

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 582**

51 Int. Cl.:
B01D 67/00 (2006.01)
B01D 69/00 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05817596 .9**
96 Fecha de presentación: **03.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1824586**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL RECUBRIMIENTO DE MEMBRANAS.**

30 Prioridad:
07.12.2004 DE 102004058794

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
KLEPP, Juergen;
MANGOLD, Dieter;
LERCH, Rolf;
FISCHER, Thomas y
SCHAEFFLER, Juergen

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 582 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).

DESCRIPCION

Procedimiento para el recubrimiento de membranas

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la aplicación de películas reactivas con un contenido en sólidos, sobre membranas microporosas, a las correspondientes membranas producidas, y a los medios de diagnóstico contenidos en las mismas.
- 10 Para la determinación analítica, cualitativa o cuantitativa, de los componentes de los líquidos, en particular de los líquidos corporales como la sangre, se emplean a menudo los llamados ensayos vinculados a un soporte. En su caso, los reactivos, en particular los reactivos específicos de detección y reactivos auxiliares se incrustan o se fijan en las correspondientes capas de un soporte sólido. Estas capas reciben el nombre de elementos de detección. Para la determinación del correspondiente analito se pone en contacto la muestra líquida que lo contiene con estos elementos de detección. La reacción de la muestra líquida y de los reactivos que al principio están en forma seca y
- 15 que luego se disuelven en la muestra, conduce en presencia de algún analito diana, por regla general a una señal detectable óptica o electroquímicamente, en particular un cambio de color que puede ser evaluado visualmente o con la ayuda de un aparato, la mayor parte de las veces un aparato de reflexión fotométrica. Otros métodos de detección se basan por ejemplo en métodos electroquímicos y comprenden las variaciones de la carga, del potencial o de la intensidad de la corriente.
- 20 Dado que los reactivos de detección - a diferencia de los ensayos de laboratorio convencionales - se encuentran al principio en forma anhidra, se habla a menudo de los ensayos vinculados a un soporte también como de "ensayos químicos en seco".
- 25 Los elementos de ensayo o soportes de ensayo para ensayos químicos en seco están a menudo formados como tiras de ensayo, y constan esencialmente de una capa soporte longitudinal de un material plástico, sobre la cual están aplicados los elementos de detección como campos de ensayo. Sin embargo, se conocen también soportes de ensayo que tienen forma de plaquitas cuadradas o rectangulares.
- 30 La detección fotométrica de los analitos de la sangre de bajo peso molecular mediante tiras de ensayo de química seca comprende normalmente la previa separación de los eritrocitos que estorban la medición fotométrica.
- Las enzimas necesarias para la detección analítica se encuentran normalmente en una película insoluble en agua, impermeable, en la cual una matriz hidrófoba que consta de formadores de película contiene todos o por lo menos
- 35 una parte de los reactivos de detección (es decir, esencialmente enzimas y el sistema indicador), penetran en la muestra y tiene lugar la reacción que genera un color. Estas películas se aplican por medio de diferentes procedimientos de recubrimiento ya conocidos (por ejemplo, con rasqueta) sobre materiales de soporte no absorbentes, mecánicamente estables, (como por ejemplo, láminas de Pokalon® de policarbonato de bisfenol-A.
- 40 Bajo el concepto de formadores de película se comprenden aquellos polímeros que permiten el recubrimiento mecánicamente estable de capas de reactivos resistentes al agua (por ejemplo el Propiofan®, una dispersión de propionato de vinilo en una sustancia plástica).
- Por otra parte, estas películas reactivas contienen normalmente sustancias absorbentes que se hinchan. Las
- 45 sustancias absorbentes que se hinchan son polímeros solubles en agua que influyen significativamente sobre la viscosidad de la masa de recubrimiento, que actúan dividiendo finamente los reactivos en las zonas hidrófobas parciales de la capa impermeable, y que facilitan la penetración de la muestra en la capa (como ejemplo, pueden citarse, el alginato, el Keltrol®, el Gantrez®, el Eudragit, etc.).
- 50 La "porosidad abierta" y con ello la penetración del analito en la película reactiva puede ser influenciada positivamente mediante la adición de sustancias de relleno (llamadas también "abridores de película") (véase por ejemplo la patente US 4. 312. 834). Las sustancias de relleno son partículas inorgánicas u orgánicas finas, ópticamente no dispersantes o muy poco dispersantes, insolubles en agua, no absorbentes, no hinchantes, buenas humectantes, que permiten la rápida penetración incluso de grandes moléculas (por ejemplo lípidos en forma de
- 55 lipoproteínas) e incluso de células (por ejemplo eritrocitos) en las películas impermeables al agua. Como ejemplo de sustancias de relleno, pueden citarse la creta, la celulosa, la tierra de diatomeas, el Celatom, el Kieselgur, el ácido silícico, etc.
- 60 En la primera generación de tiras ensayo para la determinación de glucosa en sangre (por ejemplo el Hämoglucotest 20-800, ver también patente US 3. 630. 957), la película reactiva contiene junto con la química de detección solamente un formador de película (Propiofan®) y una sustancia absorbente hinchante (alginato). En estas películas muy tupidas, es decir películas de poros poco abiertos, resistentes al limpiado con un trapo, los eritrocitos no pueden penetrar en la película reactiva y en cambio sí pueden hacerlo los componentes de la sangre de bajo peso molecular, como en particular la glucosa. En consecuencia no es necesaria una previa separación de la sangre
- 65 por separado. Las gotas de sangre a partir de las cuales debe determinarse la glucosa en sangre, se aplican directamente sobre la capa reactiva de la tira de ensayo. Después de un minuto de incubación de la gota de sangre

sobre la película reactiva se limpia la sangre, y a continuación, después de otro minuto de tiempo de reacción, puede efectuarse ya la lectura del desarrollo de color como una medida de la concentración del analito, en la misma cara de la tira sobre la cual se ha aplicado antes la sangre.

5 Con ello es posible en primer lugar, detectar la glucosa directamente a partir de la sangre completa. Puesto que esta película reactiva no contiene sustancias de relleno, permite solamente la lenta penetración de analitos solubles en agua de bajo peso molecular como por ejemplo, la glucosa pero no es posible la detección de moléculas más grandes e hidrófobas (como por ejemplo la colesterolina (CHOL), la HDL ("High density lipoprotein", es decir las lipoproteínas de alta densidad), los triglicéridos (TG), la creatinaquinasa (CK), etc.).

10 Un hito en el desarrollo de los ensayos de química seca para la detección analítica a partir de la sangre completa, lo constituyó el empleo de la napa de fibras de vidrio para la separación de los eritrocitos (ver a este respecto entre otras, la patente US 4.816.224), en especial en combinación con películas reactivas de poro abierto conteniendo sustancias sólidas (por ejemplo las tiras de ensayo de la línea de productos Reflotron de Roche Diagnostics y más tarde los llamados "Non-Wipe-Teste" ("ensayos sin limpiar") de la línea Accutrend de Roche Diagnostics). Junto a cinéticas claramente más rápidas – en particular por lo que se refiere a la penetración del analito en la película de detección, a la reacción enzimática y a la reacción cromática – este tipo de ensayos permiten también la detección de moléculas hidrófobas relativamente más grandes (por ejemplo, CHOL, HDL, TG, etc.).

20 Una desventaja de la tecnología con napa de fibra de vidrio consiste sin embargo en la relación relativamente desfavorable entre el volumen de plasma utilizable y el volumen de sangre empleado (de aquí en adelante, llamado también rendimiento sangre/plasma). Además, se demuestra en la detección oxidante del analito (es decir, en la detección del analito mediante la oxidasa de analito y la reacción del peróxido de hidrógeno con peroxidasa en presencia de un indicador, el cual pasa de una forma reducida (incolora la mayor parte de veces) a una forma oxidada (coloreada la mayor parte de las veces), en particular en las llamadas estructuras apiladas (la napa de fibra de vidrio para la separación de los eritrocitos y la película reactiva forman un conjunto apilado; sobre la napa de fibra de vidrio se aplica la muestra de sangre, ésta penetra dentro de la napa de fibra de vidrio con separación de las células rojas de la sangre, y el suero o respectivamente el plasma penetra en la capa de película reactiva que está situada debajo, en donde tiene lugar la propia reacción de detección y del indicador, la cual puede observarse en la cara opuesta a la cara de aplicación de la sangre del grupo apilado), teniendo como limitación el aporte de oxígeno a la película reactiva, de manera que solamente puede lograrse una zona de medición limitada hacia arriba.

30 Para minimizar el volumen de sangre empleado, la generación más joven de tiras de ensayo emplea membranas separadoras de sangre (ver por ejemplo la patente EP-A 0 654 659) ó respectivamente películas muy finas de una o dos capas (ver para ello las patentes US 5. 536. 470 y US 6.036.919). El rendimiento sangre/plasma es para estos sistemas a base de membrana, por regla general, claramente ventajoso respecto al de la tecnología con fibra de vidrio. Los dos sistemas a base de membrana se explican con detalle a continuación.

40 La patente US 5.536.470 da a conocer campos de ensayo que constan de una capa fina de película. En la misma se aplica una muestra de sangre completa a una cara de la capa de la película. Puede detectarse una reacción cromática por la cara opuesta, sin que los eritrocitos de la cara de aplicación de la muestra puedan penetrar en la capa de la detección. La capa de la película puede estar recubierta por un soporte transparente (por ejemplo una lámina) o por una membrana. La capa de película dada a conocer en la patente 5. 536. 470 funciona por ello como una capa combinada), que es a la vez una capa de separación de la sangre (colorante) y una capa de detección. Para cumplir con la función antes citada (separación de la sangre (colorante)), es necesaria una mayor proporción de pigmento, es decir el contenido en pigmento es en este caso por lo menos de un 30 por ciento en peso, referido al contenido en sólidos de la masa formadora de película. Para garantizar la estabilidad mecánica de estas capas de película con una alta proporción de pigmento, es necesario también un alto contenido en formador de película. El pigmento y el formador de película deben tener aproximadamente la misma relación de peso. Las sustancias de relleno inertes (es decir los llamados abridores de película) no deben estar contenidas en lo posible en estas capas de película o por lo menos contenidos en muy pequeñas cantidades (inferiores al 10% del contenido total de sólidos), en la masa formadora de película, puesto que de otra manera la propiedad separadora de la sangre de la capa de película no puede seguir garantizándose. Debido al pequeño contenido de sustancia de relleno de la masa formadora de película hasta un máximo del 10%, las películas dadas a conocer en la patente US 5. 536. 470 no son sin embargo de poro suficientemente abierto para ser permeables para los analitos hidrófobos grandes (por ejemplo los lípidos).

55 En el caso de detección de la glucosa por medio de películas delgadas de dos capas, sobre una lámina transparente, la primera capa (es decir la capa que se aplica directamente sobre la lámina) contiene como película reactiva junto al formador de película del sistema enzima - indicador, sustancias hinchantes y una sustancia de relleno ópticamente transparente (por ejemplo Transpafill®, un silicato de sodio-aluminio de Degussa). En analogía a una detección fotométrica de química húmeda, la primera capa transparente forma casi la cubeta en la cual tiene lugar la detección fotométrica del analito. La segunda capa aplicada sobre la primera capa contiene una alta proporción de un pigmento de alta refracción (por ejemplo el dióxido de titanio), con abstención de los abridores de película o de las sustancias de relleno. La aplicación de la sangre tiene lugar directamente sobre la segunda capa,

la detección fotométrica tiene lugar en la cara opuesta de la tira de ensayo mediante la lámina soporte transparente de la primera capa.

5 La segunda capa ópticamente opaca, y de poro poco abierto, cumple a este respecto con una doble función. Por un lado impide a la película separadora de la sangre la penetración de los eritrocitos en la primera capa reactiva, y por otro lado refleja la luz que cae a través de la primera capa e impide el brillo a través del color rojo de los eritrocitos en la cara de detección.

10 La ventaja de este tipo de sistemas, comparados con la separación de los eritrocitos por medio de una napa de fibra de vidrio, está en el pequeño volumen de muestra necesario y en una rápida cinética en la detección de analitos de bajo peso molecular.

15 La desventaja de esta estructura de dos capas es que las grandes moléculas hidrófobas (por ejemplo las lipoproteínas, la colesteroína, los triglicéridos, el HDL, etc..) no se difunden a través de la segunda capa separadora de la sangre, y con ello no pueden ser detectadas en la primera capa.

20 Una alternativa consiste en el empleo de membranas separadoras de la sangre. Membranas separadoras de sangre (es decir, el plasma o respectivamente el suero obtenidos a partir de la sangre completa), son membranas fuertemente asimétricas (habitualmente de poliéter o de polietersulfona, por ejemplo, BTS-SP-300 de la firma Pall, PrimeCare X ó SG de la firma Spectral Diagnostics), es decir membranas, cuyo diámetro de poro no es regular, sino que tienen una cara de poro abierto y una cara de poro estrecho. La aplicación de la sangre tiene lugar por regla general sobre la cara de membrana de poro abierto. Los eritrocitos son retenidos en los poros rejuvenecidos por la entrada del material de muestra a través de la membrana (ver para ello la patente EP 0 654 659).

25 En principio se emplean membranas separadoras de sangre en dos formas de tiras de ensayo de química seca. En la llamada estructura-de-una-capa, la membrana separadora de sangre cumple junto con la separación de sangre, también la función de soporte para la química de detección. Para esta finalidad, la membrana se impregna de un sistema acuoso, de un indicador y de un sistema de detección (por ejemplo mediante inmersión en un baño o de dosificación a través de una boquilla de ranura).

30 Para garantizar una rápida separación de las enzimas impregnadas y secadas y una rápida humectación de la membrana a través del material de muestra, se añade a la solución de impregnación normalmente un humectante.

35 Una desventaja de la estructura de membrana de una sola capa, consiste en que la membrana en estado seco es ópticamente opaca (el índice de refracción de la luz es aproximadamente 1,00; el índice de refracción de la membrana es aproximadamente de 1,35-1,38, es decir, la diferencia del índice de refracción es aproximadamente de 0,35-0,38, de manera que la membrana se comporta como opaca), sin embargo en estado húmedo, es claramente ópticamente transparente (el índice de refracción del agua es aproximadamente de 1,33, de manera que la diferencia del índice de refracción es todavía aproximadamente, de 0,02 – 0,05), con lo cual el color propio de la sangre que se trasluce en los eritrocitos separados en la zona inferior de la membrana, interfiere la medición fotométrica.

45 Mediante la adición de pigmentos de color blanco (por ejemplo el dióxido de titanio, con un índice de refracción aproximadamente de 2,55) a la solución de impregnación, este inconveniente puede ser minimizado, hasta ser anulado. Puesto que el tamaño de las partículas de los pigmentos de color blanco prácticamente opacos, es del orden de la mitad de la longitud de onda de la luz reflejada (de 0,2 a 0,4 μm), pueden penetrar en los poros (los cuales tienen típicamente un diámetro de 0,2 a 10 μm), cuando se efectúa la impregnación de la membrana y con ello los poros pueden estrecharse o respectivamente bloquearse, con lo que dificultan o respectivamente impiden la entrada y penetración de las grandes moléculas hidrófobas a través de la membrana.

50 Por esta razón, las estructuras de una sola capa, con membranas separadoras de la sangre, se emplean exclusivamente para la detección de pequeños analitos que se disuelven bien en el agua (por ejemplo la glucosa).

55 Las estructuras con una membrana de dos capas, abren la posibilidad de sortear muchos problemas de las estructuras de una sola capa. En este caso, se encuentra próxima a la membrana separadora de sangre otra membrana que es la membrana de detección, de poro estrecho, que recibe el plasma de la membrana separadora de sangre, (por ejemplo la Biodyne A ó la Loprodyne = 0,2 / 0,45 μm , una membrana de nylon de la firma Pall). En este caso no es necesario ningún pigmento blanco ópticamente opaco. Por lo demás, el sistema de detección contenido en la segunda membrana no entra en contacto directo con el sistema de separación de sangre, lo cual permite, en particular en el campo de detección de lípidos, el empleo de lípidos que se disuelven bien, pero también de humectantes que actúan como hemolíticos.

60 La estructura de dos capas tiene sin embargo también las desventajas de una difícil y cara estructura de análisis. La técnica del proceso precisa de altas exigencias en el montaje automático de las tiras de análisis, puesto que en el paso del suero o respectivamente el paso del plasma desde la membrana separadora de sangre a la membrana de detección debe garantizarse un contacto lo más estrecho e ininterrumpido posible. Las desventajas inherentes al

sistema son, una lenta humectación de la estructura de ensayo, un rendimiento sangre/plasma insuficiente en comparación con la estructura de una sola capa, y una cinética más lenta condicionada por los estrechos poros de la membrana de detección.

5 En resumen, es también desventajoso en los procedimientos del estado actual de la técnica el que en particular para la detección de moléculas hidrófobas grandes, son necesarias películas de detección abiertas, con una alta proporción de sustancias de relleno, y que sin embargo, dichas películas de detección abiertas, por sí mismas no garantizan ninguna separación de los componentes de la sangre que estorban (por ejemplo, los eritrocitos, la hemoglobina) la evaluación óptica de las tiras de ensayo. Los sistemas apropiados para la separación de la sangre (películas, membranas) permiten por el contrario la penetración de grandes moléculas hidrófobas pero en todo caso la cantidad es insuficiente. En principio, para la detección de grandes moléculas hidrófobas los sistemas adecuados (como por ejemplo la combinación de napa de fibra de vidrio y película de detección abierta, o de estructuras de membranas de dos capas) sólo solucionan el problema de manera insuficiente, puesto que su producción es complicada y dificultosa y en la realización del ensayo están por debajo del óptimo (son necesarios grandes volúmenes de sangre, tienen una zona de medición limitada hacia arriba, o respectivamente tienen una cinética de reacción lenta).

Es un objetivo de la presente invención el soslayar estas desventajas. En particular, es un objetivo de la presente invención el conseguir un dispositivo de ensayo de la química seca (así como un correspondiente procedimiento de fabricación del mismo), con el cual sea posible detectar en las más pequeñas cantidades de sangre completa posibles, grandes moléculas hidrófobas, en particular de lípidos que están presentes en muestras biológicas como por ejemplo, complejos de lipoproteínas, en donde esté integrada en el dispositivo una separación de las células rojas de la sangre y en donde se logre una rápida cinética de la reacción de detección.

Esta tarea se soluciona mediante el objetivo de la invención.

El objetivo de la invención es un procedimiento según la reivindicación 1, que emplea membranas microporosas recubiertas con películas reactivas, con una relativamente alta proporción de sustancias de relleno en la película (referida sobre los formadores de película), según la reivindicación 7, así como una membrana según la invención que contiene el medio de diagnóstico según la reivindicación 9. Las versiones preferidas de la invención son el objetivo de las reivindicaciones secundarias.

El procedimiento según la invención para la aplicación de las películas reactivas con un contenido en sólidos, sobre las membranas microporosas, se caracteriza porque en primer lugar se humedece la membrana, y la película reactiva que contiene sólidos se aplica sobre la membrana todavía húmeda.

Las películas reactivas con un contenido en sólidos, son películas insolubles en agua, impermeables, que contienen en una matriz hidrófoba de formadores de película, todos o por lo menos parte de los reactivos de detección. Junto a la propia química de detección, la cual comprende típicamente las enzimas, las co-enzimas, los mediadores, los indicadores o respectivamente los sistemas indicadores, etc., las películas reactivas pueden contener formadores de película impermeables, abridores de película y eventualmente pigmentos ópticos opacos (estos últimos para disminuir la transparencia óptica), así como otros componentes ya conocidos por la persona experta en la técnica (humectantes, sustancias hinchantes, etc.).

Como sustancias abridoras de película (llamadas también "sustancias de relleno") entran en cuestión los materiales inorgánicos u orgánicos, en particular en forma de partículas. Estos abridores de película ya son conocidos por el experto. Por ejemplo, son ópticamente apropiadas como ya se ha citado al principio, las partículas inorgánicas u orgánicas nada o poco dispersas, insolubles en agua, que no se hinchan, que se humectan bien, las cuales permiten una rápida penetración también de grandes moléculas (por ejemplo lípidos en forma de lipoproteínas) e incluso de células (por ejemplo eritrocitos) en películas impermeables al agua. Como ejemplo de sustancias de relleno pueden citarse la creta, la celulosa, la tierra de diatomeas, el celatom, el Kieselgur, el ácido silícico, etc. Para los fines de la invención se han demostrado apropiados en particular, el celatomo y el Kieselgur.

Como formadores de película según la invención, entran en cuestión ante todo, polímeros orgánicos que permiten capas de reactivo impermeables, mecánicamente estables. Estos formadores de película son ya conocidos de por sí, por el experto. Por ejemplo, son apropiadas como ya se ha dicho al principio, las dispersiones de plástico propionato de vinilo, p. ej. el Profionato®, el Eudragit® (una dispersión de una resina acrílica), el Mowiol® (un alcohol polivinílico), y similares.

Según la invención, la película reactiva se aplica encima de (o recubre) una capa microporosa de soporte, la cual puede recibir también el nombre de membrana microporosa. En particular, cuando se emplea sangre completa como material de muestra, es ventajoso que la membrana presente propiedades separadoras de la sangre, es decir que retenga los componentes coloreados (a saber, los eritrocitos, la hemoglobina) de la muestra de sangre completa, produciendo así, plasma o suero a partir de sangre completa. Estas membranas ya son conocidas por el experto. Por ejemplo pueden citarse las membranas de poliéter o de polietersulfona, las cuales son preferentemente asimétricas. Como ejemplo pueden citarse las BTS SP 300 (Pall), Prime Care X ó SG (Spectral Diagnostics).

Según la invención se subraya ventajosamente que las membranas microporosas, antes del recubrimiento con la masa de recubrimiento, que deben formar la película reactiva, deben humectarse y luego recubrirse cuando están todavía en estado húmedo. Es particularmente muy importante que el recubrimiento de la película reactiva se aplique inmediatamente después de la humectación, es decir si es posible, en un paso del proceso.

En el caso de que las películas reactivas no se humecten previamente, es decir se apliquen las membranas en estado seco, se obtienen con las películas reactivas, membranas recubiertas separadoras de sangre, las cuales retienen según lo esperado, los eritrocitos. La película reactiva aplicada sobre la membrana se cubre con plasma. En principio, se puede observar también un desarrollo del color en función de la cantidad de analito. Sin embargo, las membranas secas recubiertas con películas reactivas muestran solamente resultados por debajo de lo óptimo en la investigación de muestras de sangre, en particular cuando el analito es una molécula grande o una molécula hidrófoba (CHOL, TG, HDL, etc.). En este caso, la medida del desarrollo de color de la película reactiva es claramente inferior a lo esperado.

Una aplicación de muestras de plasmas con un contenido de lípidos, directamente sobre esta película reactiva, es decir, sin que anteriormente se haya efectuado mediante la membrana, una separación de la sangre de la sangre completa, conduce por el contrario al desarrollo de color esperado. En el caso de que las mismas muestras hayan pasado previamente a través de la membrana separadora de sangre recubierta en seco, no se obtiene casi ningún desarrollo de color a pesar de la humectación garantizada de la película reactiva con el plasma. Este descubrimiento experimental hace sospechar que mediante una aplicación de la película de por sí relativamente abierta, conteniendo substancias de relleno, la permeabilidad de la membrana para grandes moléculas hidrófobas disminuirá en gran manera.

En el ejemplo de la detección de los TG, pudo mostrarse explícitamente que la permeabilidad de los productos intermedios pequeños, con buena solubilidad, aparecidos en los pasos intermedios del analito (por ejemplo, la glicerina, el H_2O_2) estaba garantizada por la unión membrana-película reactiva (es decir no pudo observarse ningún diferencia de color entre la aplicación de la muestra por encima (directamente sobre la película reactiva) y la aplicación por debajo (la muestra se aplica sobre la membrana y la atraviesa, antes de que contacte con la película reactiva)), incluso cuando la membrana se recubrió en estado seco.

Además, se observó que durante la aplicación de películas abiertas, conteniendo substancias de relleno y pigmentos, sobre membranas absorbentes no humectadas previamente, las masas de recubrimiento metastables empezaron a separarse. Los pigmentos o respectivamente los componentes de las substancias de relleno de las masas de recubrimiento se acumulaban durante el proceso de recubrimiento en la ranura de la rasqueta. Esto condujo a recubrimientos altamente no homogéneos.

Mediante la disminución del componente pigmento/substancia de relleno de la pasta de recubrimiento fue posible aplicar tasas de recubrimiento más estables y con ello películas más homogéneas sobre membranas absorbentes no previamente humectadas, pero dichas película no podían promover la permeabilidad del analito, puesto que las películas con una pequeña proporción de substancia de relleno son más bien de poros poco abiertos y con ello son menos permeables para los analitos, en particular para los analitos de molécula grande o hidrófobos.

Inesperadamente se descubrió que es posible aplicar películas reactivas metastables, conteniendo substancias sólidas, sobre membranas absorbentes sin disminuir la permeabilidad a los analitos, cuando las membranas se recubren en estado húmedo.

La técnica del procedimiento puede efectuarse ventajosamente, pasando la membrana por ejemplo en un primer paso del proceso por un baño de agua y a continuación aplicando la pasta con un contenido de sólidos, sobre la membrana todavía húmeda mediante una rasqueta o una tobera de ranura.

Un efecto secundario positivo junto al aumento de la permeabilidad aumentada del analito es la aplicación de películas claramente homogéneas, puesto que la tendencia metastable de las pastas conteniendo sólidos, de separarse durante el proceso de recubrimiento, en la utilización del membranas húmedas, disminuye claramente. Las películas más homogéneas proporcionan finalmente en la determinación de la concentración una mejor precisión en las mediciones fotométricas y con ello unos coeficientes de variación más pequeños.

Además, es posible con este procedimiento aplicar películas de poro abierto mediante el empleo de mayores proporciones de substancias de relleno en la pasta de recubrimiento sobre las membranas.

Puesto que este procedimiento minimiza claramente la penetración de los componentes de las películas reactivas durante el proceso de recubrimiento de las membranas, se abre la posibilidad debido a la mejor separación espacial de separación de la sangre (en la membrana) y la película reactiva (sobre la membrana) en una estructura de una sola capa, de añadir componentes a la película reactiva, que son beneficiosos en su conjunto para la reacción de detección (por ejemplo humectantes especiales, que disuelven bien las lipoproteínas y activan las lipasas o

respectivamente las estearasas), sin por ello causar simultáneamente una hemólisis condicionada por el humectante en la membrana separadora de sangre.

5 La humectación de la membrana tiene lugar de preferencia mediante un baño de impregnación, una impregnación mediante una boquilla de ranura, o mediante pulverización. Para la humectación de la membrana puede utilizarse agua o soluciones acuosas, que pueden contener por ejemplo tampones, humectantes (por regla general también llamados tensioactivos o detergentes), para una mejor humectación de la membrana, etc.

10 En el procedimiento según la invención, en el recubrimiento de películas reactivas, la relación entre la masa del abridor de película y el formador de película, es de 10:1 a 1:1. Particularmente las películas con una relación entre la masa del abridor de película y el formador de película de 5:1 a 2:1 han demostrado que son particularmente adecuadas. Las películas reactivas con dicha relación de masas se caracterizan por una porosidad abierta relativamente grande, que a su vez facilita o respectivamente hace posible una mayor penetración de las moléculas hidrófobas en la película reactiva. Hasta el momento no había sido posible producir tales membranas recubiertas con películas homogéneas de poros abiertos. En correspondencia, las membranas microporosas recubiertas son igualmente objeto de la presente invención.

20 La aplicación de películas reactivas tiene lugar mediante un procedimiento de por sí ya conocido, como por ejemplo el recubrimiento mediante rasqueta, la aplicación por rodillos o el recubrimiento con una boquilla de ranura.

25 Junto a las membranas recubiertas según la invención, existe otro objetivo de la presente invención, a saber, un medio de diagnóstico para la detección de sustancias contenidas en los líquidos corporales, que contiene una membrana recubierta con una película reactiva. Los líquidos corporales son a este respecto en particular, la sangre, el suero, el plasma, la orina, la saliva, el sudor, etc., de los cuales la sangre es el preferido. Los componentes a detectar son típicamente los analitos de líquidos corporales que hay que detectar, en particular moléculas grandes y/o hidrófobas como por ejemplo CHOL, TG, HDL, etc., que están presentes en la sangre en forma de complejos de lipoproteínas, pero también la fructosamina, la creatininaquinasa (CK), la glutamato-oxalato-transferasa (GOT), la glutamato-piruvato-transaminasa (GPT), la amilasa, la hemoglobina, la albúmina.

30 Es ventajoso en el objetivo de la invención que con el procedimiento según la invención es posible por primera vez aplicar películas reactivas con una alta proporción de sustancias de relleno (referidas a la cantidad del formador de película), recubriendo las membranas, con lo que se obtienen películas abiertas tan estables y homogéneas. Estas son ante todo ventajosas para la detección de analitos hidrófobos, de gran tamaño, de la sangre completa. La membrana asume la función de la separación de la sangre, retiene por lo tanto los eritrocitos y eventualmente la hemoglobina, de manera que para la subsiguiente detección analítica por métodos ópticos no existe ningún inconveniente para la coloración de la sangre. El contacto íntimo entre la membrana y la película de detección está garantizado, de manera que tiene lugar un rápido y substancialmente completo traspaso del suero/plasma a la película reactiva. Son posibles detecciones analíticas de ~~por~~ sangre completa. El procedimiento de recubrimiento es eficazmente apropiado para procesos automatizados, en particular para la fabricación de películas reactivas recubiertas sobre membranas de gran superficie, pero también en procesos en los que se obtienen rollos o cintas.

La invención se aclarará con más exactitud mediante los siguientes ejemplos y figuras.

45 La figura 1 muestra el transcurso de la medición cinética para tiras de ensayo que contienen una membrana "recubierta en húmedo", en presencia de sangre con diferentes contenidos de triglicérido (65, 207, 294, 494, y 728 mg/dl), en donde la remisión relativa (R en %) se representa en función del tiempo (t en segundos).

50 La figura 2 muestra la remisión relativa (R) para diferentes concentraciones de triglicéridos (c en mg/dl) en muestras de sangre con membranas recubiertas en seco (2) y en húmedo (1).

Las cifras y abreviaturas de las figuras tienen el siguiente significado:

- 55 1 Curva de medición para membrana recubierta en húmedo
 2 Curva de medición para membrana recubierta en seco
 R Remisión relativa
 t tiempo
 c concentración

60 Ejemplo 1. Procedimiento para la aplicación de una película reactiva sobre una membrana separadora de sangre y el correspondiente dispositivo de ensayo para la detección de los triglicéridos de la sangre completa.

1. Obtención de la masa de recubrimiento

65 a.) Solución de Gantrez:

A 58,5 g de un tampón de fosfato 85 milimolar (7,5) se añaden 35,5 g de agua. Después de la adición de 1,7 g de MgSO₄ se añaden 5,2 g de Gantrez S 97 (copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico, de la firma GAF Corporation Chemical Division) en pequeñas porciones y se agita durante 3 horas hasta el completo hinchamiento del Gantrez. A continuación se añaden 4,5 g de una solución al 32% de NaOH, y después de 30 minutos de agitación se espolvorean 0,6 g de PVP (polivinilpirrolidona 25.000) y se agita de nuevo durante 20 minutos hasta la completa disolución. A continuación se ajusta el valor del pH de la masa de la mezcla con NaOH al 32% hasta un valor de 6,7 - 7, 0.

b.) Solución de Simperonic:

En 5,3 g de agua se disuelve en un período de 20 minutos de agitación, 1,3 g de Simperonic F68 (polioxietileno-co-oxipropileno, de la firma ICI).

c.) A la solución de Gantrez descrita en a.), se añaden 17,0 g de Propiofan 70 D (dispersión polimérica al 50% de propionato de vinilo en agua, desmonomerizada, de la firma BASF Ludwigshafen), y después de 30 minutos de agitación se añaden 26,5 g de Celatom MW 25 (Kieselgur, CHEMAG) en el intervalo de 10 minutos, y se agitan otros 20 minutos más. A continuación se añaden a la mezcla, 6,6 g de la solución de Symperonic descrita en b.) y se agita de nuevo durante 10 minutos.

d.) Solución de Refloblau

En 23,3 g de agua calentada a 35 °C, se disuelven 1,7 g de Refloblau, dihidrocloruro de (4- (4-dimetilaminofenil)-5-metil-2-(3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil)-imidazol, de la firma Roche Diagnostics), en ausencia de luz durante 15 minutos de agitación con agitador magnético.

e.) Mezcla parcial de dióxido de titanio/Refloblau

En ausencia de luz, se esparcen 22,5 g de un tampón 85 mmolar de tampón de fosfato (pH 7,5) y 4,3 g de TiO₂ (RN 56, de Kronos Titan), mediante el empleo de un agitador de disolución a 450 rpm en el intervalo de 5 minutos, y se agita durante otros 5 minutos más. A continuación se añaden a la suspensión de TiO₂ en el intervalo de 5 minutos, 25 g de la solución de Refloblau preparada en d.), y se agita todavía durante 30 minutos más. A continuación se guarda la mezcla parcial TiO₂/Refloblau hasta su utilización, en una nevera en ausencia de luz.

f.) Solución de ATP

Se disuelven 1,7 g de ATP (adenosintrifosfato; sal disódica) en 3,3 g de agua

g.) Solución de DONS

Se disuelven 1,3 g de Dons (sulfosuccinato de dioctilo sódico) en 5,3 g de acetona.

h.) Solución de MPSC

Se disuelven 0,03 g de MPSC (metilfenilsemicarbazida) en 0,6 g de 1-metoxi-2-propanol en ausencia de luz.

i.) Solución de enzima

En 15,9 g de un tampón de fosfato 85 milimolar (pH 7,5) se disuelven una después de otra las siguientes enzimas (presentes en forma liofilizada), en donde las correspondientes pesadas de las enzimas están en función de la actividad específica de la carga de enzima empleada:

40 kilounidades (aproximadamente 1,8 g) de glicero-quinasa (EC 2.7.1.30, de Bacillus stearothermophilus; de la firma Roche Diagnostics, nº de catálogo 0 717 398)

34 kilounidades (aproximadamente 2,4 g) de colesterol-esterasa (EC 3.1.1.13, de Candida cylindracea; de la firma Roche Diagnostics, nº de catálogo 0 129 046)

28,9 kilounidades (aproximadamente 0,12 g) de peroxidasa (EC 1. 11. 1. 7, de rábano picante; de la firma Roche Diagnostics, nº de catálogo 0 121 606)

27,8 kilounidades (aproximadamente 0,44 g) de L-α-glicerolfosfato-oxidasa (EC 1.1.3.21; recombinante; de la firma Roche Diagnostics, nº de catálogo 1 582 003)

j.) A la mezcla Gantrez/Propiofan/Celatom de c.) se añaden a continuación las siguientes mezclas parciales en agitación:

6,6 g de la solución de DONS, de g.)
 5,0 g de la solución de ATP, de f.)
 51,8 g de la suspensión de TiO₂/Refloblau, de e.)
 7,0 g de agua para enjuagar la suspensión de TiO₂/Refloblau
 11,8 g de Celatom MW 25
 0,63 g de solución de MPSC, de h.)
 20,66 g de solución de enzima, de i.)
 2,2 g de tampón de fosfato 85 mmolar para el enjuague de la solución de enzima

Después de la adición de cada solución parcial (con excepción del Celatom) se agita la mezcla durante 5 minutos. El Celatom se espolvorea durante un intervalo de 15 minutos en pequeñas porciones, y la mezcla se agita a continuación durante otros 20 minutos.

La mezcla total (aproximadamente 250 g) se centrifuga a continuación para eliminar el aire durante 20 minutos a 300 g, y a continuación, las partes sólidas desplazadas eventualmente por la centrifugación se recogen y resuspenden agitando lentamente a mano mediante una escobilla de goma.

A continuación, la masa de recubrimiento se pasa por un tamiz de ensayo de 140 µm y se homogeneiza todavía durante 10 minutos mediante suave agitación.

La masa de recubrimiento tiene la composición que figura en la tabla 1.

Tabla 1: composición de la masa de recubrimiento	Absoluto	Contenido en sólidos
Gantrez S97 (como espesante de la película/agente hinchante)	5,2	5,2
PVP (polivinilpirrolidona)	0,6 g	0,6 g
Dispersión del Propiofan (al 50% en agua) como formador de película	17 g	8,5 g
Celatom (como abridor de película)	38,3 g	38,3 g
TiO ₂ RN56 (como pigmento de color blanco)	4,3 g	4,3 g
MgSO ₄	1,7 g	1,7 g
Refloblau	1,7 g	1,7 g
Metilfenilsemicarbazida	0,03 g	0,03 g
ATP (di sal de sodio)	1,7 g	1,7 g
Symperonic F68	1,3 g	1,3 g
DONS (dioctilsulfosuccinato de sodio)	1,3 g	1,3 g
Glicero-quinasa	40 KU	1,8 g
Colesterol-oxidasa	34 KU	2,4 g
Peroxidasa	28,9 KU	0,12 g
L-α-glicerofosfato-oxidasa	27,8 KU	0,44 g
Acetona	5,3 g	---
1-metoxi-2-propanol	0,6 g	---
NaOH (al 32%)	4,5 g	1,4 g
Agua destilada	152,9	---
Suma	241,2	70,8

El contenido en sólidos de la pasta de recubrimiento es del 29%. La proporción de sólidos en tanto por ciento del formador de película (Propiofan) referido a la proporción de sólidos total es del 12%. La proporción de sólidos en tanto por ciento del abridor de película (Celatom) referido a la proporción de sólidos total es del 54%. La relación entre el abridor de película y el formador de película es de 4,5: 1.

2. Aplicación de la película reactiva sobre una membrana separadora de sangre

Mediante el procedimiento descrito a continuación se recubre una membrana separadora de sangre (del tipo BTS-SP-300; artículo nº 955 00 12 0953 referido a la firma Pall GmbH/63303 Dreieich), con la masa de recubrimiento obtenida en el punto 1.) para la generación de una película reactiva.

a) Un trozo de membrana de aproximadamente 1 metro de longitud (BTS-SP-300) se pasa en primer lugar por una tina de acero inoxidable llena de agua, y a continuación, el agua sobrante que permanece sobre la superficie de la membrana se elimina utilizando un raspador de goma. Sobre la membrana todavía húmeda se deposita la masa de recubrimiento de 1.) a una velocidad de avance de 1,5 m/minuto y una rasqueta de ranura de 150 µm.

La membrana recubierta de esta manera (a continuación denominada "membrana recubierta en húmedo") se seca a continuación durante 5 minutos a 50 °C.

A continuación se corta la membrana con un eje de cuchillas, en rollos de corte fino de 4,0 mm de ancho. Los rollos de corte fino se guardan secos hasta la próxima utilización.

b) De manera similar, se recubre un segundo trozo de BTS-SP-300 con la idéntica masa de recubrimiento, sin que la membrana se pase por una tina de acero inoxidable llena de agua (a continuación denominada "membrana recubierta en seco").

5 **3. Obtención de muestras funcionales de tiras de ensayo para la detección de los TG de una sangre completa**

10 Sobre una lámina soporte de 5 mm de ancho y 78 mm de largo (Melinex) se adhiere una lámina de poliéster de aproximadamente 200 µm de grueso recubierta por ambas caras con una cinta adhesiva de dos caras (llamada capa espaciadora) de la cual se había cortado previamente con ayuda de un trazador de corte (del tipo Aristomat 1310 de la Firma ARISTO Graphic Systeme; 22525 de Hamburgo) a una distancia de 5,0 mm y 1,5 mm de ancho, los capilares que corren a lo largo de las tiras de ensayo (longitud de los capilares 35 mm) mediante un corte "kiss cut" ("beso de corte"). Sobre esta capa capilar espaciadora se adhiere una red de poliéster de 5 mm x 25 mm (tipo Petex 07-98/34 de la firma Sefar / CH-9410 Heiden) con un ancho de malla de 250 µm para, por una parte limitar los capilares por encima y por otra parte garantizar el paso de la sangre de las muestras desde los capilares a las zonas de detección analítica que están encima.

20 La "Scrynellnetz" ("red de selección") está situada sobre la capa espaciadora, de forma que los primeros 5 mm de los capilares de la red no están recubiertos por lo cual pueden ser utilizados como zona de aplicación de las muestras.

25 Por encima de la "Scrynellnetz" ("red de selección") se encuentra la membrana fijada lateralmente mediante dos protuberancias de adhesivo por fusión, según el procedimiento descrito en el punto 2 con la membrana separadora de sangre recubierta con la película reactiva (cara de la membrana separadora de sangre sin recubrir, hacia abajo; película reactiva, hacia arriba).

La estructura de la muestra funcional de las tiras de ensayo es comparable con las tiras de ensayo descritas en el ejemplo 1 y figura 1 de la solicitud de EP nº 04 023 734 (de fecha 5.10.2004).

30 **4. Evaluación de la muestra funcional con sangre con un contenido de triglicéridos**

35 Sobre las muestras funcionales de tiras de ensayo se aplican 25 µl de sangre en la zona de aplicación de la muestra (zona capilar antes de la "Scrynellnetz" ("red de selección")). Las muestras se miden desde arriba mediante fotometría de reflexión durante un espacio de tiempo de 3 minutos en intervalos de 10 segundos, con una estructura de medición con un LED de la longitud de onda del centro de gravedad de 660 nm (cara de la película reactiva de la membrana).

El transcurso de la medición se describe a continuación:

40 Antes de la aplicación de la muestra se mide una vez la tira de ensayo en ausencia de luz ambiental, para determinar la efectividad de la correspondiente película reactiva sin reaccionar. Este valor llamado "ciego" de la tira de ensayo se emplea para la siguiente medición cinética en presencia del material de muestra como el 100% de la remisión (R) relativa.

45 Después de la aplicación de 25 µl de sangre, empieza inmediatamente la medición cinética. Las reflectividades obtenidas en el modo cinético se dividen por el correspondiente valor "ciego" de la tira de ensayo, y el valor obtenido se traslada a la gráfica de la remisión relativa (R en %) respecto al tiempo de medición.

50 La figura 1 muestra el transcurso de la medición cinética obtenida para una tira de ensayo (conteniendo una "membrana recubierta en húmedo") en presencia de sangre con diferentes contenidos de triglicéridos (65, 207, 294, 494 y 728 mg/dl).

55 Como puede deducirse del transcurso de la curva de la medición cinética, la formación de color de la película reactiva alcanza dentro del tiempo de medición escogido en función de la concentración una remisión mínima (máxima intensidad de color), en donde esta remisión mínima se escoge a continuación como la medida de la concentración del analito en la muestra.

60 En la siguiente tabla 2 están relacionados las remisiones mínimas relativas (en %) para una membrana con idéntica película reactiva "recubierta en húmedo" y "recubierta en seco" BTS-SP-300 , con diferentes contenidos crecientes de triglicéridos en la sangre

Tabla 2

Contenido de triglicéridos en la muestra de sangre	% de remisión relativa (en el mínimo)	
	Membrana "recubierta en húmedo"	Membrana "recubierta en seco"
65 mg/dl	74,7%	81,6%
76 mg/dl	71,7%	81,5%
100 mg/dl	69,4%	81,3%
105 mg/dl	68,7%	77,7%
142 mg/dl	63,5%	77,3%
154 mg/dl	63,1%	77,8%
207 mg/dl	59,0%	75,7%
217 mg/dl	56,9%	72,6%
265 mg/dl	52,6%	72,3%
294 mg/dl	49,7%	70,3%
326 mg/dl	48,8%	71,5%
384 mg/dl	47,3%	68,6%
494 mg/dl	44,2%	64,3%
728 mg/dl	36,1%	57,5%
Variación total de la remisión	38,6%	24,1%

5 Como se desprende de la tabla 2, las muestras funcionales con la membrana "recubierta en húmedo" proporcionan claramente más color (un valor menor de la remisión) durante todo el tiempo de la medición, que la membrana "recubierta en seco" con idéntica película reactiva.

10 Se desprende además de los valores de medición que el valor de la remisión durante todo el tiempo de la medición (es decir la diferencia de las remisiones relativas para la concentración de triglicéridos de 65 mg/dl y 728 mg/dl) para la membrana "recubierta en húmedo" con 38,6% de REM es claramente mayor que el valor de la remisión de la membrana "recubierta en seco" con 24,1% de REM (ver para ello también el curso de la gráfica representada en la figura 2, en donde 1 representa la curva de medición para la membrana recubierta en húmedo, 2 representa la curva de medición para la membrana recubierta en seco).

15 Debido a la variación de la remisión claramente mayor en la membrana "recubierta en húmedo", se producen oscilaciones de la remisión entre una medida y otra medida con una oscilación de la concentración claramente menor, con lo cual es evidente una mayor precisión de la muestra funcional.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la aplicación de películas reactivas con un contenido en sólidos sobre membranas separadoras de la sangre, microporosas, absorbentes, en donde la película reactiva con un contenido en sólidos es una película impermeable, insoluble en agua, la cual contiene en una matriz hidrófoba de formadores de película, todos o por lo menos parte, de los reactivos de detección para el analito que se va a analizar, y presenta una alta proporción de abridores de película, referida a la cantidad de formadores de película, **caracterizado porque**, los abridores de película son partículas inorgánicas u orgánicas, finas, que se humectan bien, que no se hinchan, insolubles en agua y que ópticamente no están o están muy poco dispersadas, las cuales hacen posible la rápida penetración también de grandes moléculas o células en las películas reactivas con un contenido en sólidos, y las cuales están en una relación entre la masa de abridores de película y la masa de los formadores de película, de 10:1 a 1:1 en la película reactiva, y la membrana se humecta en primer lugar con agua o una solución acuosa, y la película reactiva con un contenido en sólidos se aplica sobre la membrana todavía húmeda.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque**, la película reactiva contiene formadores de película, abridores de película en forma de partículas inorgánicas u orgánicas, y eventualmente pigmentos que forman una barrera óptica.
- 20 3. Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizado porque**, la película reactiva se aplica inmediatamente sobre la membrana después de la humectación de la película.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque**, la humectación de la membrana tiene lugar mediante inmersión en una tina.
- 25 5. Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizado porque**, el agua o la solución acuosa contiene un humectante.
- 30 6. Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizado porque**, la aplicación de la película reactiva se efectúa mediante un recubrimiento con rasqueta o mediante un recubrimiento con una boquilla con ranura.
- 35 7. Membrana separadora de la sangre, microporosa, absorbente, la cual está recubierta con una película reactiva con un contenido en sólidos, en donde la película reactiva con un contenido en sólidos es una película impermeable, insoluble en agua, la cual contiene en una matriz hidrófoba de formadores de película, todos o por lo menos parte, de los reactivos de detección para un analito que se va a detectar, la cual es ópticamente no dispersante o poco dispersante, insoluble en agua, no se hincha, se humecta bien, fina, partículas inorgánicas u orgánicas, y la cual permite la rápida penetración también de grandes moléculas o células en la película con un contenido de sólidos, **caracterizada porque**, la relación de masas entre los abridores de película y los formadores de película es de 10:1 a 1:1.
- 40 8. Membrana según la reivindicación 7, **caracterizada porque**, la relación de masas entre los abridores de película y los formadores de película es de 5:1 a 2:1.
- 45 9. Agente de diagnóstico para la detección de componentes de líquidos corporales, el cual contiene una membrana recubierta con una película reactiva según una de las reivindicaciones 7 a 8.

Fig. 1

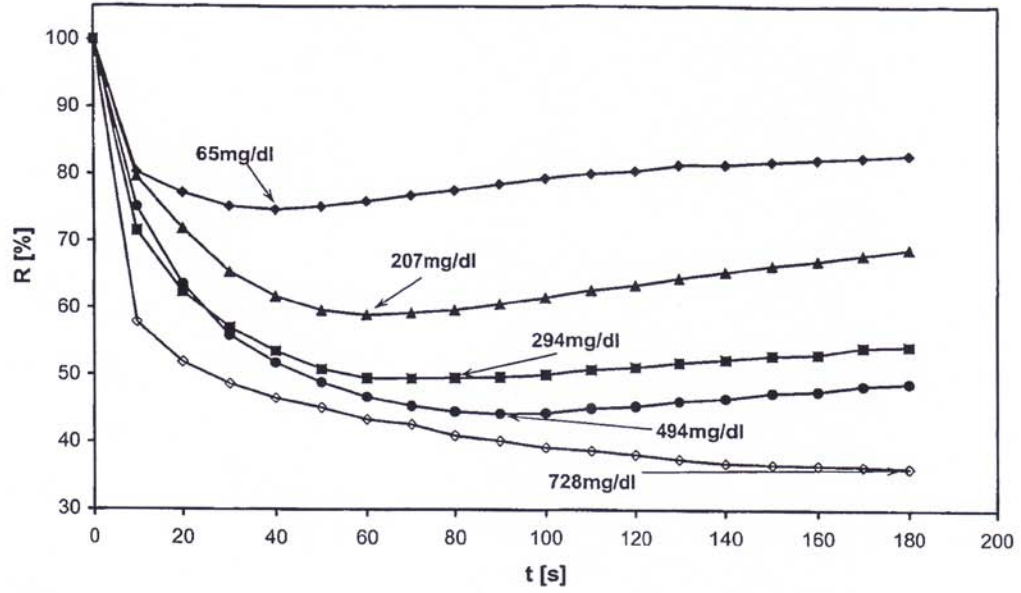


Fig. 2

