refiere a los biosensores que se usan para medir la cantidad de analitos en fluidos corporales, particularmente al medir glucosa en muestras de sangre entera. Se usan a menudo métodos ópticos para hacer tales mediciones, pero la presente invención se refiere a mejoras en biosensores electroquímicos.

15

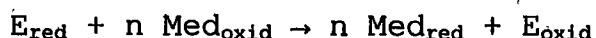
Aunque los métodos de la invención a describirse en la presente se pueden aplicar para medir otros analitos, medir la glucosa en muestras de sangre entera es de interés particular. La invención también se refiere a un instrumento electroquímico en el cual un potencial constante o variable se aplica a electrodos en contacto con una muestra de sangre y la corriente resultante se mide después de un periodo corto de tiempo. La corriente eléctrica medida se correlaciona con la cantidad del analito en la muestra. Tales instrumentos se refieren como amperométricos.

20

25

Los biosensores de glucosa usados en instrumentos amperométricos pueden emplear diversos sistemas de reactivos que reaccionan enzimas con la glucosa en la muestra y produce una corriente eléctrica que se mide por la oxidación de un

compuesto de óxido reducción, referido como un mediador en la siguiente secuencia general de etapas:



Donde E_{oxid} y E_{red} son formas oxidadas y reducidas del centro de óxido reducción de la enzima y Med_{oxid} y Med_{red} son las formas oxidadas y reducidas del mediador. La glucosa oxidasa se ha usado como la enzima en biosensores electroquímicos, pero más recientemente, se ha introducido la glucosa deshidrogenasa. Estas enzimas se usan con una co-enzima o co-factor, tales como NAD, FAD, y PQQ. El mediador puede ser una sal de ferrocianuro o una sal de tetrazolio, entre otras familiares para aquellos expertos en la técnica.

La glucosa deshidrogenasa (GDH), su co-factor, y el mediador se combinan en una formulación que se aplica a un pare de electrodos, descritos como el electrodo de trabajo y contra electrodo. Cuando se aplica un potencial a través de los electrodos, la enzima/co-factor oxida la glucosa (el analito) y el mediador se reduce cuando vuelve a oxidar la enzima. El mediador reducido migra al electrodo de trabajo en donde se vuelve a oxidar, y en el proceso libera electrones que se mueven al contra electrodo y establece una corriente eléctrica que es proporcional a la cantidad de la glucosa presente en la muestra.

Ya que se usa un nuevo sensor cada vez que el paciente prueba la cantidad de glucosa en su sangre, las formulaciones de reactivos deben proporcionar un desempeño consistente de un biosensor al siguiente. Claramente, es importante que sean confiables los resultados, debido a que los usuarios

ajustarán su dieta o medicamento en respuesta a los resultados de sus pruebas. Por lo tanto, entre otros requerimientos, la enzima debe mantener su actividad a través de su vida útil de anaquel. La presente invención se refiere en particular a limitar o prevenir la pérdida de actividad de un sistema de una enzima/co-factor [esto es, glucosa deshidrogenasa - pirrolo-quinolina quinona (GDH-PQQ)] usado en biosensores electroquímicos.

Un método para mantener la actividad de GDH-PQQ se sugiere en la patente de E.U.A. No. 6,656,702, la cual enseña la adición de azúcares a las formulaciones de reactivos, particularmente trehalosa con GDH-PQQ. En un ejemplo un polímero hidrofílico, carboximetil celulosa, se deposita sobre los electrodos y se seca. Luego, la mezcla de reactivos, incluyendo GDH-PQQ, trehalosa, y ferrocianuro de potasio como el aceptador de electrones (mediador), se depositó al "gotear" sobre la capa seca de carboximetil celulosa y luego se secó para completar la capa de reactivos sobre los electrodos. La patente también sugiere que un polímero hidrofílico puede agregarse también a la capa que contiene los reactivos. Se cree que la patente '702 al referirse al "goteo" de las capas de reactivos significa que se depositaron al depositar gotas de reactivos en un pozo que rodea a los electrodos expuestos.

Otra patente (patente de E.U.A. No. 6,270,637) describe una formulación para biosensores electroquímicos que incluye GDH-PQQ y también incluye hidroxietil celulosa. La patente resalta el valor de incluir óxido de polietileno que tenga un peso molecular de 100 a 900 kilodaltones (kDa). El método de aplicación de su formulación sobre los electrodos no se

22

proporciona en detalle, pero se cree que se hace por el reactivo de dosificación con un sistema de bomba.

La impresión en pantalla de capas de reactivos se usó en las composiciones y biosensores descritos en la patente de E.U.A. Nos. 5,708,247; 5,951,836; y 6,241,862. Glucosa oxidasa se usó como la enzima y las composiciones de reactivos también incluyeron hidroxietil celulosa y una sílice tratada que se seleccionó para tener un balance de hidrofobicidad e hidrofiliicidad, para formar redes bidimensionales que excluyen los glóbulos rojos.

Las formulaciones de reactivos se pueden depositar por diversos métodos, incluyendo impregnación, recubrimiento de tiras, impresión por chorro de tinta, o micro-deposición con una bomba de jeringa que puede incluir la adición de un dispositivo de expulsión de gotas con válvula micro-solenoides. La impresión en pantalla es un método de interés particular ya que es eficiente y bien adaptado para la producción a gran escala de biosensores. Requiere que la formulación (esto es, la tinta) que se aplica a los electrodos tenga ciertas propiedades físicas para aplicarse exitosamente. En particular, las tintas aplicadas por impresión en pantalla deben tener las siguientes propiedades: adhesión al sustrato, cohesión, tixotropía (adelgazamiento al corte) y reología optimizada para viscosidad y flujo.

Los inventores actuales encontraron que una composición, la cual se usó para impresión en pantalla cuando la glucosa oxidasa fue la enzima, no se pudo usar cuando la enzima se cambió a GDH-PQQ, debido a que la nueva enzima perdía actividad rápidamente. Después de investigación, se determinó que determinados componentes usados para proporcionar las

13
Xh

propiedades físicas necesarias para impresión en pantalla provocaron la pérdida de actividad de la enzima. Consecuentemente, fue necesario descubrir componentes que no provocaran una desactivación prematura del GDH-PQQ, pero que
5 también reunieran los requerimientos para impresión en pantalla. Esas formulaciones de reactivos se describen a continuación.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La invención en un aspecto es una composición de
10 reactivos para aplicación a los electrodos en biosensores electroquímicos. La nueva composición se puede imprimir en pantalla y evitar la pérdida prematura de actividad del sistema de enzima-co-factor (GDH-PQQ) usado para oxidar la glucosa en un biosensor de glucosa. En una modalidad
15 preferida, el GDH-PQQ se combina con un polímero hidrofílico, preferiblemente hidroxietil celulosa, y polvo de sílice amorfa hidrofílico en una solución amortiguadora manteniendo un pH entre 4.5 y 6.5, un tensoactivo, y un mediador, preferiblemente ferrocianuro.

20 En una modalidad, la invención es un biosensor electroquímico en el cual la composición de reacción antes descrita se imprime en pantalla sobre el electrodo de trabajo y contra electrodo.

En otro aspecto, la invención es un método para mantener
25 la actividad de GDH-PQQ en una composición de reactivos impresa en pantalla.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La FIG. 1a y 1b es una vista detallada de un sensor electroquímico típico.

14
X

La FIG. 2 es una gráfica de corriente de respaldo de reactivos contra diferentes soluciones amortiguadoras.

La FIG. 3 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la actividad de enzimas de determinados componentes en formulaciones de reactivos.

La FIG. 4 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la actividad de enzimas de formulaciones de reactivos de la invención.

La FIG. 5 es una gráfica de glucosa medida contra un método estándar.

La FIG. 6 es una gráfica de la desviación en mediciones de FIG. 5.

DESCRIPCION DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

Medición del contenido de glucosa de la sangre

La glucosa contenida en sangre se puede medir por diversos métodos. De interés particular son los métodos que se usan por los pacientes diabéticos en casa. Estos incluyen métodos ópticos y electroquímicos, ambos de los cuales pueden funcionar al oxidar la glucosa con una enzima. La cantidad de glucosa presente se determina al medir el color desarrollado por un indicador o la corriente eléctrica producida por la oxidación de un mediador de óxido-reducción cuando se aplica un potencial a través de un par de electrodos. La presente invención se refiere al último método de medición del contenido de glucosa de sangre entera, en particular a los biosensores electroquímicos que emplean glucosa deshidrogenasa (GDH) y el co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ). El GDH-PQQ se combina con otros componentes, incluyendo mediadores, polímeros, tensoactivos, soluciones amortiguadoras y espesantes, para producir una composición

que se deposita en un par de electrodos. Cuando se aplica un potencial a través de los electrodos, la reacción del GDH-PQQ con glucosa y las reacciones de óxido-reducción del mediador producen una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra de sangre que está en contacto con la composición reactiva.

La presente invención no se limita a un diseño particular de biosensor entre los muchos que se han descrito en la técnica. Un ejemplo de biosensores los cuales se pueden usar se describe en la patente de E.U.A. No. 6,531,040, la cual se ilustra en FIG. 1a-b.

El biosensor 10 se muestra en una vista detallada en la FIG. 1. Comprende una base aislante 12 sobre la cual se imprime en secuencia (típicamente por técnicas de impresión en pantalla), un patrón conductor eléctrico 14, un patrón de electrodo (porciones 16 y 18), un patrón aislante (dieléctrico) 20, y una capa de reacción 22. El biosensor se completa al agregar una capa de cubierta 28. El capilar 30 formado entre la capa de cubierta 28 y la capa de reactivos 22, proporciona una trayectoria de flujo para la muestra de prueba de fluido.

Los reactivos en capa de reacción 22 reaccionan con los analitos en la muestra de prueba de fluido (por ejemplo, glucosa en sangre) y producen una corriente eléctrica la cual se mide y se correlaciona con la cantidad del analito presente. La capa de reacción 22 típicamente contiene una enzima o enzimas, y un aceptador de electrones. La enzima reacciona con el analito para producir electrones, los cuales se transportan a la superficie del electrodo de trabajo por un aceptador de electrones o mediador, el cual se reduce en

16

respuesta a la reacción entre el analito y la enzima. En la presente invención la enzima es glucosa deshidrogenasa (GDH) y su co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) y el mediador es una sal de ferrocianuro.

5 Las dos porciones 16, 18 del patrón del electrodo proporcionan el respectivo electrodo de trabajo y contra electrodo necesarios para determinar electroquímicamente la concentración del analito. Un aspecto del diseño mostrado es que el electrodo de trabajo y contra electrodo se configuran
10 de tal manera que la porción mayor del contra electrodo se localiza corriente abajo (en términos de la dirección del flujo de fluido a lo largo de la trayectoria de fluido) desde la porción expuesta del electrodo de trabajo 16a.

El sub-elemento del contra electrodo 18a, sin embargo,
15 se coloca corriente arriba desde el elemento superior del electrodo de trabajo 16a de manera que cuando una cantidad de la muestra de fluido de prueba (por ejemplo, una muestra de sangre entera) inadecuada para cubrir por completo el electrodo de trabajo entra al espacio capilar, se forma una
20 conexión eléctrica entre el sub-elemento del contra electrodo 18a y la porción expuesta del electrodo de trabajo 16a debido a la conductividad de la muestra de sangre entera. El área del contra electrodo, sin embargo, que está disponible para contacto por la muestra de sangre entera es tan pequeña que
25 solamente una corriente muy débil puede pasar entre los electrodos y, así, a través del detector de corriente. Al programar el detector de corriente para dar una señal de error cuando la señal recibida está debajo de un cierto nivel predeterminado, el dispositivo sensor informa al usuario que
30 sangre insuficiente ha entrado en la cavidad del sensor y que

A
14

se debe efectuar otra prueba, o que se debe agregar más sangre. Aunque no son críticas las dimensiones particulares de los electrodos, el área del sub-elemento del contra electrodo 18a es típicamente menor de alrededor de 10% que aquella del electrodo de trabajo y, más específicamente, menor de alrededor de 6%. Este elemento se debe hacer lo más pequeño posible.

También se contempló en la patente de E.U.A. No. 6,531,040 que la capa de reacción 22 se puede retirar del contacto con el sub-elemento de contra electrodo 18a, al producir una pantalla que no imprime tinta de reactivos sobre el sub-elemento del contra electrodo 18a. Esto agotaría al sub-elemento para reactivo, con lo que no se permitiría funcionar como un contra electrodo adecuado, de manera que se alcanza una condición de error cuando la muestra de fluido de prueba falla al hacer contacto con el volumen del contra electrodo 18. Aunque el sub-elemento 18a se muestra por conectarse físicamente a, y por lo tanto parte de, el contra electrodo 18, 18a, se puede desconectar físicamente del resto del contra electrodo con la condición de que tenga su propio conector y el sensor esté equipado con un tercer contacto al detector.

El electrodo de trabajo y contra electrodo se imprimen generalmente al usar tinta de electrodos, la cual es generalmente de alrededor de $14\mu\text{m}$ (0.00055") de grueso y contiene típicamente carbón electroquímicamente activo. Los componentes de la tinta del conductor pueden ser una mezcla de carbón y plata que se escoge para proporcionar una trayectoria de baja resistencia química entre los electrodos y el medidor al cual se conectan por medio del contacto con

el patrón de conducción en el extremo de cola de pescado 26 del sensor. El contra electrodo puede comprender plata/cloruro de plata, aunque se prefiere el carbón. Para intensificar la reproducibilidad de la lectura del medidor, el patrón dieléctrico aísla los electrodos de la muestra de prueba de fluido excepto en un área definida cerca del centro del patrón del electrodo 24. Un área definida es importante en este tipo de determinación electroquímica debido a que la corriente medida depende no solamente de la concentración del analito y el área de la capa de reacción 22, sino también del área del electrodo de trabajo 16a que se expone a la muestra de prueba que contiene el analito.

Una capa dieléctrica típica 20 comprende un monómero, oligómero o polímero modificado de acrilato curado con UV, y tiene alrededor de 10µm (0.0004") de espesor. La capa dieléctrica también puede curarse por humedad o curarse por calor. La tapa o cubierta 28 se adapta para acoplarse con la base para formar un espacio para recibir la muestra de prueba de fluido en la cual se sitúan el contra electrodo y el electrodo de trabajo. La tapa 28 proporciona un espacio cóncavo 30, y está formada típicamente al repujar una hija plana de material deformable. La tapa 28 se perfora para proporcionar una ventilación de aire 32 y se une a la base 12 en una operación de sellado. La tapa y base se pueden sellar juntas por soldadura sónica en la cual la base 12 y la tapa 28 se alinean primero y luego se oprimen juntas entre un miembro vibrador sellado por calor o cuerno y una pinza estacionaria, en contacto solamente con las regiones planas, no repujadas de la tapa. La tapa repujada y base también se pueden unir al usar un material adhesivo en el lado inferior

de la tapa. El método de unión de la tapa y base se describen más completamente en la patente de E.U.A. No. 5,798,031.

Los materiales adecuados para aislar la base 12 incluyen policarbonato, polietilen tereftalato, polímeros de acrílico y de vinilo dimensionalmente estables, y mezclas de polímeros tales como policarbonato/polietilen tereftalato, y estructuras de laminados de metal (por ejemplo, un laminado de nylon/aluminio/cloruro de polivinilo). La tapa típicamente se fabrica a partir de un material de lámina polimérica deformable tales como policarbonato, o un grado repujado de polietilen tereftalato, polietilen tereftalato modificado con glicol, o una composición de laminado de metal (por ejemplo, una estructura de laminado de aluminio).

Otros sensores electroquímicos se pueden usar en la presente invención. Ejemplos de un sensor electroquímico que se puede usar para medir concentraciones de glucosa son aquellos usados en los sistemas Ascensia™ AUTODISC® y Ascensia™ ELITE® de Bayer HealthCare. Más detalles sobre tales sensores electroquímicos se pueden encontrar en la patente de E.U.A. Nos. 5,120,420 y 5,320,732. Otros sensores electroquímicos están disponibles de Matsushita Electric Industrial Company. Un ejemplo adicional de un sensor electroquímico que se puede usar en un sistema de monitoreo amperométrico se describe en la patente de E.U.A. No. 5,429,735.

Los sensores electroquímicos se pueden localizar en un instrumento dosificador de sensor de glucosa en sangre con una pluralidad de sensores. Un ejemplo de un paquete sensor cargado en un instrumento dosificador de sensor se describe en la patente de E.U.A. No. 5,660,791.

20

Cuando se coloca un sensor electroquímico en un instrumento de medición adecuado y se introduce una muestra de sangre, se aplica un potencial a través de los electrodos y la corriente eléctrica se mide, correlacionada con el contenido de glucosa de la muestra, y reportada al usuario.

Los sensores amperométricos pueden aplicar un potencial fijo a través de los electrodos y la corriente producida se mide sobre un periodo de tiempo predeterminado, el cual puede ser bastante corto, es decir de 5 a 10 segundos, con objeto de corregir la desviación que pueda estar presente debido a la reducción prematura del mediador. Ese periodo de refiere como "periodo de quemado". La corriente se eleva hasta un pico y luego declina, mientras se rehidrata la muestra en la capa de reactivos, permitiendo que sucedan reacciones de oxidación y reducción. Después de este periodo de quemado, se retira el potencial aplicado o al menos se reduce durante un periodo de reposo que permite que sucedan las reacciones. Luego se vuelve a aplicar el potencial y la corriente se mide sobre un periodo predeterminado de "lectura" (por ejemplo, diez segundos). Ya que el mediador reducido está presente como resultado de la oxidación concomitante de la enzima, la corriente inicialmente producida es alta, pero luego declina asintóticamente y se acerca a una condición en régimen permanente. La corriente registrada al final del periodo de "lectura" corta se usa para determinar el contenido de glucosa de la muestra de sangre, a través de una correlación previamente obtenida entre la corriente al final del periodo de lectura y la glucosa contenida en muestras de prueba que tienen concentraciones conocidas.

X
d

La composición que reacciona con una muestra de sangre en un biosensor electroquímico debe proporcionar una respuesta consistente de un sensor al siguiente. La respuesta consistente es importante para los usuarios que se basan en los resultados para ajustar su dieta o medicamento. Sigue que los cambios en la actividad de los reactivos sobre la vida de anaquel del biosensor deben ser lo más pequeño posibles, pero al menos predecibles, de manera que se pueda hacer el ajuste de los resultados. La presente invención resuelve un problema descubierto en donde la enzima-co-factor GDH-PQQ se iba a usar en un biosensor electroquímico en el cual la composición reactiva se iba a imprimir en pantalla sobre los electrodos del sensor. Los inventores encontraron que GDH-PQQ en componentes comúnmente usados en impresión en pantalla provocaron que el GDH-PQQ pierda actividad.

Las mezclas de GDH-PQQ con ferrocianuro de potasio como un mediador de óxido-reducción se prepararon en una serie de soluciones amortiguadoras. Aunque se sabía que el GDH-PQQ prefería un pH neutro, las soluciones amortiguadoras, incluyendo soluciones amortiguadoras de acetato, citrato y succinato, que proporcionan un pH en el rango de desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5 y, más específicamente, desde alrededor de 5.0 hasta alrededor de 6.0 se encontraron que eran más deseables, ya que el mediador de ferrocianuro es más estable en pH ácido (ver FIG. 2).

Se encontró que determinados materiales poliméricos también parecían provocar una pérdida de actividad incluso cuando se usaron soluciones amortiguadoras de bajo pH. Dos polímeros usados para formar un portador para la enzima y mediador de óxido-reducción se probaron con acetato de calcio

22

75mM y succinato de sodio 75mM en soluciones amortiguadoras. No se incluyó ferrocianuro de potasio. Los resultados se muestran en la FIG. 3 en los cuales el efecto inicial sobre la actividad de la enzima se muestra y se compara con el efecto después de dos semanas a -20°C . Se puede observar que cuando solamente soluciones amortiguadoras de succinato y acetato estaban presentes en una solución que contiene 8.8 unidades de GDH-PQQ por miligramo de tinta de reactivos y 10 mM de CaCl_2 , pero sin ferrocianuro, la solución amortiguadora no provocó una pérdida importante de actividad después de dos semanas a -20°C . La actividad de la enzima se determina con un instrumento Beckman SYNCHRON CX 4[®] Delta que mide la velocidad de formación del diformazan a 560 nm formado por la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) con metosulfato de fenazina (PMS) a 37°C . Sin embargo, cuando se incluyen aditivos previamente usados para preparar las tintas para impresión en pantalla, se observaron pérdidas importantes de actividad. La bentona, un espesante de arcilla, suministrado por RHEOX, Inc. se incluyó a 1.3 % en peso en la solución amortiguadora. Los resultados mostrados en la FIG. 3 indican que en la solución amortiguadora de acetato, la bentona provocó una pérdida de actividad de enzima de alrededor de 10%, mientras que en la solución amortiguadora de succinato, alrededor de 90% de la actividad de la enzima se perdió del reactivo fresco y también del reactivo almacenado a -20°C durante dos semanas. Se perdió la actividad también cuando 7.4 % en peso de óxido de polietileno se agregó a las soluciones amortiguadoras, aunque la diferencia en el efecto de las soluciones amortiguadoras es notable. Se puede concluir que las formulaciones de reactivos que contienen

23

GDH-PQQ en combinación con bentona u óxido de polietileno mostraron menores actividades de enzima y son por lo tanto componentes espesantes menos deseables de una tinta de reactivos para impresión en pantalla.

5 La investigación del efecto de otros espesantes que fueron reemplazos potencialmente adecuados para bentona y óxido de polietileno resultó en el descubrimiento de que determinados materiales produjeron una tinta de reactivos adecuada para impresión en pantalla sin provocar una pérdida
10 de actividad de GDH-PQQ. Los resultados mejorados se ilustran en la FIG. 4. En las pruebas reportadas en la FIG. 4, 4 a 8 u/mg de GDH-PQQ, 1.6 % en peso de sílice fumante sin tratar CAB-O-SIL M5®, 4.5 a 6.5 % en peso de hidroxietil celulosa (HEC), y varios tensoactivos se agregaron a la solución
15 amortiguadora de acetato. La actividad de la enzima se midió con el ensayo de enzimas PMS/NBT sobre el analizador Beckman a 37°C. CAB-O-SIL M5® fue adecuado en combinación con HEC. Está claro que la combinación de CAB-O-SIL M5® y HEC no provocó una pérdida de actividad de enzimas durante el
20 periodo probado.

Como se ha mostrado, la hidroxietil celulosa se puede usar como un componente de matriz en la capa de reactivos en biosensores electroquímicos al usar GDH-PQQ sin provocar una pérdida indebida de actividad de enzimas. Otros polímeros
25 hidrofílicos relacionados también se pueden usar, para hacer la viscosidad de la composición adecuada para impresión en pantalla. Otros derivados de celulosa incluyen, pero no se limitan a, carboximetil celulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, o hidroxipropil
30 metilcelulosa. Otros polímeros solubles en agua que pueden

ser útiles incluyen gomas xantana, goma guar, goma de algarroba, carragenina, agarosa, y polímeros sintéticos incluyendo alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, y los similares.

5 CAB-O-SIL M5® es una sílice fumante amorfa sin tratar que ha demostrado proporcionar las propiedades físicas necesarias para tintas usadas en impresión en pantalla de capas de reactivos de la invención. Esta sílice hidrofílica sin tratar se va a diferenciar de la sílice tratada enseñada
10 en varias patentes previas para balancear las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas. Los agentes espesantes insolubles en agua alternos incluyen, pero no se limita a, talco, mica, tierra diatomácea, arcillas naturales y modificadas, por ejemplo arcillas de bentonita, arcillas de
15 hectorita (por ejemplo, Optigel SH de IMV Nevada), sepiolitas (por ejemplo, Sepiogel F de IMV Nevada), montmorilonitas (por ejemplo, arcilla IGB de IMV Nevada), Saponitas (por ejemplo, Sepiogel F y IMVITE 1016 de IMV Nevada y Laponite de productos de arcilla Southern), y los similares.

20 Como se muestra en la FIG. 4, la selección de los tensoactivos también puede afectar la actividad de GDH-PQQ. Triton x-100, un alcohol de alquil aril poliéter, suministrado por Sigma es muy adecuado. Sin embargo, otros incluyendo FC 170C, un producto de 3M, Surfynol 485, un
25 producto de Air Products and Chemicals, Inc., y Pluronic L62 D, un producto de BASF se consideran ser útiles en formulaciones de la invención.

Las composiciones de reactivos preferidas para el biosensor de impresión en pantalla de acuerdo con la
30 invención contienen:

alrededor de 30 hasta alrededor de 200 mM y, más específicamente, alrededor de 50 hasta alrededor de 150 mM de una solución amortiguadora, preferiblemente acetato de calcio
alrededor de 5 hasta alrededor de 50 mM de CaCl_2

5 hasta alrededor de 0.5 % en peso de un tensoactivo, con base en el peso total de la composición

alrededor de 2 hasta alrededor de 10 % en peso de un derivado de celulosa, preferiblemente hidroxietil celulosa, con base en el peso total de la composición

10 alrededor de 1 hasta alrededor de 6 % en peso de sílice amorfa sin tratar, con base en el peso total de la composición

alrededor de 10 hasta alrededor de 20 % en peso de ferrocianuro de potasio como un mediador, con base en el peso
15 total de la composición

alrededor de 1 hasta alrededor de 8 unidades de enzima-cofactor GDH-PQQ para cada miligramo del peso total de la composición

una viscosidad desde alrededor de 60,000 hasta alrededor
20 de 180,000 cps (mPa·s).

Ejemplo 1

Una solución amortiguadora 75mM de acetato de calcio que tiene un pH de 5.3 se preparó al agregar acetato de calcio y ácido acético glacial. A la solución amortiguadora se
25 agregaron los siguientes compuestos: 10mM CaCl_2 , 0.05 % en peso de tensoactivo Triton X-100, 1-3 % en peso de polvo de sílice fumante sin tratar Cabosil M5, y 4-8 % en peso de hidroxietil celulosa. Después de permitir 16 horas para hidratación de la sílice y celulosa, 15-20 % en peso de
30 ferrocianuro de potasio y, 3 a 8 unidades de GDH-PQQ se

726

agregaron a cada miligramo de la tinta de reactivos. La tinta de reactivos se mezcló a 600 rpm con un mezclador de cuchillas por alrededor de 10 a 20 minutos para producir una composición de reactivos que tiene una viscosidad alrededor de 80,000 a 140,000 cps.

La composición de reactivos se imprimió en pantalla sobre electrodos que contienen sustrato y se secó a 45-50°C por 5 minutos.

10

Ejemplo 2

Se prepararon los sensores de glucosa al usar la composición de reactivos del Ejemplo 1 y se probaron con muestras de sangre que contienen contenidos de glucosa conocidos y tienen 40% de hematocrito. Se aplicó un potencial de 200 a 400 milivoltios a los electrodos y se midió la corriente diez segundos después de aplicar el potencial que se usó para determinar los contenidos de glucosa de las muestras. Los resultados de estas pruebas se muestran en la FIG. 5 donde la respuesta de un medidor de glucosa Ascensia™ AUTODISC® programado para un tiempo de prueba de 10 segundos se graficó contra el contenido de glucosa medido por el instrumento YSI de glucosa estándar en la industria. Se puede observar que se obtiene una respuesta lineal, que fue relativamente insensible a la concentración de la concentración de la enzima-cofactor dentro del rango estudiado.

Los sensores también demostraron una buena respuesta a la dosis cuando se comparan con los resultados obtenidos a partir del instrumento YSI, un estándar de la industria. La

30

desviación relativa a los resultados del instrumento YSI se muestra en la FIG. 6. La desviación estuvo dentro de $\pm 5 \%$ para muestras con ≤ 400 mg/dL glucosa y dentro de $\pm 10\%$ para muestras con 680 mg/dL glucosa.

5

MODALIDAD ALTERNATIVA A

Una composición de reactivos para biosensores electroquímicos de impresión en pantalla comprende:

(a) glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica;

(b) a polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(c) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(d) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5 a 6.0;

(e) un tensoactivo; y

(f) un mediador.

MODALIDAD ALTERNATIVA B

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde la solución amortiguadora es una solución amortiguadora de acetato, citrato, o succinato.

MODALIDAD ALTERNATIVA C

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde el tensoactivo es un alcohol de poliéter de alquil arilo.

MODALIDAD ALTERNATIVA D

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde el mediador es ferrocianuro de potasio.

MODALIDAD ALTERNATIVA E

5 La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde la solución amortiguadora es desde 5.0 a 6.0.

MODALIDAD ALTERNATIVA F

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa E en donde la composición tiene una viscosidad de alrededor
10 de 60,000 hasta alrededor de 180,000 cps (mPa*s).

MODALIDAD ALTERNATIVA G

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde el polímero hidrofílico es un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste de carboximetil celulosa
15 de sodio, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, e hidroxipropilmetil celulosa.

MODALIDAD ALTERNATIVA H

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa G en donde el polímero hidrofílico es hidroxietil celulosa.

20 MODALIDAD ALTERNATIVA I

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde el agente espesante es polvo de sílice amorfa sin tratar.

25

MODALIDAD ALTERNATIVA J

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa I en donde el polvo de sílice amorfa sin tratar es hidrofílico.

30 MODALIDAD ALTERNATIVA K

29

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A en donde 1-8 unidades del GDH-PQQ están presentes para cada miligramo del peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA L

5 La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa B en donde la solución amortiguadora está presente en alrededor de 30 hasta alrededor de 200 mM.

MODALIDAD ALTERNATIVA M

10 La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa C en donde hasta alrededor de 0.5 % en peso del alcohol de poliéter está presente, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA N

15 La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa D en donde alrededor de 10 hasta alrededor de 20 % en peso del ferrocianuro de potasio, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA O

20 La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa G en donde alrededor de 2 hasta alrededor de 10 % en peso del derivado de celulosa está presente, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA P

25 La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa I en donde alrededor de 1 hasta alrededor de 6 % en peso del polvo de sílice amorfa sin tratar está presente, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA Q

170
3

La composición de reactivos de la Modalidad Alternativa A comprende además alrededor de 5 hasta alrededor de 50 mM de cloruro de calcio.

MODALIDAD ALTERNATIVA R

5 Un biosensor electroquímico que comprende:

(a) un sustrato no poroso;

(b) electrodo de trabajo y contra electrodo dispuestos sobre el sustrato;

(c) una composición de reactivos impresa en pantalla
10 sobre los electrodos, la composición comprende:

(1) alrededor de 1-8 unidades de glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica, por cada miligramo del peso total de la composición;

15 (2) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(3) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica,
20 tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(4) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5,

(5) un tensoactivo, y

25 (6) un mediador; y

(d) una cubierta protectora para los electrodos y la composición de reactivos.

MODALIDAD ALTERNATIVA S

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
30 R en donde la solución amortiguadora es alrededor de 30 hasta

alrededor de 200 mM de una solución amortiguadora de acetato, citrato, o succinato.

MODALIDAD ALTERNATIVA T

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
5 R en donde el tensoactivo es hasta alrededor de 0.5 % en peso de un alcohol de poliéter de alquil arilo, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA U

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
10 R en donde el mediador es alrededor de 10 hasta alrededor de 20 % en peso de ferrocianuro de potasio, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA V

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
15 R en donde cantidades suficientes de los componentes (c) (2) y (c) (3) se incluyen para proporcionar una composición adecuada para uso en impresión en pantalla.

MODALIDAD ALTERNATIVA W

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
20 R en donde la composición tiene una viscosidad de alrededor de 60,000 hasta alrededor de 180,000 cps (mPa•s).

MODALIDAD ALTERNATIVA X

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
R en donde el polímero hidrofílico es alrededor de 2 hasta
25 alrededor de 10 % en peso de un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste de carboxi metil celulosa de sodio, hidroxí etil celulosa, hidroxí propil celulosa, e hidroxí propil metil celulosa, con base en el peso total de la composición.

30 MODALIDAD ALTERNATIVA Y

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa X en donde el polímero hidrofílico es hidroxietil celulosa.

MODALIDAD ALTERNATIVA Z

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa R en donde el agente espesante es desde alrededor de 1 hasta
5 alrededor de 6 % en peso de un polvo de sílice amorfa sin tratar, con base en el peso total de la composición.

MODALIDAD ALTERNATIVA AA

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa
10 Z en donde el polvo de sílice amorfa sin tratar es hidrofílico.

MODALIDAD ALTERNATIVA BB

El biosensor electroquímico de la Modalidad alternativa R en donde la composición de reactivos incluye desde
15 alrededor de 5 hasta alrededor de 50 mM de cloruro de calcio.

PROCESO ALTERNATIVO CC

Un método para mantener la actividad de glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) en una composición de reactivos impresa en pantalla
20 usada en un biosensor electroquímico que comprende impresión en pantalla de una composición de reactivos, el método comprende las acciones de:

(a) glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una
25 muestra biológica;

(b) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(c) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(d) una solución amortiguadora suficiente para mantener
5 el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5;

(e) un tensoactivo; y

(f) un mediador.

PROCESO ALTERNATIVO DD

10 El método de Proceso alternativo CC en donde el polímero hidrofílico es un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste de carboxi metil celulosa de sodio, hidroxil etil celulosa, hidroxil propil celulosa, y hidroxil propil metil celulosa.

15 PROCESO ALTERNATIVO EE

El método de Proceso alternativo CC en donde el agente espesante es polvo de sílice amorfa sin tratar.

PROCESO ALTERNATIVO FF

20 El método de Proceso alternativo CC en donde el pH se mantiene en el rango desde 5.0 a 6.0.

Aunque la invención es susceptible a diversas modificaciones y formas alternativas, modalidades específicas se muestran a manera de ejemplo en los dibujos y se describen en detalle. Se entenderá, sin embargo, que no se pretende
25 limitar la invención a las formas particulares descritas, sino por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas que caen dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de reactivos para biosensores electroquímicos de impresión en pantalla caracterizada porque
5 comprende:

(a) glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica;

(b) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que
10 consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(c) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(d) una solución amortiguadora suficiente para mantener
15 el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5 a 6.0;

(e) un tensoactivo; y

(f) un mediador.

20 2. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la solución amortiguadora es una solución amortiguadora de acetato, citrato, o succinato.

25
27
35

3. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el tensoactivo es un alcohol de poliéter de alquil arilo.

4. La composición de reactivos de conformidad con la
5 reivindicación 1, caracterizada porque el mediador es ferrocianuro de potasio.

5. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la solución amortiguadora es desde 5.0 a 6.0.

10 6. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la composición tiene una viscosidad de alrededor de 60,000 hasta alrededor de 180,000 cps (mPa•s).

7. La composición de reactivos de conformidad con la
15 reivindicación 1, caracterizada porque el polímero hidrofílico es un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste de carboximetil celulosa de sodio, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, e hidroxipropilmetil celulosa.

20 8. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el polímero hidrofílico es hidroxietil celulosa.

9. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el agente espesante es
25 polvo de sílice amorfa sin tratar.

27
36

10. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el polvo de sílice amorfa sin tratar es hidrofílico.

11. La composición de reactivos de conformidad con la
5 reivindicación 1, caracterizada porque 1-8 unidades de GDH-PQQ están presentes por cada miligramo del peso total de la composición.

12. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la solución
10 amortiguadora está presente en alrededor de 30 hasta alrededor de 200 mM.

13. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque hasta alrededor de 0.5 % en peso del alcohol de poliéter está presente, con base en
15 el peso total de la composición.

14. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque alrededor de 10 hasta alrededor de 20 % en peso del ferrocianuro de potasio, con base en el peso total de la composición.

20 15. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque alrededor de 2 hasta alrededor de 10 % en peso del derivado de celulosa está presente, con base en el peso total de la composición.

25 16. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque alrededor de 1 hasta

alrededor de 6 % en peso del polvo de sílice amorfa sin tratar está presente, con base en el peso total de la composición.

17. La composición de reactivos de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además alrededor de 5 hasta alrededor de 50 mM de cloruro de calcio.

18. Un biosensor electroquímico caracterizado porque comprende:

(a) un sustrato no poroso;
10 (b) electrodo de trabajo y contra electrodo dispuestos sobre el sustrato;

(c) una composición de reactivos que se imprime en pantalla sobre los electrodos, la composición comprende:

(1) alrededor de 1-8 unidades de glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica, por cada miligramo del peso total de la composición;

(2) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

20 (3) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(4) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5,

(5) un tensoactivo, y

5 (6) un mediador; y

(d) una cubierta protectora para los electrodos y la composición de reactivos.

19. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la solución
10 amortiguadora es alrededor de 30 hasta alrededor de 200 mM de una solución amortiguadora de acetato, citrato, o succinato.

20. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el tensoactivo es hasta alrededor de 0.5 % en peso de un alcohol de poliéter de
15 alquil arilo, con base en el peso total de la composición.

21. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el mediador es alrededor de 10 hasta alrededor de 20% en peso de ferrocianuro de potasio, con base en el peso total de la
20 composición.

22. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque cantidades suficientes de componentes (c)(2) y (c)(3) se incluyen para proporcionar una composición adecuada para uso en impresión
25 en pantalla.

28
59

23. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la composición tiene una viscosidad de alrededor de 60,000 hasta alrededor de 180,000 cps (mPa•s).

5 24. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el polímero hidrofílico es alrededor de 2 hasta alrededor de 10 % en peso de un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste de carboxi metil celulosa de sodio, hidroxil etil
10 celulosa, hidroxil propil celulosa, e hidroxil propil metil celulosa, con base en el peso total de la composición.

25. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el polímero hidrofílico es hidroxil etil celulosa.

15 26. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el agente espesante es desde alrededor de 1 hasta alrededor de 6% en peso de un polvo de sílice amorfa sin tratar, con base en el peso total de la composición.

20 27. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el polvo de sílice amorfa sin tratar es hidrofílico.

28. El biosensor electroquímico de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la composición de

48
40

reactivos incluye desde alrededor de 5 hasta alrededor de 50 mM de cloruro de calcio.

29. Un método para mantener la actividad de glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) en una composición de reactivos impresa en pantalla usada en un biosensor electroquímico que comprende la impresión en pantalla de una composición de reactivos, el método caracterizado porque comprende los actos de:

(a) glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica;

(b) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(c) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(d) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5;

(e) un tensoactivo; y

(f) un mediador.

30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el polímero hidrofílico es un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste de carboxi

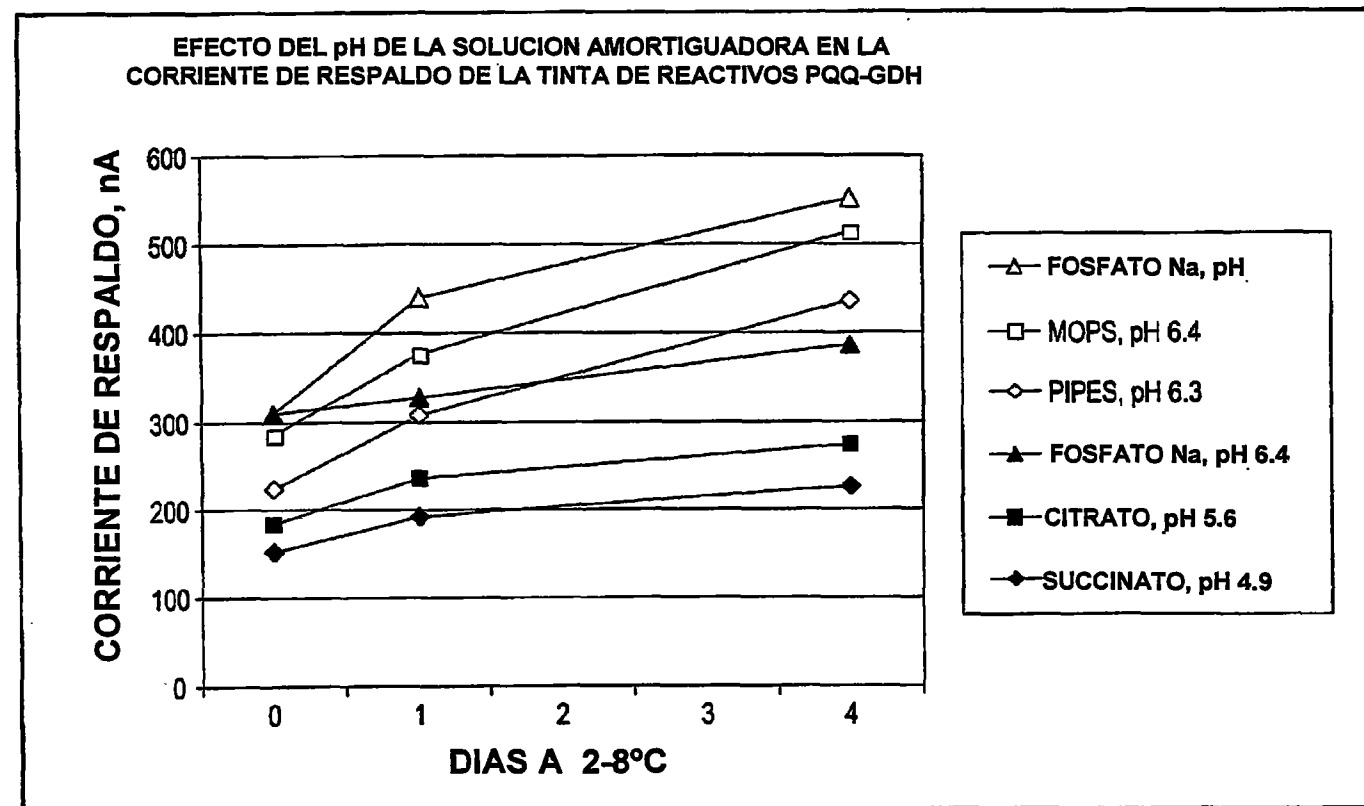


Fig. 2

[Handwritten signature]

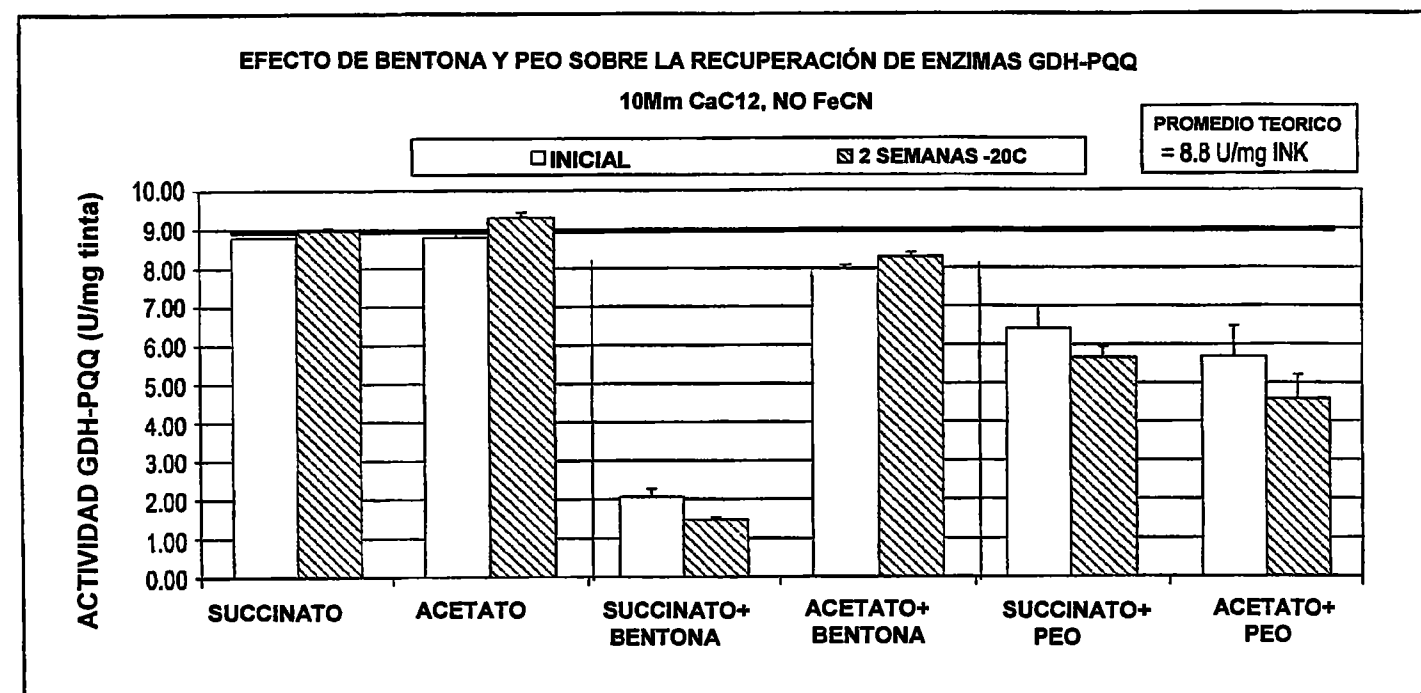


Fig. 3

[Handwritten signature]

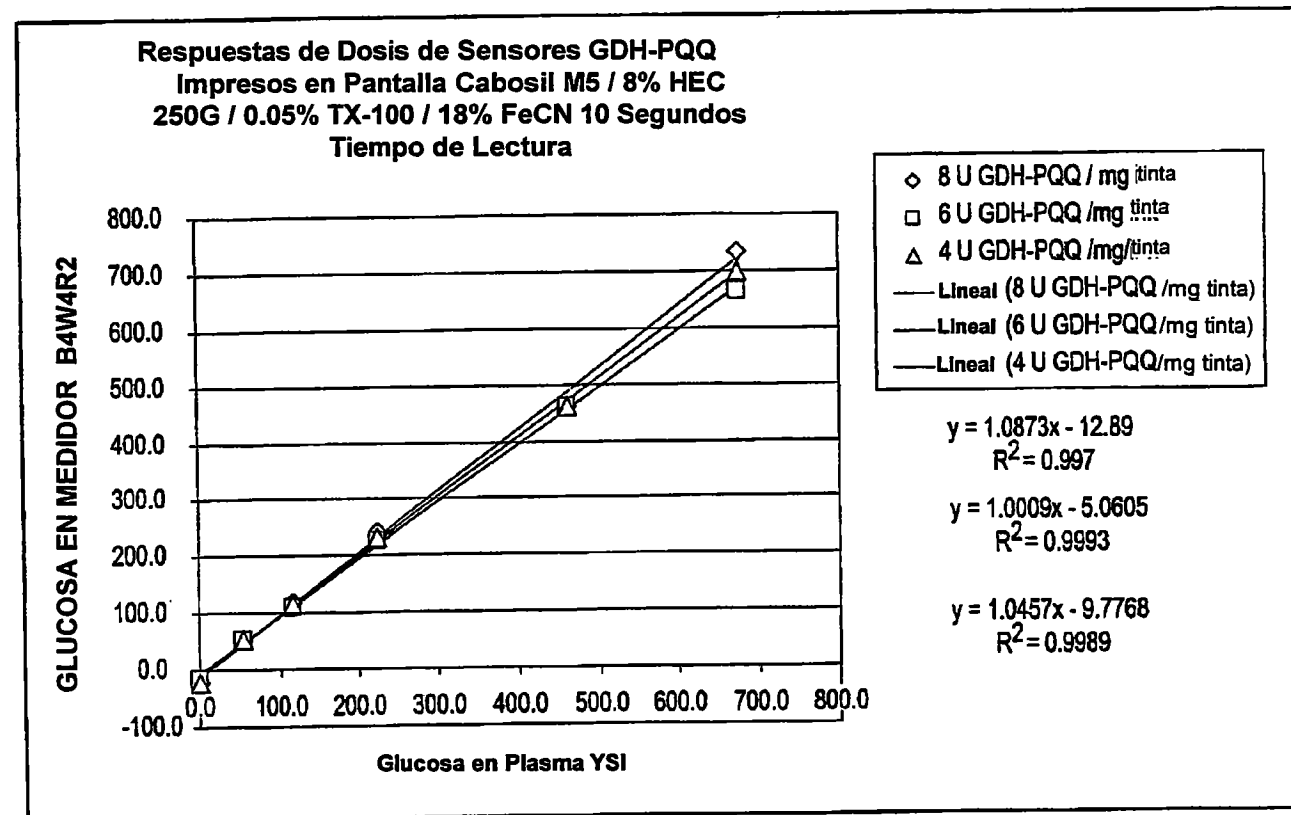


Fig. 5

Handwritten signature

EXTRACTO PARA LA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

51
5

.(21) No. SOLICITUD	.(51) INT.CL: G01N 33/487
.(22) FECHA DE PRESENTACION	.(71) SOLICITANTE: BAYER HEALTHCARE LLC
.(30) PRIORIDAD	
.(31) No. DE SOLICITUD 60/658,634	.(72) INVENTOR(ES): Amy H. CHU - Hope G. SPRADLIN
.(32) FECHA DE PRESENTACION Marzo 4, 2005	
.(33) PAIS E.U.A.	.(74) APODERADO: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON

.(54) TITULO: ESTABILIZACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS EN BIOSENSORES ELECTROQUIMICOS

.(57) RESUMEN

1. Una composición de reactivos para biosensores electroquímicos de impresión en pantalla caracterizada porque comprende:

(a) glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica;

(b) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(c) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(d) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5 a 6.0;

(e) un tensoactivo; y

(f) un mediador.

18. Un biosensor electroquímico caracterizado porque comprende:

(a) un sustrato no poroso;

(b) electrodo de trabajo y contra electrodo dispuestos sobre el sustrato;

(c) una composición de reactivos que se imprime en pantalla sobre los electrodos, la composición comprende:

(1) alrededor de 1-8 unidades de glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica, por cada miligramo del peso total de la composición;

(2) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(3) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(4) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5,

(5) un tensoactivo, y

(6) un mediador; y

(d) una cubierta protectora para los electrodos y la composición de reactivos.

29. Un método para mantener la actividad de glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) en una composición de reactivos impresa en pantalla usada en un biosensor electroquímico que comprende la impresión en pantalla de una composición de reactivos, el método caracterizado porque comprende los actos de:

(a) glucosa deshidrogenasa (GDH) y co-factor pirrolo-quinolina quinona (PQQ) para la oxidación de glucosa en una muestra biológica;

(b) un polímero hidrofílico seleccionado del grupo que consiste de derivados de celulosa, gomas naturales y geles, y polímeros sintéticos solubles en agua;

(c) un agente espesante seleccionado del grupo que consiste de polvo de sílice amorfa sin tratar, talco, mica, tierra diatomácea, y arcillas naturales y modificadas;

(d) una solución amortiguadora suficiente para mantener el pH en el rango desde alrededor de 4.5 hasta alrededor de 6.5;

(e) un tensoactivo; y

(f) un mediador.



No. 07-097001- -00000-0000

Fecha: 2007-09-19 14:46:40 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 52



ia y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

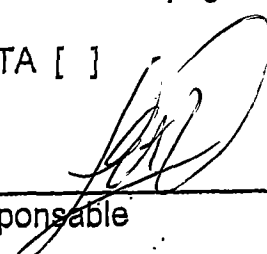
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable 

Fecha Sept 19 de 2007

Carrera 13, No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

55

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 54

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CASTILLO GIBSON LUIS FELIPE
Apoderado(a) y/o Representante de
BAYER HEALTH CARE LLC

REFERENCIA	Radicación No.	7 97001
	Solicitud internacional	PCT/US2006/007875
	Fecha inicio fase nacional	04/10/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	4171
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

05 OCT 2007

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand