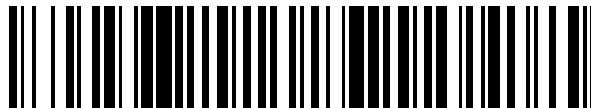


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 066**

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 10250818 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2243840**

54 Título: **Tinta reactiva enzimática**

30 Prioridad:

24.04.2009 US 429393

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

25.11.2013

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 2 431 066 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

Tinta reactiva enzimática.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

10 La presente invención se relaciona, en general, con tintas reactivas y, en particular, con tintas reactivas enzimáticas.

Descripción de Técnica Relacionada

15 El uso de tintas reactivas enzimáticas en tiras de ensayo analítico ha experimentada una extendida explotación comercial. Por ejemplo, se han empleado tintas reactivas enzimáticas en tiras de ensayo analítico con base electroquímica para la determinación de glucosa en muestras de sangre total. Tales tintas reactivas enzimáticas 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; Publicación Pre-Concedida de Estados Unidos N° 2004/0026243; y Publicación Internacional N° WO2004039600. La explotación comercial de tintas reactivas enzimáticas ha llevado como consecuencia a un mayor interés por los métodos usados para fabricar tales tintas.

20 US2006/0260940A1 describe una tira de ensayo de glucosa desechable. Una capa de separación reactivo/sangre integrada no conductora contiene un relleno, una enzima eficaz para oxidar glucosa, y un mediador eficaz 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.

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

30 US2006/0226008A1 describe una tinta conductora miscible en agua que incorpora un agente modificador de reología, tal como humo de sílice hidrofílica o humo de sílice hidrofóbica.

35 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se define de la siguiente manera en la reivindicación 1:
Una tinta reactiva enzimática para su uso en tiras de ensayo analítico que comprende:

40 una cantidad de material de sílice hidrofóbica;
una cantidad de surfactante; y
una cantidad de enzima,

45 donde las cantidades del material de sílice hidrofóbica y del surfactante en la tinta reactiva enzimática se predeterminan en base a:

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

55 de tal manera que las cantidades del material de sílice hidrofóbico y del surfactante proporcionen al menos la mínima mojabilidad definida por la primera relación durante la fabricación de la tinta reactiva enzimática.

En las reivindicaciones dependientes se definen más realizaciones.

60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

65 La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa fases en un proceso para fabricar una tinta reactiva

enzimática de acuerdo con una realización de la presente invención;

La FIG. 2 es un gráfico que representa una relación entre la mojabilidad (medida como altura de capa de gel (mm) en una solución 30% metanol y agua) de un material representativo de sílice hidrofóbica y una característica de calibración (es decir, pendiente de calibración) de una tira de ensayo analítico con base electroquímica que emplea una tinta reactiva enzimática que comprende el material representativo de sílice hidrofóbica;

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 particular de sílice hidrofóbica (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;

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 particular de sílice hidrofóbica (es decir, Cab-o-Sil) con una variedad de surfactantes particulares, todos en concentraciones relativas de 0,1% v/v;

La FIG. 5 es un gráfico de pendiente de calibración contra porcentaje de surfactante (v/v) para una tinta reactiva enzimática 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 usada en una realización de la presente invención; y

La FIG. 7 es un gráfico que representa una relación entre volumen de gel y altura de gel como puede emplearse al usar altura y volumen de gel como una medida de mojabilidad en métodos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

La siguiente descripción detallada debería leerse con referencia a los dibujos. Los dibujos representan realizaciones ejemplares para fines únicamente explicativos 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, variaciones, alternativas y usos de la invención, incluyendo el que en el presente se cree que es el mejor modo de realizar la invención.

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa fases en un proceso 100 para fabricar una tinta reactiva enzimática (tal como una tinta reactiva enzimática imprimible en 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 reactivas enzimáticas fabricadas de acuerdo con el método 100 pueden usarse, por ejemplo, en tiras de ensayo analítico con base electroquímica para la determinación de glucosa en muestras de sangre total. Tales tiras de ensayo analítico con base electroquímica se describen, con respecto a tintas reactivas convencionales, en, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Números 5.120.420; 5.288.636; 5.628.890; y 6.461.496.

Además, una tira de ensayo analítico usada en una realización de la presente invención que emplea una tinta reactiva enzimática de acuerdo con la presente invención se representa en la FIG. 6 y se describe en la exposición relacionada más abajo. Sin embargo, una vez valorado por la presente divulgación, un experto ordinario en la técnica puede emplear métodos descritos en el presente documento para fabricar tintas reactivas enzimáticas para cualquier tipo adecuado de tira de ensayo analítico.

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

La FIG. 2 es un gráfico que representa tal primera relación entre mojabilidad de un material representativo de sílice hidrofóbica disponible en el mercado bajo el nombre comercial Cab-o-Sil (Cabot Corp, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) y la pendiente de calibración de tiras de ensayo analítico con base electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en sangre que utilizan una tinta reactiva enzimática que contiene ese material representativo de sílice hidrofóbica. En la FIG. 2, la mojabilidad se mide como una altura de capa de gel para el procedimiento descrito más abajo. Para la configuración de la tira de ensayo analítico empleada para generar la FIG. 2, una pendiente de calibración aceptable es una pendiente de calibración superior a aproximadamente 0,017 uA/mg/dL y se indica en la FIG. 2 con la línea horizontal discontinua.

Se ha descubierto inesperadamente que la primera relación derivada para un material representativo de sílice

hidrofóbica (tal como Cab-o-Sil) es beneficiosa para métodos que emplean un material particular diferente (es decir, no idéntico) de sílice hidrofóbica en etapas posteriores. Por ejemplo, cuando el material representativo de sílice hidrofóbica es Cab-o-Sil TS610, la primera relación puede emplearse incluso cuando la determinación de una segunda relación y etapas posteriores (descritas con más detalle más abajo) usan los materiales de sílice hidrofóbica 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 incluyendo, por ejemplo, materiales de humo de sílice.

La FIG. 2 indica claramente que la pendiente de calibración 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 representativo de sílice hidrofóbica para generar la FIG. 2. Tal variabilidad de lote a lote en mojabilidad del material de sílice hidrofóbica puede dar como resultado una tinta reactiva enzimática con características aceptables de calibración (tal como una pendiente superior a 0,017 en la FIG. 2) para ciertos lotes o características inaceptables (es decir, una pendiente inferior a 0,017 en la FIG. 2) para otros lotes cuando se emplean técnicas convencionales de fabricación. Sin embargo, los métodos descritos en el presente documento permiten de manera beneficiosa el uso exitoso de una amplia variedad de materiales de sílice hidrofóbica mientras facilitan variabilidad de lote a lote en los materiales de sílice hidrofóbica.

Una vez valorado por la presente divulgación, un experto en la técnica reconocerá que para determinar mojabilidad pueden emplearse medios adecuados diferentes a la altura de capa de gel o volumen de capa de gel en métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden emplearse técnicas espectroscópicas para medir mojabilidad. Además, pueden emplearse otros materiales representativos adecuados de sílice hidrofóbica y otras características adecuadas de calibración (tal como intercepción de calibración) 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 mojabilidad de una mezcla de un material particular de sílice hidrofóbica y un surfactante particular en una variedad de cantidades relativas del material particular de sílice hidrofóbica y surfactante particular.

Como se ha señalado anteriormente, el material particular de sílice hidrofóbica puede ser el mismo que el material representativo hidrofóbico empleado en la etapa 110 o un material diferente (es decir, no idéntico) de sílice hidrofóbica. Ejemplos de materiales de sílice hidrofóbica que pueden emplearse en métodos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, los materiales de sílice hidrofóbica disponibles en el mercado H15 y H18 (Wacker Chemie AG, Stuttgart, Alemania; una sílice sintética, hidrofóbica, amorfa producida a través de hidrólisis a la 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 particular de sílice hidrofóbico (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. Por lo tanto, la FIG. 3 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 particular de sílice hidrofóbica y surfactante particular en la mezcla. Debería señalarse que en la FIG. 3, la anotación 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 el procedimiento de mojabilidad descrito más abajo).

Se ha determinado que los surfactantes no iónicos son particularmente útiles 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 particular de sílice hidrofóbica (es decir, Cab-o-Sil) con una variedad de surfactantes particulares, todos en concentraciones relativas de 0,1% v/v. La línea horizontal discontinua de la FIG. 4 indica la mojabilidad mínima requerida para proporcionar una característica aceptable de calibración (tal como pendiente de calibración y/o intercepción de calibración). En la FIG. 4, la anotación 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 el procedimiento de mojabilidad descrito más abajo).

El grupo de control de la FIG. 4 no tenía surfactante añadido y una mojabilidad que es insuficiente para proporcionar una característica aceptable de calibración. La FIG. 4 ilustra que la adición de varios surfactante provoca un incremento en la mojabilidad del material de sílice hidrofóbica hasta puntos variables. Tergitol e Igepal cuando se añaden a una concentración final de 0,1% dan como resultado el mayor incremento en mojabilidad. Niaproof (un surfactante iónico) da como resultado solamente un incremento marginal en mojabilidad.

Tanto Igepal como Tergitol son surfactantes (no iónicos) que contienen anillo aromático de poliglicol éter. Tales surfactantes no iónicos parecen ser los rectivos más adecuados para conseguir la máxima mojabilidad. Triton X 100 es un surfactante (no iónico) de polietileno glicol tert-octilfenil éter. Esta clase de surfactantes no mejora la mojabilidad hasta el mismo punto 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 resultado el menor incremento de mojabilidad cuando se empleó en 0,1% v/v.

5 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 grandes cantidades relativas de surfactante para incrementar la mojabilidad hasta el grado 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 ser adecuado para su uso en tintas reactivas enzimáticas con los métodos descritos en el presente documento.

10 De nuevo en referencia a la FIG. 1, en la etapa 130 del proceso 100 una cantidad del material particular de sílice hidrofóbica, una cantidad del surfactante particular, y una cantidad de enzima se combinan para formar una tinta reactiva enzimática. Además, las cantidades del material particular de sílice hidrofóbica y del 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 calibración. 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 reactiva enzimática y, de este modo, una característica aceptable y predeterminada de calibración.

20 Los métodos descritos en el presente documento son beneficiosos porque permiten un uso rápido de materiales de sílice hidrofóbica en tintas reactivas enzimáticas aunque la naturaleza hidrofóbica de los materiales hidrofóbicos normalmente excluiría 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 por 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 reactiva enzimática. Sin embargo, la incorporación de Tergitol en una cantidad aproximada de 0,1% (v/v) (es decir, en una concentración volumétrica de 0,1% durante la etapa de combinación) hace que el material de sílice hidrofóbica sea adecuado para su uso sin procesos de fabricación costosos o que consuman 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 pendiente adecuada de calibración (es decir, una pendiente de calibración superior a 0,017) mientras que la ausencia de surfactante dio como resultado una pendiente inaceptable de calibración (es decir, una pendiente de calibración inferior a 0,017). En esta aspecto, debería señalarse que en la FIG. 5, el %Tergitol v/v es un porcentaje volumétrico basado en la adición de Tergitol a una solución tampón antes de la combinación con Cab-o-Sil (véase más abajo la sección Preparación de Tinta Reactiva Enzimática).

35 Se supone 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 reactiva en 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 cierto punto incrementando varios tiempos de mezcla durante la preparación de la tinta enzimática, tales incrementos pueden llevar a un calentamiento degradador y mayores tiempos y costes de preparación.

40 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 las tira de ensayo analítico. Por ejemplo, no se encontraron efectos adversos con respecto a los compuestos potenciales que interfieren (tales como L-Dopamina, ácido úrico, ácido ascórbico, paracetamol (acetaminofeno) y ácido gentísico y la estabilidad de la tira de ensayo analítico fue idéntica a la de las tiras de ensayo analítico que no contenían surfactante.

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

50 Una tinta reactiva enzimática de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluye una cantidad de material de sílice hidrofóbica (por ejemplo, una cantidad de material de humo de sílice), una cantidad de surfactante (tal como surfactante no iónico); y una cantidad de enzima (por ejemplo, glucosa oxidasa). Las cantidades del material de sílice hidrofóbica y del surfactante presentes en la tinta reactiva enzimática se predeterminan en base a la primera y segunda relación. La primera relación es una relación entre mojabilidad de un material representativo de sílice hidrofóbica y una primera característica de calibración de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta reactiva enzimática que contiene el material representativo de sílice hidrofóbica. Además, tal primera relación define una mojabilidad mínima que proporciona una primera característica aceptable de calibración. 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 del surfactante. Las cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y del surfactante en la tinta reactiva enzimática se predeterminan para proporcionar al menos la mínima mojabilidad definida por la primera relación y, por lo tanto, una primera característica aceptable de

calibración.

Una vez valorado por la presente divulgación, un experto en la técnica reconocerá que las tintas reactivas enzimáticas de acuerdo con la presente invención son aquellas tintas que se fabrican 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 también se aplican a las tintas reactivas enzimáticas de la presente invención.

Un ejemplo de una tinta reactiva enzimática de acuerdo con la presente invención tiene la siguiente formulación:

Anti-espumante 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 reactiva enzimática descrita inmediatamente anteriormente se detalla más abajo. Una vez valorado por la presente divulgación, incluyendo la descripción de la preparación de tinta reactiva enzimática más abajo, un experto en la técnica reconocerá que la cantidad específica de surfactante particular empleado en métodos descritos en el presente documento depende no solamente de la primera y segunda relación descritas en el presente documento sino también de detalles del proceso de fabricación que son fácilmente comprensibles para un experto en la técnica. Por ejemplo, en la descripción de la preparación de tinta reactiva enzimática más abajo, una cantidad específica de 10 ml de Tergitol se añade a un volumen de tampón de aproximadamente 10.000 ml para conseguir una cantidad deseada 0,1% v/v, habiendo determinado el 0,1% v/v en base a la primera y segunda relación de un método descrito en el presente documento. Entonces, el surfactante está presente en el % 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 incluyen un sustrato y una capa reactiva dispuesta sobre una parte del sustrato. La capa reactiva incluye una tinta reactiva enzimática 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 del surfactante en la tinta reactiva enzimática se predeterminan usando una primera relación y una segunda relación. La primera relación es entre la mojabilidad de un material representativo de sílice hidrofóbica y al menos una primera característica de calibración (tal como pendiente de calibración y/o intercepción de calibración) de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta reactiva enzimática que contiene el material representativo de sílice hidrofóbica. Además, la primera relación define una mojabilidad mínima que proporciona una primera característica aceptable de calibración.

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

La FIG. 6 es una vista en perspectiva en despiece simplificada de una tira de ensayo analítico con base electroquímica 200 descrita en el presente documento 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 un sustrato), una capa conductora que sigue un patrón 214 (definiendo tres electrodos), una capa aislante 216 (con una ventana para exposición de electrodos 217 que se extiende a través de la misma), una capa reactiva 218, una capa adhesiva que sigue un patrón 220, una capa hidrofílica 222 y una película superior 224.

El sustrato eléctricamente aislante 212 puede ser cualquier sustrato eléctricamente aislante adecuado conocido por un experto en la técnica incluyendo, por ejemplo, un sustrato de nailon, 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 de aislamiento 216 puede estar formada, por ejemplo, a partir 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 comercial "Insulayer". La capa adhesiva que sigue un patrón 220 puede estar formada, por ejemplo, a partir de un adhesivo sensible a la presión imprimible en pantalla disponible en el mercado 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 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 película 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 reactiva 218 puede incluir cualquier reactivo enzimático adecuado, dependiendo la selección de reactivos enzimáticos del analito a determinar. Por ejemplo, si se va a determinar glucosa en una muestra de sangre, la capa reactiva 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 reactiva 218 incluye, al menos, una tinta reactiva enzimática de acuerdo con una realización de la presente invención.

La tira de ensayo analítico con base electroquímica 200 puede fabricarse, por ejemplo, mediante la formación secuencial alineada de la capa conductora que sigue un patrón 214, la capa de aislamiento 216 (con una ventana para exposición de electrodos 217 que se extiende a través de la misma), una capa reactiva 218, una capa adhesiva que sigue un patrón 220, una capa hidrofílica 222 y una película superior 224 en el sustrato eléctricamente aislante 212. Puede usarse cualquier técnica adecuada conocida por un experto en la técnica para conseguir tal formación secuencial alineada, incluyendo, por ejemplo, estampado serigráfico, fotolitografía, fotograbado, deposición química de vapor y técnicas de laminación de cintas.

Procedimiento para Medir la Mojabilidad como Altura de Gel o Volumen de Gel

Materiales y Reactivos: 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 Reactiva Enzimática Usando Material de Sílice Hidrofóbica

El siguiente procedimiento se empleó para preparar la tinta reactiva enzimática ejemplar 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 7500 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 de ácido cítrico antiespumante PVA se ajustó después a pH 5 añadiendo una cantidad suficiente de la solución de citrato de trisodio.

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

ES 2 431 066 T3

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.

5 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 a 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 cinco minutos adicionales, dando como resultado una solución HEC.

10 Después del periodo de mezcla, la solución HEC se transfirió a un barril de 15 litros y se mezcló suavemente (es decir, rodando) 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).

15 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, 01821-7001, Estados Unidos) en un bote de acero inoxidable de 30 litros para formar una mezcla HEC/sílice.

20 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/cm³ a aproximadamente 1,015 g/cm³.

25 La mezcla HEC/sílice se transfirió después a 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).

30 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 reactiva enzimática estuvo preparada para estampado serigráfico en electrodos y/o sustratos durante la fabricación de tiras de ensayo analítico con base electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en una muestra de sangre.

35 40 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

- 5 1. Una tinta reactiva enzimática para su uso en tiras de ensayo analítico que comprende:
- una cantidad de material de sílice hidrofóbica;
una cantidad de surfactante; y
una cantidad de enzima,
10 donde las cantidades del material de sílice hidrofóbica y del surfactante en la tinta reactiva enzimática se predeterminan usando:
- 15 una primera relación entre mojabilidad de un material representativo de sílice hidrofóbica y al menos una primera pendiente o intercepción de calibración de una tira de ensayo analítico que incluye una tinta reactiva enzimática que contiene el material representativo de sílice hidrofóbica, definiendo la primera relación una mojabilidad mínima que proporciona una primera pendiente o intercepción de calibración aceptable que proporciona una determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés; y una segunda relación que define la mojabilidad de una mezcla del material de sílice hidrofóbica y del surfactante en una variedad de cantidades relativas del material de sílice hidrofóbica y del surfactante,
- 20 de tal manera que las cantidades del material de sílice hidrofóbica y del surfactante proporcionen al menos la mojabilidad mínima definida por la primera relación durante la fabricación de la tinta reactiva enzimática.
- 25 2. La tinta reactiva enzimática de la reivindicación 1 donde el material representativo de sílice hidrofóbica y el material particular de sílice hidrofóbica son materiales de humo de sílice hidrofóbica.
- 30 3. La tinta reactiva enzimática de la reivindicación 1 donde el surfactante particular es un surfactante no iónico.
4. La tinta reactiva enzimática de la reivindicación 3 donde el surfactante no iónico es un surfactante no iónico que contiene anillo aromático de poliglicol éter.
- 35 5. La tinta reactiva enzimática de la reivindicación 1 donde la mojabilidad se determina como altura de gel en una solución de metanol y agua.
6. La tinta reactiva enzimática de la reivindicación 1 donde la mojabilidad se determina como volumen de gel en una solución de metanol y agua.
- 40 7. La tinta reactiva enzimática de la reivindicación 1 donde la tinta reactiva enzimática es una tinta reactiva enzimática imprimible en pantalla con una viscosidad en el rango de 36.000 y 48.000 cP.
8. La tinta reactiva enzimática 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 tinta reactiva enzimática de la reivindicación 1 donde la enzima es glucosa oxidasa.
10. La tinta reactiva enzimática 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 reactiva enzimática y en una concentración de al menos 0,07% v/v por masa en la tinta reactiva enzimática.

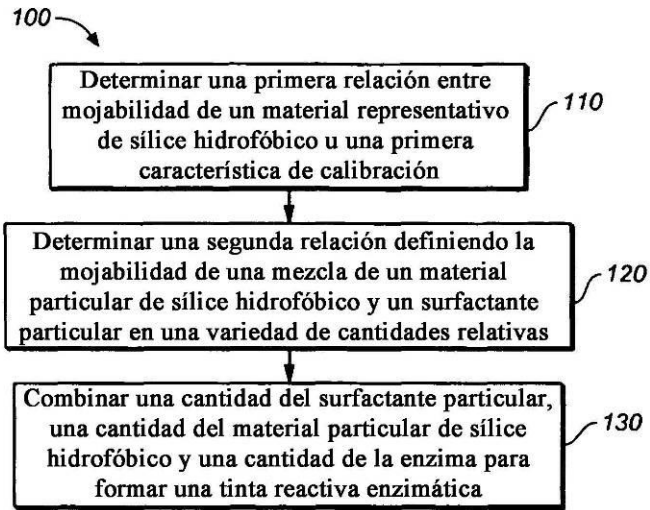


FIG. 1

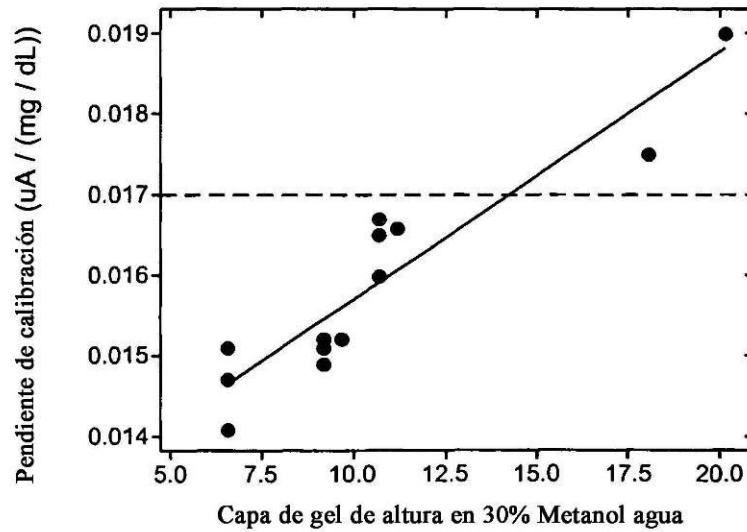


FIG. 2

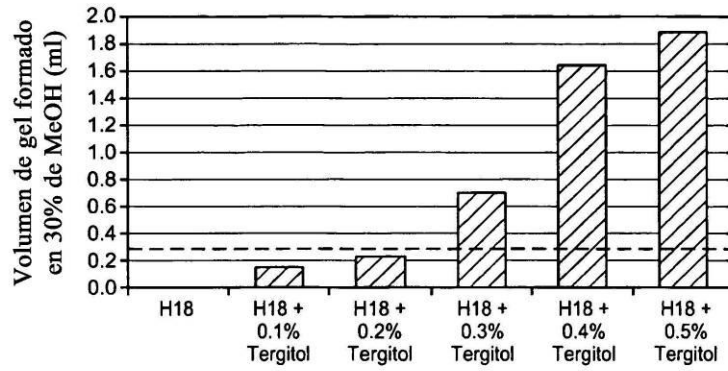


FIG. 3

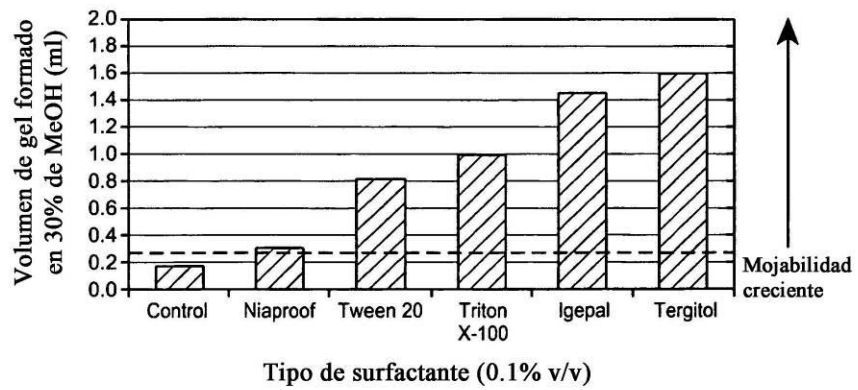


FIG. 4

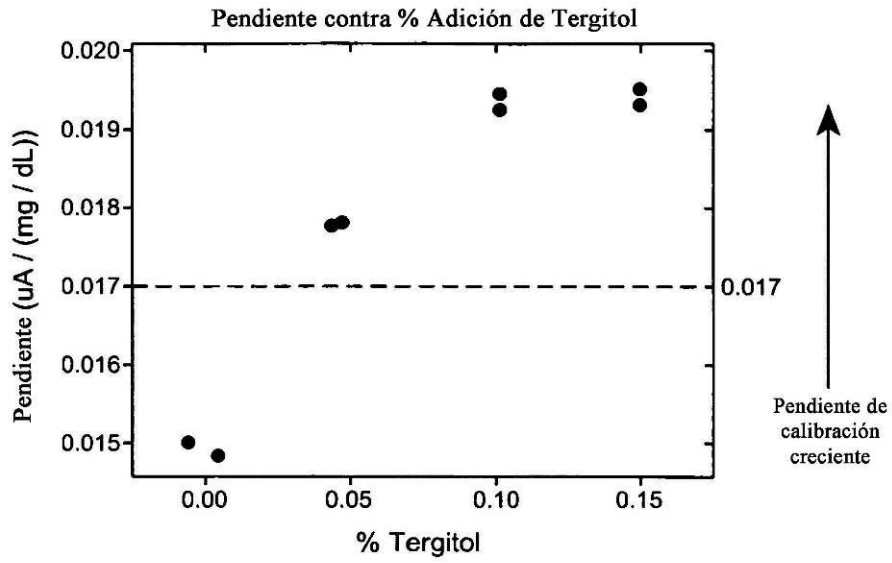


FIG. 5

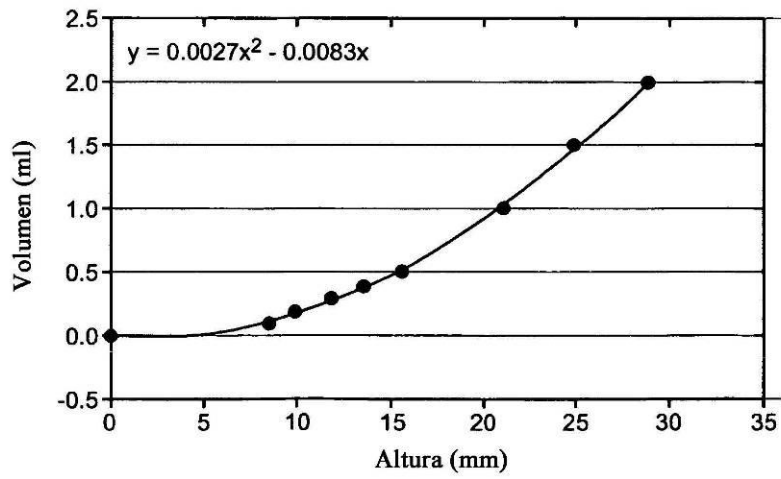


FIG. 7

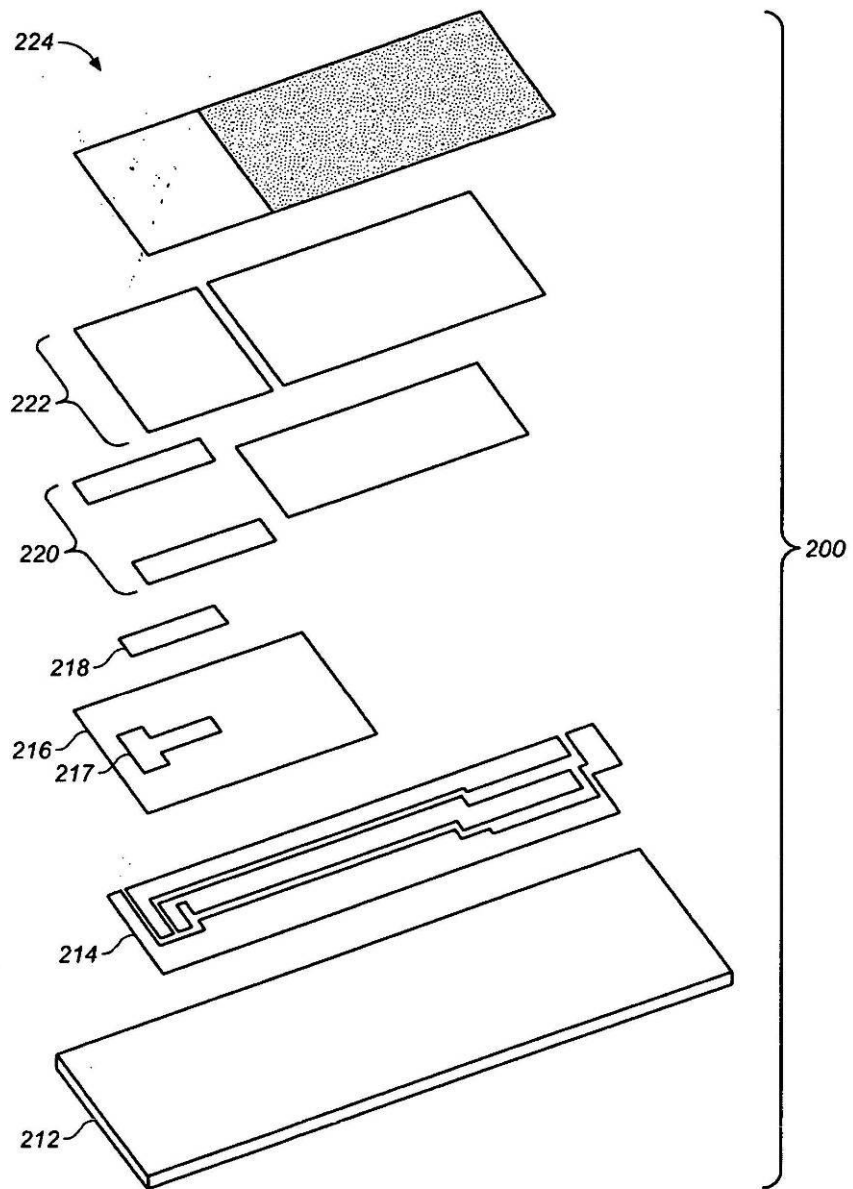


FIG. 6