

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 743**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C09D 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10250819 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2246439**

54 Título: **Tiras de ensayo analítico**

30 Prioridad:

**24.04.2009 US 429405**

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

**11.11.2013**

73 Titular/es:

**LIFESCAN SCOTLAND LIMITED (100.0%)  
Beechwood Park North Inverness  
Inverness-shire IV2 3ED, GB**

72 Inventor/es:

**CARDOSI, MARCO F y  
O'CONNELL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 428 743 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Tiras de ensayo analítico.

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION****Campo de la Invención**

10 La presente invención se relaciona, en general, con tintas de reagente y, en particular, con tiras de ensayo analítico relacionadas.

**Descripción de Técnica Relacionada**

15 El uso de tintas de reagente enzimático en tiras de ensayo analítico ha experimentado una extendida explotación comercial. Por ejemplo, las tintas de reagente enzimático se han empleado en tiras de ensayo analítico con base electroquímica para la determinación de glucosa en sangre total. Tales tintas de reagente enzimático y tiras de ensayo analítico se han descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 7.465.380; 7.462.265; 7.291.256; 7.112.265; 5.708.247; 7.250.105; la publicación pre-concedida de Estados Unidos nº 2004/0026243; y la publicación internacional nº WO2004039600. La explotación comercial de tintas de reagente enzimático ha llevado como consecuencia a un mayor interés en los métodos usados para fabricar tales tintas.

25 US2006/0260940A1 describe una tira de ensayo de glucosa desechable. Una capa de separación reagente/sangre integrada no conductora contiene un relleno, una enzima efectiva para oxidar glucosa, y un mediador efectivo para transferir electrones de la enzima. El relleno puede ser una sílice hidrofóbica donde durante el proceso de fabricación, las partículas se rompen por homogenización.

30 WO2006/096619A2 describe una composición de reagente que contiene GDH-PQQ como un co-factor de enzima. Una composición preferente incluye polímeros hidrofílicos, sílice hidrofílica no tratada amorfa, tampones, surfactantes, y un mediador.

35 US2006/0226008 describe una tinta conductora miscible con agua que incorpora un agente modificador de reología, tal como humo de sílice hidrofílica o humo de sílice hidrofóbica.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

35 La presente invención se define de la siguiente manera en la reivindicación 1:

Una tira de ensayo analítico que comprende:

40 un sustrato; y  
una capa de reagente dispuesta sobre una parte del sustrato, incluyendo la capa de reagente una tinta de reagente enzimático que comprende:  
una cantidad de material de sílice hidrofóbica;  
una cantidad de surfactante; y  
45 una cantidad de enzima,

donde las cantidad del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en la tinta de reagente enzimático se predeterminan usando:

50 una primera relación entre mojabilidad de un material de sílice hidrofóbica representativo y al menos una primera curva de calibrado o intercepción de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta de reagente enzimático que contiene el material de sílice hidrofóbica representativo, definiendo la primera relación una mojabilidad mínima que proporciona una primera curva de calibrado o intercepción aceptable que proporciona una determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés; y  
55 una segunda relación que define la mojabilidad de una mezcla del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en una variedad de cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante,

60 de tal manera que las cantidades del material de sílice hidrofóbica y el surfactante proporcionen al menos la mojabilidad mínima definida por la primera relación durante la fabricación del tinte de reagente enzimático. En las reivindicaciones dependientes se definen más realizaciones.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

65 Las características nuevas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención con referencia a la

siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos acompañantes, de los que:

5 La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa fases en un proceso para la fabricación de una tinta de reagente enzimático adecuado para su uso con una realización de la presente invención;

10 La FIG. 2 es un gráfico que representa una relación entre mojabilidad (medida como altura de capa de gel (mm) en una solución 30% metanol y agua) de un material de sílice hidrofóbica representativo y una característica de calibrado (es decir, curva de calibrado) de una tira de ensayo analítico con base electroquímica que emplea una tinta de reagente enzimático que comprende el material de sílice hidrofílica representativo.

15 La FIG. 3 es un gráfico de barras de mojabilidad (medida como volumen de gel en una solución 30% metanol) de una mezcla de un material de sílice hidrofóbica particular (es decir, H18) y un surfactante particular (es decir, Tergitol) en una variedad de cantidades relativas de H18 y Tergitol representadas como un porcentaje Tergitol v/v;

20 La FIG. 4 es un gráfico de barras de mojabilidad (medida como volumen de gel en una solución 30% metanol) para mezclas de un material de sílice hidrofóbica particular (es decir, Cab-o-Sil) con una variedad de surfactantes particulares, todos en concentraciones relativas de 0,1% v/v;

25 La FIG. 5 es un gráfico de curva de calibrado contra porcentaje surfactante (v/v) para una tira de reagente enzimático que comprende material de sílice hidrofóbica Cab-o-Sil y surfactante Tergitol;

La FIG. 6 es una vista en perspectiva en despiece simplificada de una tira de ensayo analítico de acuerdo con una realización de la presente invención; y

30 La FIG. 7 es un gráfico que representa una relación entre volumen de gel y altura de gel como puede emplearse en el uso de altura y volumen de gel como una medida de mojabilidad en métodos descritos en el presente documento.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONESE ILUSTRATIVAS

35 La siguiente descripción detallada debería leerse con referencia a los dibujos. Los dibujos representan realizaciones ejemplares con el único fin explicativo y no pretenden limitar el alcance de la invención. La descripción detallada ilustra a modo de ejemplo, no a modo de limitación, los principios de la invención. Esta descripción permitirá claramente a un experto en la técnica hacer y usar la invención, y describe varias realizaciones, adaptaciones, alternativas y usos de la invención, incluyendo lo que en el presente se cree que es el mejor modo de realizar la invención.

40 La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa fases en un proceso 100 para la fabricación de una tinta de reagente enzimático (tal como tinta de reagente enzimático imprimible en una pantalla con una viscosidad en el rango de 36.000 a 48.000 cP) para su uso en tiras de ensayo analítico de acuerdo con una realización de la presente invención. Las tintas de reagente enzimático fabricadas de acuerdo con el método 100 pueden usarse, por ejemplo, en tiras de ensayo analítico con base electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en muestras de sangre total. Tales tiras de ensayo analítico con base electroquímica se describen, con respecto a tintas de reagente convencionales, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.120.420; 5.288.636; 5.628.890; y 6.461.496.

50 Además, una tira de ensayo analítico de acuerdo con una realización de la presente invención que emplea una tinta de reagente enzimático está representada en la FIG. 6 y se describe en la exposición relacionada más abajo. Sin embargo, una vez considerado por la presente divulgación, un experto en la técnica puede emplear métodos descritos en el presente documento para fabricar tintas de reagente enzimático para cualquier tipo adecuado de tira de ensayo analítico.

55 El proceso 100 incluye determinar una primera relación entre la mojabilidad de un material de sílice hidrofóbica representativo (por ejemplo, un material de humo de sílice hidrofóbica) y al menos una primera característica de calibrado (una curva de calibrado y/o una intercepción de calibrado) de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta de reagente enzimático que contienen el material de sílice hidrofóbica representativo (véase etapa 110 de la FIG. 1). Además, la primera relación así determinada define una mojabilidad mínima que proporciona una primera característica de calibrado aceptable. Un experto en la técnica reconocerá que una característica de calibrado "aceptable" se refiere a características que proporcionan una determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés (por ejemplo, glucosa).

65 La FIG. 2 es un gráfico que representa tal primera relación entre mojabilidad de un material de sílice hidrofóbica representativo disponible en el mercado bajo el nombre comercial Cab-o-Sil (Cabot Corp, Billerica, Massachusetts,

USA) y la curva de calibrado de tiras de ensayo analítico con base electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en sangre que utilizan tinta de reagente enzimático que contiene el material de sílice hidrofóbica representativo. En la FIG. 2, la mojabilidad se mide como una altura de capa de gel por el procedimiento descrito más abajo. Para la configuración de la tira de ensayo analítico empleada para generar la FIG. 2, una curva de calibrado aceptable es una curva de calibrado superior a aproximadamente 0,017 uA/mg/dL y está indicada en la FIG. 2 por la línea horizontal discontinua.

La primera relación derivada para un material de sílice hidrofóbica representativo (tal como Cab-o-Sil) ha resultado ser inesperadamente beneficiosa para métodos que emplean un material de sílice hidrofóbica particular diferente (es decir, no idéntico) en etapas posteriores. Por ejemplo, cuando el material de sílice hidrofóbica representativo es Cab-o-Sil TS610, la primera relación puede emplearse incluso cuando la determinación de una segunda relación y etapas combinantes (descritas con más detalle más abajo) usan los materiales de sílice hidrofóbicas disponibles en el mercado H15, H18 (ambos disponibles en Wacker Chemie AG, Stuttgart, Alemania), o Aerosil (disponible en Evonik Degussa LTD, Düsseldorf, Alemania). Por lo tanto, los métodos descritos en el presente documento son simples y fáciles de usar con una amplia variedad de materiales de sílice hidrofóbica que incluyen, por ejemplo, materiales de humo de sílice.

La FIG. 2 indica claramente que la curva de calibrado es una función lineal de la mojabilidad del material de sílice hidrofóbica (como lo representa la línea sólida lineal). Debería señalarse que se emplearon varios lotes de fabricación del material de sílice hidrofóbica representativo para generar la FIG. 2. Tal variabilidad de lote a lote en la mojabilidad del material de sílice hidrofóbica da como resultado una tinta de reagente enzimático con características aceptables de calibrado (tal como un curva superior a 0,017 en la FIG. 2) para ciertos lotes o características inaceptables (es decir, una curva menor de 0,017 en la FIG. 2) para otros lotes cuando se emplean técnicas de fabricación convencionales. Sin embargo, los métodos descritos en el presente documento permiten beneficiosamente el uso exitoso de una amplia variedad de materiales de sílice hidrofóbica mientras suministran variabilidad de lote a lote en los materiales de sílice hidrofóbica.

Una vez considerado por la presente divulgación, un experto en la técnica reconocerá que medios adecuados para determinar la mojabilidad diferentes a la altura de capa de gel o volumen de capa de gel pueden emplearse en métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden emplearse técnicas espectroscópicas para medir la mojabilidad. Además, pueden emplearse otros materiales de sílice hidrofóbica representativos adecuados y pueden emplearse otras características de calibrado (tal como intercepción de calibrado) en realizaciones de la presente invención.

En la etapa 120 de la FIG. 1, el proceso 100 incluye la determinación de una segunda relación que define la mojabilidad de una mezcla de un material de sílice hidrofóbica particular y un surfactante particular en una variedad de cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica particular y el surfactante particular.

Como se ha señalado anteriormente, el material de sílice hidrofóbica particular puede ser el mismo que el material hidrofóbico representativo empleado en la etapa 110 o un material de sílice hidrofóbica diferente (es decir, no idéntico). Ejemplos de materiales de sílice hidrofóbica que pueden emplearse en métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, los materiales de sílice hidrofóbica disponibles en el mercado H15 y H18 (Wacker Chemie AG, Stuttgart, Alemania; una sílice sintética, hidrofóbica y amorfa producida mediante hidrólisis con llama) y el material de sílice hidrofóbica disponible en el mercado Aerosil (Evonik Degussa LTD, Düsseldorf, Alemania). Cab-o-Sil, H15 y H18 son ejemplos de materiales de humo de sílice, también conocidos como sílices pirogénicas.

La FIG. 3 es un gráfico de barras de mojabilidad (medida como volumen de gel en una solución 30% metanol) de una mezcla de un material de sílice particularmente hidrofóbico (es decir, H18) y un surfactante particular (es decir, Tergitol) en una variedad de cantidades relativas de H18 y Tergitol representadas como porcentaje Tergitol v/v. La FIG. 3, por lo tanto, sirve para ilustrar una segunda relación ejemplar entre mojabilidad de una mezcla de una sílice hidrofóbica particular (es decir, H18) y un surfactante particular (Tergitol) y cantidades relativas del material de sílice hidrofóbico particular y surfactante particular en la mezcla. Debería señalarse que en la FIG. 3, la nota v/v se refiere a la proporción volumétrica de surfactante en 8 ml de solución metanol-agua con el surfactante estando presente en un peso constante de 0,1 g (véase la descripción del procedimiento de mojabilidad más abajo).

Se ha determinado que los surfactantes no iónicos son particularmente adecuados para su uso en métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la FIG. 4 es un gráfico de barras de mojabilidad (medida como volumen de gel en una solución 30% metanol) para mezclas de un material de sílice hidrofóbica particular (es decir, Cab-o-Sil) con una variedad de surfactantes, todos en concentraciones relativas de 0,1% v/v. La línea horizontal discontinua de la FIG. 3 indica la mojabilidad mínima requerida para proporcionar una característica aceptable de calibrado (tal como curva de calibrado y/o intercepción de calibrado). En la FIG. 4, la nota v/v de nuevo se refiere a la proporción volumétrica de surfactante en 8 ml de solución metanol-agua con el surfactante estando presente en un peso constante de 0,1 g (véase la descripción del procedimiento de mojabilidad más abajo).

El grupo de control de la FIG. 4 no tuvo surfactante añadido y una mojabilidad que es insuficiente para proporcionar una característica aceptable de calibrado. La FIG. 4 ilustra que la adición de varios surfactantes causa

un aumento en la mojabilidad del material de sílice hidrofóbica hasta alcances variables. Tergitol e Igepal, cuando se añaden a la concentración final de 0,1% v/v dan como resultado el mayor aumento en mojabilidad. Niaproof (un surfactante iónico) da como resultados solamente un aumento marginal en mojabilidad.

5 Tanto Igepal como Tergitol son surfactantes (no iónicos) que contienen anillo aromático de éter de poliglicol. Tales surfactantes no iónicos parecen ser los reagentes más adecuados para conseguir la máxima mojabilidad. Triton X 100 es un surfactante (no iónico) de polietilenglicol tert-octilfenil éter. Esta clase de surfactantes no mejora la mojabilidad hasta el mismo alcance que Igepal o Tergitol pero pueden ser adecuados para su uso en métodos descritos en el presente documento. Niaproof, sodio 7-etil-2-metil-4-undecil sulfato, es un surfactante aniónico y dio como resultados el menor aumento de mojabilidad cuando se empleó en 0,1% v/v.

15 Cuando se comparan las FIGs. 3 y 4, debería señalarse que H18 es un material de sílice extremadamente hidrofóbico y, por lo tanto, se necesitan mayores cantidades relativas de surfactante para aumentar la mojabilidad hasta el alcance necesario para conseguir una característica aceptable de calibración en comparación con Cab-o-Sil. Sin embargo, incluso un material de sílice extremadamente hidrofóbico tal como H18 puede resultar adecuado para su uso en tintas de reagente enzimático mediante métodos descritos en el presente documento.

20 En referencia de nuevo a la FIG. 1, en la etapa 130 del proceso 100 una cantidad de material de sílice hidrofóbica particular, una cantidad de surfactante particular, y una cantidad de enzima se combinan para formar una tinta de reagente enzimático. Además, las cantidades del material de sílice hidrofóbica particular y el surfactante particular se predeterminan en base a la segunda relación para proporcionar al menos la mínima mojabilidad definida por la primera relación y, por lo tanto, una característica aceptable y predeterminada de calibrado. Por ejemplo, la cantidad de surfactante puede predeterminarse de tal manera que su concentración sea apropiada para proporcionar la mojabilidad deseada de la cantidad de material de sílice hidrofóbica durante la etapa de combinación mientras se fabrica una tinta de reagente enzimático y, de este modo, una característica aceptable y predeterminada de calibrado.

30 Los métodos descritos en el presente documento son beneficiosos porque permiten el uso rápido de materiales de silicio hidrofóbico en tintas de reagente enzimático aunque la naturaleza hidrofóbica de los materiales hidrofóbicos excluya normalmente su uso. En otras palabras, los materiales de sílice que son demasiado hidrofóbicos para un uso rápido se hacen adecuados para su uso incorporando una cantidad de surfactante que se determina mediante la primera y segunda relación descritas en el presente documento. Por ejemplo, la FIG. 4 indica que el lote de control de material de sílice hidrofóbica Cab-o-Sil es demasiado hidrofóbico para un uso exitoso en una tinta de reagente enzimático. Sin embargo, la incorporación de Tergitol en una cantidad aproximadamente de 0,1% (v/v) (es decir, en una concentración volumétrica de 0,1% durante la etapa de combinación) da como resultado el material de sílice hidrofóbica adecuado para su uso sin procesos de fabricación costosos o que consumen mucho tiempo. Esta conclusión se apoya en los datos de la FIG. 5 que ilustra que la adición de Tergitol a Cab-o-Sil permite una curva adecuada de calibrado (es decir, una curva de calibrado superior a 0,017) mientras la ausencia de surfactante dio como resultado una curva inaceptable de calibrado (es decir, una curva de calibrado inferior a 0,017). En este aspecto, debería señalarse que en la FIG. 5, el % v/v Tergitol es un porcentaje volumétrico basado en la adición de Tergitol a una solución tampón antes de la combinación con Cab-o-Sil (véase la sección más debajo de Preparación de Tinta de Reagente Enzimático).

45 Se conjetura sin quedar ligado, que la combinación de un material de sílice hidrofóbica y un surfactante en cantidades por realizaciones de la presente invención produce una capa de reagente sobre tiras de ensayo analítico con una estructura adecuadamente abierta (porosidad) y/o densidad que da como resultado características aceptables de calibración. Aunque tal densidad y porosidad pueden controlarse hasta tal alcance aumentando varios tiempos de mezcla durante la preparación de tinta enzimática, tales aumentos pueden llevar a un calentamiento degradador y extensos tiempos y costes de preparación.

50 Además, los resultados experimentales indican que la inclusión de surfactante de acuerdo con realizaciones de la presente invención no afecta negativamente a la funcionalidad de la tira de ensayo analítico. Por ejemplo, no se encontraron efectos adversos con respecto a los compuestos obstructores potenciales, tales como L-Dopamina, ácido úrico, ácido ascórbico, paracetamol (acetaminofeno) y ácido genticónico y la estabilidad de la tira de ensayo analítico fue idéntica a la de las tiras de ensayo analítico que no contenían surfactante.

60 La primera y segunda relación descritas en el presente documento pueden determinarse usando un equipo sencillo de laboratorio. Los métodos descritos en el presente documento son, por lo tanto, beneficiosamente baratos. Además, ya que los métodos emplean materiales de sílice hidrofóbica simples (tales como materiales de humo de sílice), obvian la necesidad de emplear materiales de sílice sofisticados con propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas.

65 Una tinta de reagente enzimático adecuada para realizaciones de la presente invención incluye una cantidad de material hidrofóbico (por ejemplo, una cantidad de un material de humo de sílice), una cantidad de surfactante (tal como un surfactante no iónico); y una cantidad de enzima (por ejemplo, glucosa oxidasa). Las cantidades del material de sílice hidrofóbica y el surfactante presente en la tinta de reagente enzimático se predeterminan en base a la primera y segunda relación. La primera relación es una relación entre mojabilidad de un material de sílice

hidrofóbica representativo y una primera característica de calibrado de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta de reagente enzimático que contienen el material de sílice hidrofóbica representativo. Además, tal primera relación define una mojabilidad mínima que proporciona una primera característica aceptable de calibrado. La segunda relación es una relación que define la mojabilidad de una mezcla del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en una variedad de cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante. Las cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en la tinta de agente enzimático se predeterminan para proporcionar al menos la mojabilidad mínima definida por la primera relación, y por lo tanto, una primera característica aceptable de calibrado.

Una vez considerado por la divulgación, un experto en la técnica reconocerá que las tintas de reagente enzimático adecuadas para la presente invención son aquellas tintas que están fabricadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, los componentes, características y beneficios descritos en el presente documento con respecto a los métodos descritos en el presente documento también pueden aplicarse a tintas de reagente enzimático descritas en el presente documento.

Un ejemplo de una tinta de reagente enzimático adecuada para la presente invención tiene la siguiente formulación:

Antiespumante DC 1500	20,3% por masa
Alcohol de polivinilo	0,7% por masa
Ácido cítrico	0,6% por masa
Citrato de trisodio	2,0% por masa
Surfactante Tergitol	0,07% por masa
Copolímero polivinilpirrolidona-vinil acetato	0,7% por masa
Hidroxietilcelulosa	3,5% por masa
Sílice hidrofóbica Cab-o-Sil	5,0% por masa
Ferricianuro de potasio	20% por masa
Glucosa oxidasa	1,9% por masa
Agua	65% por masa

Un método adecuado para preparar la tinta de reagente enzimático descrita inmediatamente anteriormente se detalla más abajo. Una vez considerado por esta divulgación, incluyendo la preparación de tinta enzimática descrita más abajo, un experto en la técnica reconocerá que la cantidad específica de surfactante particular empleado en métodos descritos en el presente documento es dependiente no solamente de la primera y segunda relación descritas en el presente documento sino también de detalles del proceso de fabricación que un experto en la técnica entenderá fácilmente. Por ejemplo, en la preparación de tinta de reagente enzimático más abajo, se añade una cantidad de 10 ml de Tergitol a un volumen de tampón de aproximadamente 10.000 ml para conseguir una cantidad deseada de 0,1% v/v, con el 0,1% v/v habiéndose determinado en base a la primera y segunda relación de un método descrito en el presente documento. El surfactante está entonces presente en % v/v deseado (tal como % v/v superior a 0,10% v/v) cuando se combina con el material de sílice hidrofóbica.

En general, las tiras de ensayo analítico de acuerdo con la presente invención incluyen un sustrato y una capa de reagente dispuesta sobre una parte del sustrato. La capa de reagente incluye una tinta de reagente enzimático que comprende una cantidad de material de sílice hidrofóbica, una cantidad de surfactante; y una cantidad de enzima. Las cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en la tinta de reagente enzimático se predeterminan usando una primera y una segunda relación. La primera relación es entre mojabilidad de un material de sílice hidrofóbica representativo y al menos una primera característica de calibrado (tal como curva de calibrado y/o intercepción de calibrado) de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta de reagente enzimático que contiene el material de sílice hidrofóbica representativo. Además, la primera relación define una mojabilidad mínima que proporciona una primera característica aceptable de calibrado.

La segunda relación define la mojabilidad de una mezcla del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en una variedad de cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante. Las cantidades relativas predeterminadas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante empleadas en la tinta de agente enzimático proporcionan al menos la mojabilidad mínima definida por la primera relación y por lo tanto, una primera característica aceptable de calibrado.

La FIG. 6 es una vista en perspectiva en despiece simplificada de una tira de ensayo analítico 200 de acuerdo con la presente invención que está configurada para determinar glucosa en una muestra de sangre.

La tira de ensayo analítico con base electroquímica 200 incluye un sustrato eléctricamente aislante 212 (también referido simplemente como sustrato), una capa de conductor que sigue un modelo 214 (definiendo tres electrodos), una capa de aislamiento 216 (con ventana de exposición al electrodo 217 que se extiende a través de la misma), una capa de reagente 218, una capa adhesiva siguiendo un modelo 220, una capa hidrofílica 222 y una película superior 224.

El sustrato eléctricamente aislante 212 puede ser cualquier sustrato eléctricamente aislante conocido por un experto en la técnica incluyendo, por ejemplo, un sustrato de nylon, un sustrato de policarbonato, un sustrato de poliimida, un sustrato de cloruro de polivinilo, un sustrato de polietileno, un sustrato de polipropileno, un sustrato de poliéster glicolado (PETG), o un sustrato de poliéster. El sustrato eléctricamente aislante puede tener cualquier dimensión adecuada incluyendo, por ejemplo, una dimensión de anchura de aproximadamente 5 mm, una dimensión de longitud de aproximadamente 27 mm y una dimensión de grosor de aproximadamente 0,5 mm.

La capa aislante 216 puede formarse, por ejemplo, de una tinta aislante imprimible en pantalla. Tal tinta aislante imprimible en pantalla está disponible en el mercado en Ercon de Wareham, Massachusetts, Estados Unidos, bajo el nombre "Insulayer". La capa adhesiva siguiendo un modelo 220 puede formarse, por ejemplo, de un adhesivo sensible a la presión imprimible en pantalla disponible en Apollo Adhesives, Tamworth, Staffordshire, Reino Unido.

La capa hidrofílica 222 puede ser, por ejemplo, una película clara con propiedades hidrofílicas que impulsan la humectación y el relleno de la tira de ensayo analítico con base electroquímica 200 por una muestra de fluido (por ejemplo, una muestra de sangre total). Tales películas claras están disponibles en el mercado en, por ejemplo, 3M de Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos. La capa superior 224 puede ser, por ejemplo, una película clara sobrepuesta con tinta negra decorativa. Una película clara adecuada está disponible en el mercado en Tape Specialities, Tring, Hertfordshire, Reino Unido.

La capa de reagente 218 puede incluir cualquier reagente enzimático adecuado, con la selección de reagentes enzimáticos siendo dependiente del analito que se determinará. Por ejemplo, si se tiene que determinar glucosa en una muestra de sangre, la capa de reagente 218 puede incluir oxidasa o glucosa deshidrogenasa junto con otros componentes necesarios para la operación funcional. Sin embargo, de acuerdo con realizaciones de la presente invención, la capa de reagente 218 incluye, al menos, una tinta de reagente enzimático descrito en el presente documento.

La tira de ensayo analítico con base electroquímica 200 puede fabricarse, por ejemplo, mediante formación alineada secuencial de una capa conductora siguiendo un modelo 214, una capa de aislamiento 216 (con ventana de exposición al electrodo 217 que se extiende a través de la misma), una capa de reagente 218, una capa adhesiva siguiendo un modelo 220, una capa hidrofílica 222 y una película superior 224 en un sustrato eléctricamente aislante 212. Puede usarse cualquier técnica adecuada conocida por un experto en la técnica para realizar tal formación alineada secuencial, incluyendo, por ejemplo, impresión en pantalla, fotolitografía, fotograbado, deposición química de vapor y técnicas de laminación de cinta.

#### **Procedimiento para medir mojabilidad como altura de gel o volumen de gel**

Materiales y reagentes: balanza analítica, cubetas de cristal para pesar, Vórtice Genie 2 de Scientific Industries, centrifugador giratorio 16 de Hettich Universal, calibradores de Mitutoyo Absolute Digimatic, tubos centrifugadores graduados de plástico de TPP 91015, agua AnalarR, metanol (grado espectrofotométrico), material de sílice hidrofóbica y surfactante como sea apropiado.

Metodología: pesar 0,1 g de material de sílice hidrofóbica y, si es apropiado, una cantidad deseada de surfactante usando la balanza analítica y las cubetas de cristal para pesar. Transferir el material de sílice hidrofóbica, y el surfactante si se desea, a un tubo centrifugador de plástico. Añadir 8 ml de solución 30% (v/v) metanol/agua. Dispersar el material de sílice hidrofóbica y, si el surfactante si está presente, agitar el tubo centrifugador y después introducir en un vórtice la mezcla resultante durante 3 minutos usando el programa máximo del Vórtice Genie 2 de Scientific Industries. Después, colocar el tubo centrifugador en el centrifugador giratorio 16 de Hettich Universal asegurando que los cubos centrifugadores estén equilibrados. Centrifugar durante 54 minutos a 4.500 rpm.

Retirar los tubos centrifugadores y, con los calibradores de Mitutoyo Absolute Digimatic, medir la altura de la capa de gel (que está en la parte inferior del tubo) y la altura del humo de sílice no mojado (parte superior del tubo). Si se desea, la tabla o ecuación de la FIG. 6 puede emplearse para convertir la altura de gel (en mm) en volumen de gel (en ml).

#### **Preparación de tinta de reagente enzimático usando material de sílice hidrofóbica**

El siguiente procedimiento se empleó para preparar la tinta de reagente enzimático descrita en el presente documento.

Se preparó una solución de ácido cítrico antiespumante PVA combinando 0,5 ml de Antiespumante DC 1500 (disponible en el mercado en BDH/Merek Ltd.) con 750 gramos de agua (AnalaR de BDH/Merck, Ltd.). Después se añadieron 90 gramos de alcohol de polivinilo ("PVA", Sigma-Adrich, MW 85.000-124.000, hidrolizado 87%-89%) a la solución y se homogenizó a > 7000 RPM durante 2 horas. Después de la homogenización, se mezclaron 81,5 gramos de ácido cítrico en la solución.

Se preparó una solución ajustadora de pH mezclando 270 gramos de citrato de trisodio en 1000 ml de agua. El pH de la solución ácida cítrica antiespumante PVA se ajustó después a pH 5 añadiendo una cantidad suficiente de la solución de citrato de trisodio.

5 La solución con pH 5 se filtró a través de una malla de 125 micrones y se transfirió a un bote de acero inoxidable de 30 litros. Se añadió agua adicional al bote de acero de 30 litros hasta que el peso total de la solución fue 9250 gramos. Después se añadieron 44,5 mL de antiespumante DC 1500 al bote de acero inoxidable. Se añadieron 10 mL de Tergitol al bote de acero inoxidable.

10 Una cuchilla mezcladora de 90 mm de diámetro se unió a una mezcladora Dispersmat y se montó en el bote de acero inoxidable de manera que la cuchilla mezcladora estuviera 2 cm por encima de la parte inferior del bote. La mezcladora se fijó a 800 RPM y después se añadieron 90 gramos de polivinilpirrolidona-vinil acetato (co-polímero PVP/VA S-630, disponible en el mercado en ISP Company, y que tiene una proporción 60/40 y un peso molecular de 24.000 30.000) y 449 gramos de hidroxietilcelulosa ("HEC", disponible en el mercado en Natrosol 250G) durante los dos primeros minutos de mezcla. Después, la velocidad de mezcla se incrementó a 5500 RPM y continuó durante 15 cinco minutos adicionales, dando como resultado una solución HEC.

20 Después del periodo de mezcla, la solución HEC se transfirió a un barril de 15 litros y se mezcló suavemente (es decir, rodar) durante 12 a 25 horas. La viscosidad se midió después y confirmó estar en dentro del rango de 13.000 a 17.000 cP (medida a 25 °C y 5 RPMs).

25 La solución HEC rodada se equilibró entre 7 °C y 10 °C. Después, 9000 gramos de la solución HEC rodada y equilibrada se mezclaron con 675 gramos de material de sílice hidrofóbica (Cab-o-Sil disponible en el mercado en Cabot Corp., Billerica, Massachusetts, 01821, Estados Unidos) en un bote de acero inoxidable de 30 litros para formar una mezcla HEC/sílice.

30 Una cuchilla mezcladora de 175 mm de diámetro se unió a la mezcladora Dispersmat y se montó en el bote de acero inoxidable de manera que la cuchilla mezcladora estuviera en la parte inferior del bote. La mezcla combinada de HEC/sílice se mezcló a 2600 RPM durante 16 minutos. La densidad de la formulación se midió después (usando un picnómetro Cole-Parmer) para determinar que estuviera en el rango de desde aproximadamente 0,86 g/cm<sup>3</sup> a aproximadamente 1,015 g/cm<sup>3</sup>.

35 La mezcla HEC/sílice se transfirió después un barril de 15 litros y se hizo rodar suavemente durante 8 a 16 horas. La viscosidad se midió después y confirmó estar entre 37.000 y 50.000 cP (medida a 25 °C y 10 RPMs).

40 4515 gramos de mezcla de HEC/sílice se combinaron con 1386 gramos de ferricianuro de potasio y 126 gramos de glucosa oxidasa en un bote de acero inoxidable de 15 litros. Una cuchilla mezcladora de 125 mm de diámetro se unió a la mezcladora Dispersmat y se montó en el bote de acero inoxidable de manera que la cuchilla mezcladora estuviera en la parte inferior del bote y la mezcla se mezcló a 1500 RPM durante 15 minutos. Después de mezclar, el pH estuvo en el rango de desde aproximadamente 4,8 a 5,4 y la viscosidad estuvo en el rango de desde aproximadamente 36.000 a 48.000 cP (medida a 25 °C y 10 RPM). A partir de entonces, la tinta de reagente enzimático estuvo preparada para impresión en pantalla en electrodos y/o sustratos durante la fabricación de tiras de ensayo analíticas con base electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en una muestra de sangre.

45 Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los dispositivos y métodos, composiciones y dispositivos dentro del alcance de estas reivindicaciones estén cubiertos por las mismas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una tira de ensayo analítico que comprende:

- 5 un sustrato; y  
 una capa de reagente dispuesta sobre una parte del sustrato, incluyendo la capa de reagente una tinta de reagente enzimático que comprende:  
 una cantidad de material de sílice hidrofóbica;  
 una cantidad de surfactante; y  
 10 una cantidad de enzima,

donde las cantidades del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en la tinta de reagente enzimático se predeterminan usando:

- 15 una primera relación entre mojabilidad de un material de sílice hidrofóbica representativo y al menos una primera curva o intercepción de calibrado de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta de reagente enzimático que contiene el material de sílice hidrofóbica representativo, definiendo la primera relación una mojabilidad mínima que proporciona una primera curva o intercepción de calibrado aceptable que proporciona una determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés; y  
 20 una segunda relación que define la mojabilidad de una mezcla del material de sílice hidrofóbica y el surfactante en una variedad de cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y el surfactante, de tal manera que las cantidades del material de sílice hidrofóbica y el surfactante proporcionen al menos la mojabilidad mínima definida por la primera relación durante la fabricación del tinte de reagente enzimático.

25 2. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde el material de sílice hidrofóbica representativo y el material de sílice hidrofóbica particular son materiales hidrofóbicos de humo de sílice.

3. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde el surfactante particular es un surfactante no iónico.

30 4. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 3 donde el surfactante no iónico es un surfactante no iónico que contiene anillo aromático de éter de poliglicol.

5. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde la mojabilidad se determina como altura de gel en una solución de metanol y agua.

35 6. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde la mojabilidad se determina como volumen de gel en una solución de metanol y agua.

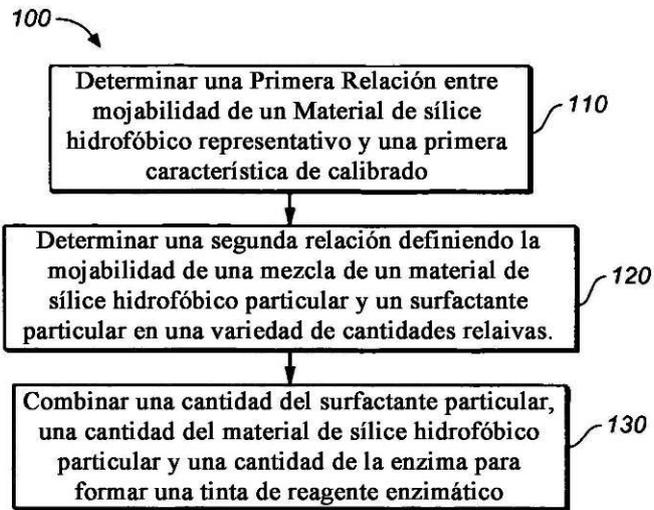
40 7. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde la tinta de reagente enzimático es una tinta de reagente enzimático imprimible en pantalla con una viscosidad en el intervalo comprendido entre 36.000 y 48.000 cP.

8. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde la tira de ensayo analítico es una tira de ensayo analítico con base electroquímica configurada para la determinación de glucosa en una muestra de sangre.

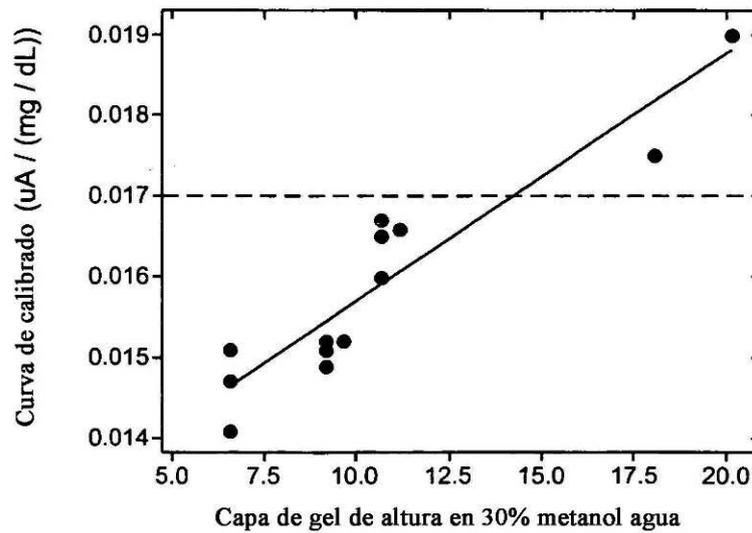
45 9. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde la enzima es glucosa oxidasa.

10. La tira de ensayo analítico de la reivindicación 1 donde la cantidad de surfactante es tal que el surfactante está presente en una concentración de al menos 0,10% v/v durante la fabricación de la tinta de reagente enzimático y en una concentración de al menos 0,07% v/v por masa en la tinta de reagente enzimático.

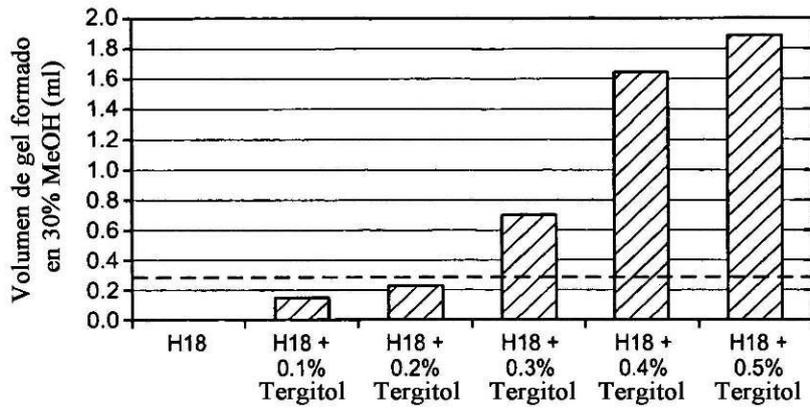
50



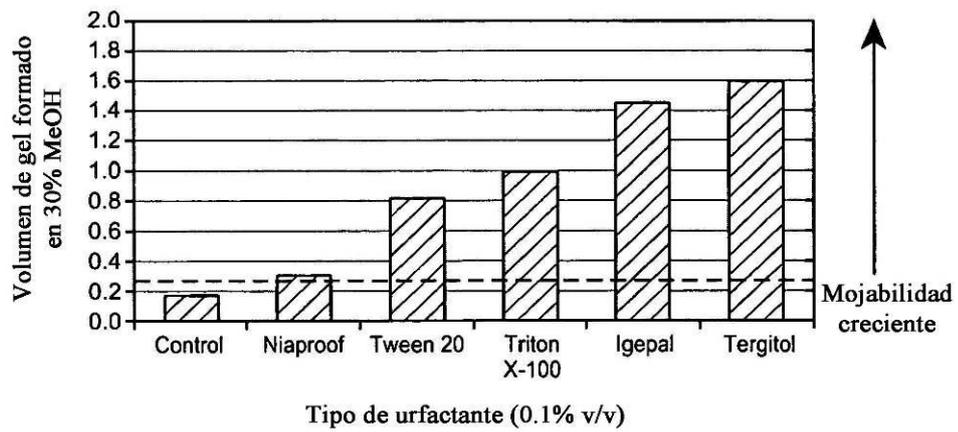
**FIG. 1**



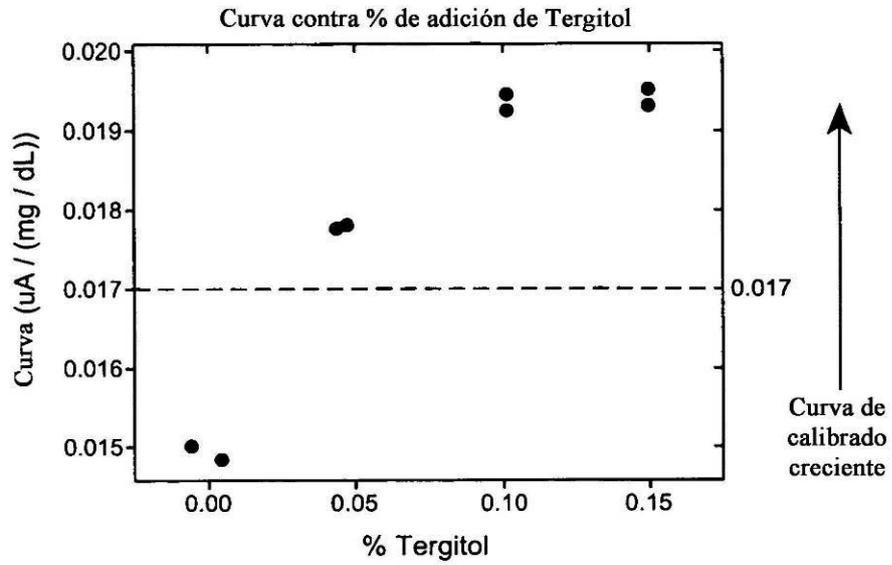
**FIG. 2**



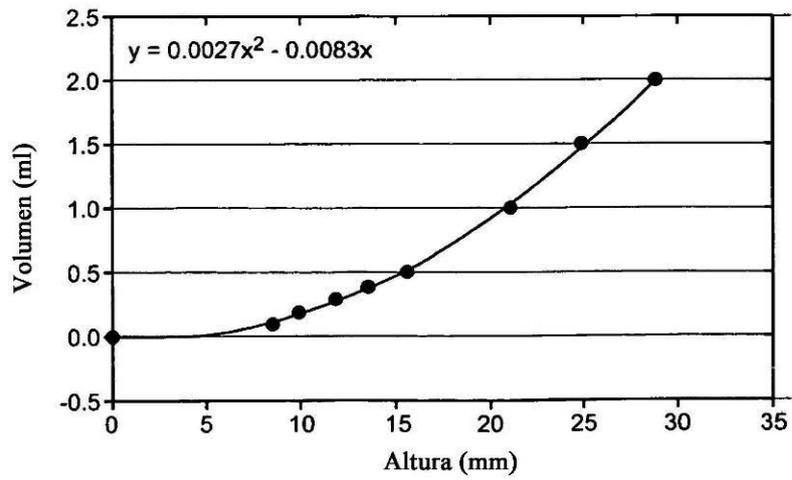
**FIG. 3**



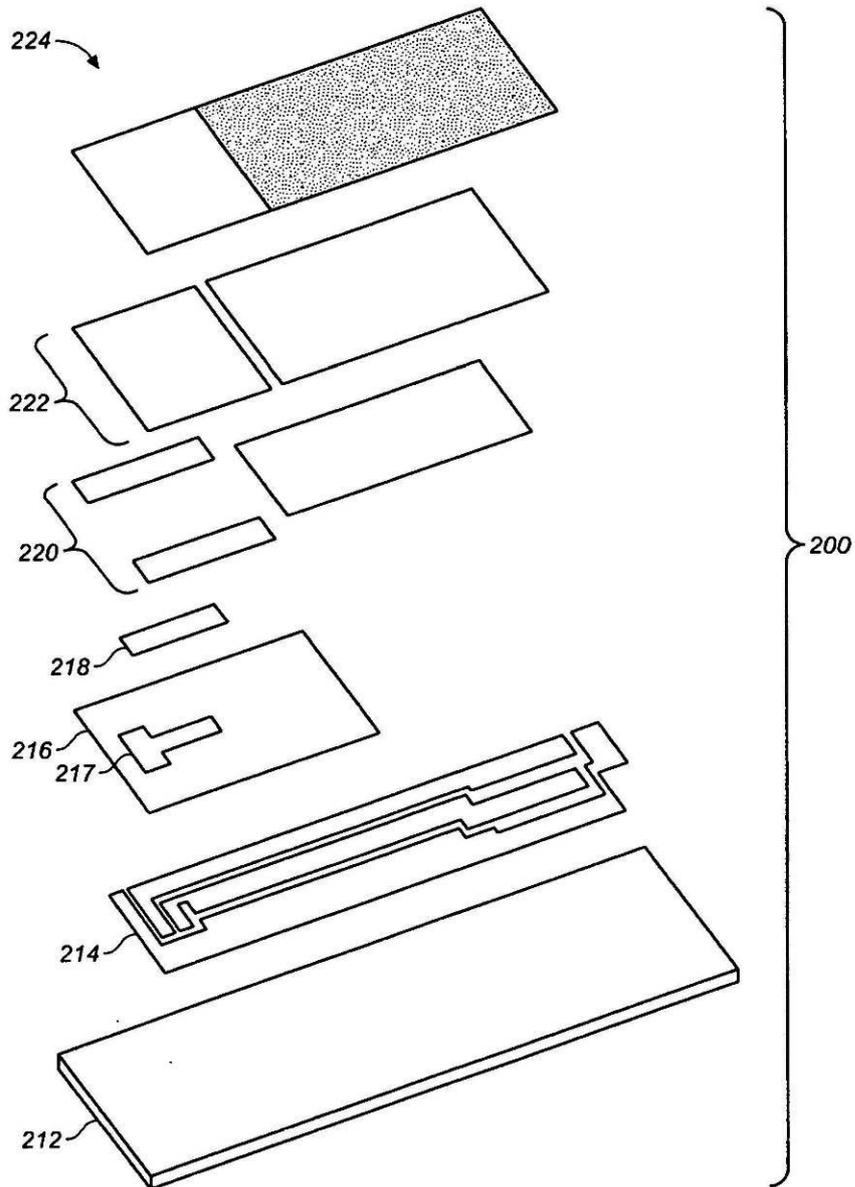
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 7**



**FIG. 6**