

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 321**

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 10250820 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2243841**

54 Título: **Procedimiento para fabricar una tinta de reactivo enzimático**

30 Prioridad:

24.04.2009 US 429376

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

07.03.2014

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 2 446 321 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

Procedimiento para fabricar una tinta de reactivo enzimático.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a tintas de reactivo y, en particular, a procedimientos de fabricación relacionados.

Descripción de la técnica relacionada

15 El uso de tintas de reactivo enzimático en tiras reactivas analíticas ha experimentado una explotación comercial generalizada. Por ejemplo, las tintas de reactivo enzimático se han empleado en tiras reactivas analíticas basadas en electroquímica para la determinación de glucosa en muestras de sangre completa. Tales tintas de reactivo enzimático y tiras reactivas analíticas se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 7.465.380; 7.462.265; 7.291.256; 7.112.265; 5.708.247; 7.250.105; la publicación preconcedida de EE.UU. nº 2004/0026243; y la publicación internacional nº WO2004039600. La explotación comercial de tintas de reactivo enzimático ha conducido
20 consecuentemente a un elevado interés en los procedimientos usados para fabricar tales tintas.

25 El documento US2006/0260940A1 describe una tira reactiva para glucosa desechable. Una capa de separación de reactivo/sangre integrada no conductora contiene una carga, una enzima eficaz en oxidar glucosa y un mediador eficaz en transferir electrones de la enzima. La carga puede ser una sílice hidrófoba en la que, durante el procedimiento de fabricación, las partículas se rompen por homogeneización.

30 El documento WO2006/096619A2 describe una composición de reactivo que contiene GDH-PQQ como co-factor de enzima. Una composición preferida incluye polímeros hidrófilos, sílice hidrófila sin tratar amorfa, tampones, tensioactivos y un mediador.

35 El documento US2006/0226008A1 describe una tinta conductora miscible en agua que incorpora un agente modificador de la reología, tal como sílice ahumada hidrófila o sílice ahumada hidrófoba.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 La presente invención se define en la reivindicación 1 del siguiente modo.

Un procedimiento para fabricar una tinta de reactivo enzimático para su uso en tiras reactivas analíticas, comprendiendo el procedimiento:

45 determinar una primera relación entre la humectabilidad de un material de sílice hidrófobo representativo y al menos una primera pendiente de calibración u ordenada en el origen de una tira reactiva analítica que incluye una tinta de reactivo enzimático que contiene el material de sílice hidrófobo representativo, definiendo la primera relación una humectabilidad mínima que proporciona una primera pendiente de calibración aceptable u ordenada en el origen que
proporciona determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés;

determinar una segunda relación que define la humectabilidad de una mezcla de un material de sílice hidrófobo particular y un tensioactivo particular a través de un intervalo de cantidades relativas del material de sílice hidrófobo particular y el tensioactivo particular; y

50 combinar, al menos, una cantidad del material de sílice hidrófobo particular, una cantidad del tensioactivo particular y una cantidad de enzima para formar una tinta de reactivo enzimático;

55 en el que las cantidades del material de sílice hidrófobo particular y el tensioactivo particular se predeterminan basándose en la segunda relación para proporcionar al menos la humectabilidad mínima definida por la primera relación y, por tanto, una primera pendiente de calibración aceptable u ordenada en el origen que proporciona determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 Las novedosas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención se obtendrán por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que los principios de la invención se utilizan, y los dibujos adjuntos, de los que:

65 la FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa etapas en un procedimiento para fabricar una tinta de reactivo enzimático según una realización de la presente invención;

la FIG. 2 es una gráfica que representa una relación entre la humectabilidad (medida como altura de la capa de gel (mm) en una disolución al 30 % de metanol y agua) de un material de sílice hidrófobo representativo y una característica de calibración (es decir, pendiente de calibración) de una tira reactiva analítica basada en electroquímica que emplea una tinta de reactivo enzimático que comprende el material de sílice hidrófilo representativo;

la FIG. 3 es un gráfico de barras de la humectabilidad (medida como volumen del gel en una disolución al 30 % de metanol) de una mezcla de un material de sílice hidrófobo particular (es decir, H18) y un tensioactivo particular (es decir, Tergitol) a través de un intervalo de cantidades relativas de H18 y Tergitol representadas como un porcentaje en v/v de Tergitol;

la FIG. 4 es un gráfico de barras de la humectabilidad (medida como volumen del gel en una disolución al 30 % de metanol) para mezclas de un material de sílice hidrófobo particular (es decir, Cab-o-Sil) con una variedad de tensioactivos particulares, todas a concentraciones relativas del 0,1 % en v/v;

la FIG. 5 es un gráfico de pendiente de calibración frente a porcentaje de tensioactivo (v/v) para una tinta de reactivo enzimático que comprende el material de sílice hidrófobo Cab-o-Sil y el tensioactivo Tergitol;

la FIG. 6 es una vista en perspectiva en despiece ordenado simplificada de una tira reactiva analítica; y

la FIG. 7 es una gráfica que representa una relación entre el volumen del gel y la altura del gel que puede emplearse en usar la altura y volumen del gel como medida de la humectabilidad en procedimientos según la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

La siguiente descripción detallada debe leerse con referencia a los dibujos. Los dibujos representan realizaciones a modo de ejemplo con el fin de explicación solo 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. La presente descripción permitirá claramente a un experto en la materia hacer y usar la invención, y describe varias realizaciones, adaptaciones, variaciones, alternativas y usos de la invención, que incluyen lo que presentemente se cree que es el mejor modo de llevar a cabo la invención.

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa etapas en un procedimiento 100 para fabricar una tinta de reactivo enzimático (tal como una tinta de reactivo enzimático imprimible en pantalla con una viscosidad en el intervalo de 36.000 a 48.000 cP) para su uso en tiras reactivas analíticas según una realización de la presente invención. Las tintas de reactivo enzimático fabricadas según el procedimiento 100 pueden usarse en, por ejemplo, tiras reactivas analíticas basadas en electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en muestras de sangre completa. Tales tiras reactivas analíticas basadas en electroquímica se describen, con respecto a tintas de reactivo convencionales, en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.120.420; 5.288.636; 5.628.890; y 6.461.496.

Además, una tira reactiva analítica que emplea una tinta de reactivo enzimático fabricada según la presente invención se representa en la FIG. 6 y se describe en la discusión relacionada más adelante. Sin embargo, una vez informado de la presente divulgación, un experto habitual en la materia puede emplear procedimientos según realizaciones de la presente invención para fabricar tintas de reactivo enzimático para cualquier tipo de tira reactiva analítica adecuada.

El procedimiento 100 incluye determinar una primera relación entre la humectabilidad de un material de sílice hidrófobo representativo (por ejemplo, un material de sílice ahumada hidrófobo) y al menos una primera característica de calibración (una pendiente de calibración y/o una ordenada en el origen de calibración) de una tira reactiva analítica que incluye una tinta de reactivo enzimático que contiene el material de sílice hidrófobo representativo (véase la etapa 110 de la FIG. 1). Además, la primera relación así determinada define una humectabilidad mínima que proporciona una primera característica de calibración aceptable. Un experto en la materia reconocerá que una característica de calibración "aceptable" se refiere a características que proporcionan la determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés (por ejemplo, glucosa).

La FIG. 2 es una gráfica que representa una primera relación tal entre la humectabilidad de un material de sílice hidrófobo representativo comercialmente disponible bajo el nombre comercial Cab-o-Sil (Cabot Corp, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) y la pendiente de calibración de tiras reactivas analíticas basadas en electroquímica configuradas para la determinación de glucosa en sangre que utilizan una tinta de reactivo enzimático que contiene ese material de sílice hidrófobo representativo. En la FIG. 2, la humectabilidad se mide como una altura de la capa de gel por el procedimiento descrito más adelante. Para la configuración de tira reactiva analítica 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 por la línea horizontal discontinua.

Se ha encontrado inesperadamente que la primera relación derivada para un material de sílice hidrófobo

representativo (tal como Cab-o-Sil) es beneficiosa para procedimientos que emplean un material de sílice hidrófobo particular diferente (es decir, no idéntico) en etapas posteriores. Por ejemplo, si el material de sílice hidrófobo representativo es Cab-o-Sil TS610, la primera relación puede emplearse incluso cuando la determinación de una segunda relación y etapas de combinación (descritas adicionalmente más adelante) usen los materiales de sílice hidrófobos comercialmente disponibles H15, H18 (ambos disponibles de Wacker Chemie AG, Stuttgart, Alemania), o Aerosil (disponible de Evonik Degussa LTD, Düsseldorf, Alemania). Por tanto, los procedimientos según realizaciones de la presente son simples y fáciles de usar con una amplia variedad de materiales de sílice hidrófobos que incluyen, por ejemplo, materiales de sílice ahumada.

La FIG. 2 indica claramente que la pendiente de calibración es una función lineal de la humectabilidad del material de sílice hidrófobo (como se representa por la línea continua lineal). Debe observarse que se emplearon diversos lotes de fabricación del material de sílice hidrófobo representativo para generar la FIG. 2. Tal variabilidad de lote a lote en la humectabilidad del material de sílice hidrófobo puede producir una tinta de reactivo enzimático con características de calibración aceptables (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 de fabricación convencionales. Sin embargo, los procedimientos según realizaciones de la presente invención permiten beneficiosamente el uso satisfactorio de una amplia variedad de materiales de sílice hidrófobos mientras que se acomoda la variabilidad de lote a lote en los materiales de sílice hidrófilos.

Una vez informado de la presente divulgación, un experto en la materia reconocerá que pueden emplearse medios adecuados de determinación de la humectabilidad distintos de la altura de la capa de gel o el volumen de la capa de gel en procedimientos según la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse técnicas espectroscópicas para medir la humectabilidad. Además, pueden emplearse otros materiales de sílice hidrófobos representativos adecuados y pueden emplearse otras características de calibración adecuadas (tales como ordenada en el origen de calibración) en realizaciones de la presente invención.

En la etapa 120 de la FIG. 1, el procedimiento 100 incluye determinar una segunda relación que define la humectabilidad de una mezcla de un material de sílice hidrófobo particular y un tensioactivo particular a través de un intervalo de cantidades relativas del material de sílice hidrófobo particular y el tensioactivo particular.

Como se observa anteriormente, el material de sílice hidrófobo particular puede ser el mismo que el material hidrófobo representativo empleado en la etapa 110 o un material de sílice hidrófobo diferente (es decir, no idéntico). Ejemplos de materiales de sílice hidrófobos que pueden emplearse en procedimientos según la presente invención incluyen, por ejemplo, los materiales de sílice hidrófobos comercialmente disponibles H15 y H18 (Wacker Chemie AG, Stuttgart, Alemania; una sílice amorfa hidrófoba sintética producida mediante hidrólisis de llama) y el material de sílice hidrófobo comercialmente disponible Aerosil (Evonik Degussa LTD, Düsseldorf, Alemania). Cab-o-Sil, H15 y H18 son ejemplos de materiales de sílice ahumada, también conocidos como sílices pirógenas.

La FIG. 3 es un gráfico de barras de la humectabilidad (medida como volumen del gel en una disolución al 30 % de metanol) de una mezcla de un material de sílice hidrófobo particular (es decir, H18) y un tensioactivo particular (es decir, Tergitol) a través de un intervalo de cantidades relativas de H18 y Tergitol representado en porcentaje de Tergitol v/v. Por tanto, la FIG. 3 sirve para ilustrar una segunda relación a modo de ejemplo entre la humectabilidad de una mezcla de una sílice hidrófila particular (es decir, H18) y un tensioactivo particular (Tergitol) y cantidades relativas del material de sílice hidrófilo particular y el tensioactivo particular en la mezcla. Debe observarse que en la FIG. 3 la anotación v/v se refiere a la relación volumétrica del tensioactivo en 8 ml de disolución de metanol-agua, estando el tensioactivo presente a un peso constante de 0,1 g (véase la descripción del procedimiento de humectabilidad más adelante).

Se ha determinado que tensioactivos no iónicos son particularmente adecuados para su uso en procedimientos según la presente invención. Por ejemplo, la FIG. 4 es un gráfico de barras de la humectabilidad (medida como volumen del gel en una disolución al 30 % de metanol) para mezclas de un material de sílice hidrófobo particular (es decir, Cab-o-Sil) con una variedad de tensioactivos, todas a concentraciones relativas del 0,1 % en v/v. La línea discontinua horizontal de la FIG. 4 indica la humectabilidad mínima requerida para proporcionar una característica de calibración aceptable (tal como pendiente de calibración y/u ordenada en el origen de calibración). En la FIG. 4, la anotación v/v se refiere de nuevo a la relación volumétrica del tensioactivo en 8 ml de disolución de metanol-agua, estando el tensioactivo presente a un peso constante de 0,1 g (véase la descripción del procedimiento de humectabilidad más adelante).

El grupo de control de la FIG. 4 no tuvo tensioactivo añadido y una humectabilidad que es insuficiente para proporcionar una característica de calibración aceptable. La FIG. 4 ilustra que la adición de diversos tensioactivos produce un aumento en la humectabilidad del material de sílice hidrófobo a grados variables. Tergitol e Igepal, cuando se añaden a una concentración final del 0,1 % en v/v, producen el mayor aumento en la humectabilidad. Niaproof (un tensioactivo iónico) produce solo un mínimo aumento en la humectabilidad.

Tanto Igepal como Tergitol son tensioactivos (no iónicos) que contienen anillos aromáticos de éter de poliglicol. Tales tensioactivos no iónicos parecen ser los reactivos más adecuados para conseguir la máxima humectabilidad.

Triton X 100 es un tensioactivo (no iónico) de *terc*-octilfenil éter de polietilenglicol. Esta clase de tensioactivos no mejora la humectabilidad al mismo grado que Igepal y Tergitol, pero pueden ser adecuados para su uso en procedimientos según la presente invención. Niaproof, 7-etil-2-metil-4-undecilsulfato de sodio, es un tensioactivo aniónico y produjo el menor aumento de humectabilidad cuando se empleó al 0,1 % en v/v.

Cuando se comparan las FIG. 3 y 4, debe observarse que H18 es un material de sílice extremadamente hidrófobo y, por tanto, se necesitan mayores cantidades relativas de tensioactivo para aumentar la humectabilidad al grado necesario para lograr una característica de calibración aceptable en comparación con Cab-o-Sil. Sin embargo, incluso un material de sílice extremadamente hidrófobo tal como H18 puede volverse adecuado para su uso en tintas de reactivo enzimático mediante procedimientos según realizaciones de la presente invención.

Con referencia de nuevo a la FIG. 1, en la etapa 130 del procedimiento 100, una cantidad del material de sílice hidrófobo particular, una cantidad del tensioactivo particular y una cantidad de enzima se combinan para formar una tinta de reactivo enzimático. Además, las cantidades del material de sílice hidrófobo particular y el tensioactivo particular se predeterminan basándose en la segunda relación para proporcionar al menos la humectabilidad mínima definida por la primera relación y, por tanto, una característica de calibración aceptable y predeterminada. Por ejemplo, la cantidad de tensioactivo puede predeterminarse de forma que su concentración sea apropiada para proporcionar la humectabilidad deseada de la cantidad de material de sílice hidrófobo durante la etapa de combinación cuando se fabrica una tinta de reactivo enzimático y, así, una característica de calibración aceptable y predeterminada.

Los procedimientos según la presente invención son beneficiosos porque permiten el rápido uso de materiales de sílice hidrófobos en tintas de reactivo enzimático aún cuando la naturaleza hidrófoba de los materiales hidrófobos descartaría normalmente su uso. En otras palabras, los materiales de sílice que son demasiado hidrófobos para el rápido uso se hacen adecuados para su uso incorporando una cantidad de tensioactivo que se determina por la primera y segunda relaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, la FIG. 4 indica que el lote de control del material de sílice hidrófobo Cab-o-Sil es demasiado hidrófobo para uso satisfactorio en una tinta de reactivo enzimático. Sin embargo, la incorporación de Tergitol a una cantidad aproximada del 0,1 % (v/v) (es decir, a una concentración volumétrica del 0,1 % durante la etapa de combinación) convierte el material de sílice hidrófobo en adecuado para su uso sin procedimientos de fabricación costosos o que requieran tiempo. Esta conclusión se soporta por los datos de la FIG. 5 que ilustran que la adición de Tergitol a Cab-o-Sil permite una pendiente de calibración adecuada (es decir, una pendiente de calibración superior a 0,017) mientras que la ausencia de tensioactivo produjo una pendiente de calibración inaceptable (es decir, una pendiente de calibración inferior a 0,017). A este respecto, debe observarse que en la FIG. 5 el % en v/v de Tergitol es un porcentaje volumétrico basado en la adición de Tergitol a una disolución de tampón antes de la combinación con Cab-o-Sil (véase la sección Preparación de tinta de reactivo enzimático más adelante).

Se supone sin quedar ligado, que la combinación de un material de sílice hidrófobo y un tensioactivo en cantidades por realizaciones de la presente invención produce una capa de reactivo sobre tiras reactivas analíticas con una estructura adecuadamente abierta (porosidad) y/o densidad que produce características de calibración aceptables. Aunque tal densidad y porosidad pueden controlarse a cierto grado aumentando diversos tiempos de mezcla durante la preparación de las tintas enzimáticas, tal aumento puede conducir a calentamiento degradativo y a amplios tiempos de preparación y costes.

Además, resultados experimentales indican que la inclusión de tensioactivo según realizaciones de la presente invención no afecta adversamente la funcionalidad de las tiras reactivas analíticas. Por ejemplo, no se encontraron efectos adversos con respecto a posibles compuestos interferentes (tales como L-dopamina, ácido úrico, ácido ascórbico, paracetamol (acetaminofeno) y ácido gentsico) y la estabilidad de las tiras reactivas analíticas fue idéntica a tiras reactivas analíticas que no contenían tensioactivo.

La primera y segunda relaciones descritas en el presente documento pueden determinarse usando un simple equipo de laboratorio. Los procedimientos según la presente invención son, por tanto, beneficiosamente baratos. Además, como los procedimientos emplean simples materiales de sílice hidrófobos (tales como materiales de sílice ahumada), obvian cualquier necesidad de emplear sofisticados materiales de sílice con tanto propiedades hidrófilas como hidrófobas.

Una tinta de reactivo enzimático descrita en el presente documento incluye una cantidad de material de sílice hidrófobo (por ejemplo, una cantidad de un material de sílice ahumada), una cantidad de tensioactivo (tal como un tensioactivo no iónico) y una cantidad de enzima (por ejemplo, glucosa oxidasa). Las cantidades de material de sílice hidrófobo y el tensioactivo presentes en la tinta de reactivo enzimático se predeterminan basándose en la primera y segunda relaciones. La primera relación es una relación entre la humectabilidad de un material de sílice hidrófobo representativo y una primera característica de calibración de una tira reactiva analítica que incluye una tinta de reactivo enzimático que contiene el material de sílice hidrófobo representativo. Además, una primera relación tal define una humectabilidad mínima que proporciona una primera característica de calibración aceptable. La segunda relación es una relación que define la humectabilidad de una mezcla del material de sílice hidrófobo y el tensioactivo a través de un intervalo de cantidades relativas del material de sílice hidrófobo y el tensioactivo. Las cantidades

relativas del material de sílice hidrófobo y el tensioactivo en la tinta de reactivo enzimático se predeterminan para proporcionar al menos la humectabilidad mínima definida por la primera relación, y por tanto, una primera característica de calibración aceptable.

5 Una vez informado de la presente divulgación, un experto en la materia reconocerá que tintas de reactivo enzimático en el presente documento describen aquellas tintas que se fabrican según los procedimientos de la presente invención. Por tanto, componentes, características y beneficios descritos en el presente documento con respecto a los procedimientos de la presente invención también se aplican a tintas de reactivo enzimático descritas en el presente documento.

10 Un ejemplo de una tinta de reactivo enzimático fabricada según la presente invención tiene la siguiente formulación:

	DC 1500 Anti-foam	20.3% en masa
	Alcohol polivinílico	0.7% en masa
15	Acido cítrico	0.6% en masa
	Citrato trisódico	2.0% en masa
	Tergitol surfactant e	0.07% en masa
	Copolímero de acetato de vinilo-Polivinilpirrolidona	0.7% en masa
20	Celulosa Hidroxil-etil	3.5% en masa
	Cab-o-Sil sílice hidrófoba	5.0% en masa
	Ferricianuro de Potasio	20% en masa
	Glucosa Oxidasa	1.9% en masa
25	Agua	65% en masa

Un procedimiento adecuado de preparación de la tinta de reactivo enzimático descrita inmediatamente antes se detalla a continuación. Una vez informado de la presente divulgación, que incluye la descripción de la preparación de la tinta de reactivo enzimático más adelante, un experto en la materia reconocerá que la cantidad específica de tensioactivo particular empleado en los procedimientos según la presente invención es dependiente no solo de la primera y segunda relaciones descritas en el presente documento, sino también de detalles del procedimiento de fabricación que son fácilmente entendidos por un experto en la materia. Por ejemplo, en la descripción de la preparación de la tinta de reactivo enzimático más adelante, una cantidad específica de 10 ml de Tergitol se añade a un volumen de tampón de aprox. 10.000 ml para lograr una cantidad deseada del 0,1 % en v/v, habiéndose determinado el 0,1 % en v/v basándose en la primera y segunda relaciones de un procedimiento según una realización de la presente invención. El tensioactivo está entonces presente al % en v/v deseado (tal como un % en v/v superior al 0,10 % en v/v) cuando se combina con el material de sílice hidrófobo.

En general, las tiras reactivas analíticas descritas en el presente documento incluyen un sustrato y una capa de reactivo dispuesta sobre una porción del sustrato. La capa de reactivo incluye una tinta de reactivo enzimático que comprende una cantidad de material de sílice hidrófobo, una cantidad de tensioactivo y una cantidad de enzima. Las cantidades relativas del material de sílice hidrófobo y el tensioactivo en la tinta de reactivo enzimático se predeterminan usando una primera relación y una segunda relación. La primera relación es entre la humectabilidad de un material de sílice hidrófobo representativo y al menos una primera característica de calibración (tal como pendiente de calibración y/u ordenada en el origen de calibración) de una tira reactiva analítica que incluye una tinta de reactivo enzimático que contiene el material de sílice hidrófobo representativo. Además, la primera relación define una humectabilidad mínima que proporciona una primera característica de calibración aceptable.

La segunda relación define la humectabilidad de una mezcla de material de sílice hidrófobo y el tensioactivo a través de un intervalo de cantidades relativas del material de sílice hidrófobo y el tensioactivo. Las cantidades relativas predeterminadas del material de sílice hidrófobo y el tensioactivo empleado en la tinta de reactivo enzimático proporcionan al menos la humectabilidad mínima definida por la primera relación y, por tanto, una primera característica de calibración aceptable.

55 La FIG. 6 es un vista en perspectiva en despiece ordenado simplificada de una tira 200 reactiva analítica basada en electroquímica que está configurada para determinar glucosa en una muestra de sangre.

La tira 200 reactiva analítica basada en electroquímica incluye un sustrato 212 eléctricamente aislante (también denominado simplemente un sustrato), una capa 214 de conductor estampada (que define tres electrodos), una capa 216 de aislamiento (con ventana 217 de exposición de electrodos que se extiende a su través), un capa 218 de reactivo, una capa 220 adhesiva estampada, una capa 222 hidrófila y una película 224 superior.

El sustrato 212 eléctricamente aislante puede ser cualquier sustrato eléctricamente aislante adecuado conocido para un experto en la materia que incluye, por ejemplo, un sustrato de nailon, un sustrato de policarbonato, un sustrato de poliimida, un sustrato de poli(cloruro de vinilo), 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 que incluye, por ejemplo, una dimensión de ancho de aproximadamente 5 mm, una dimensión de longitud de aproximadamente 27 mm y una dimensión de espesor de aproximadamente 0,5 mm.

5 La capa 216 de aislamiento puede formarse, por ejemplo, de una tinta aislante imprimible en pantalla. Una tinta aislante imprimible en pantalla tal está comercialmente disponible de Ercon of Wareham, Massachusetts, EE.UU., bajo el nombre "Insulayer". La capa 220 adhesiva estampada puede formarse, por ejemplo, de un adhesivo sensible a la presión imprimible en pantalla comercialmente disponible de Apollo Adhesives, Tamworth, Staffordshire, RU.

10 La capa 222 hidrófila puede ser, por ejemplo, una película clara con propiedades hidrófilas que promueve la humectación y el llenado de la tira 200 reactiva analítica basada en electroquímica por una muestra de fluido (por ejemplo, una muestra de sangre completa). Tales películas claras están comercialmente disponibles de, por ejemplo, 3M de Mineápolis, Minnesota, EE.UU. La película 224 superior puede ser, por ejemplo, una película clara sobrepuesta por tinta decorativa negra. Una película clara adecuada está comercialmente disponible de Tape Specialities, Tring, Hertfordshire, RU.

15 La capa 218 de reactivo puede incluir cualquier reactivo enzimático adecuado, siendo la selección de reactivos enzimáticos dependiente del analito que va a determinarse. Por ejemplo, si va a determinarse glucosa en una muestra de sangre, la capa 218 de reactivo puede incluir oxidasa o glucosa deshidrogenasa junto con otros componentes necesarios para la operación funcional. Sin embargo, según realizaciones de la presente invención, la
20 capa 218 de reactivo incluye, al menos, una tinta de reactivo enzimático fabricada según una realización de la presente invención.

25 La tira 200 reactiva analítica basada en electroquímica puede fabricarse, por ejemplo, por la secuencial formación alineada de capa 214 de conductor impresa, capa 216 de aislamiento (con ventana 217 de exposición de electrodos que se extiende a su través), capa 218 de reactivo, capa 220 adhesiva estampada, capa 222 hidrófila y película 224 superior sobre sustrato 212 eléctricamente aislante. Puede usarse cualquier técnica adecuada conocida para un experto en la materia para realizar tal formación alineada secuencial, que incluye, por ejemplo, impresión en pantalla, fotolitografía, fotograbado, deposición química de vapor y técnicas de laminación de tiras.

30 **Procedimiento para medir la humectabilidad como altura del gel o volumen del gel**

35 Materiales y reactivos: balanza analítica, navetas de pesaje de vidrio, Scientific Industries Vortex Genie 2, centrífuga oscilante Hettich Universal 16, compases calibradores Mitutoyo Absolute Digimatic, tubos de centrífuga de plástico graduados TPP 91015, agua AnalaR, metanol (calidad espectrofotométrica), material de sílice hidrófobo y tensioactivo según convenga.

40 Metodología: Pesar 0,1 g de material de sílice hidrófobo y, si es apropiado, una cantidad deseada de tensioactivo usando la balanza analítica y navetas de pesaje de vidrio. Transferir el material de sílice hidrófobo, y el tensioactivo si se desea, a un tubo de centrífuga de plástico. Añadir 8 ml de disolución al 30 % (v/v) de metanol/agua. Dispersar el material de sílice hidrófobo y, si está presente el tensioactivo, agitando el tubo de centrífuga y luego agitar con vórtex la mezcla resultante durante 3 minutos usando el ajuste máximo de Scientific Industries Vortex Genie 2. A continuación, colocar el tubo de centrífuga en la centrífuga oscilante Hettich Universal 16 asegurándose de que las cubetas de la centrífuga estén equilibradas. Centrifugar durante 5 minutos a 4.500 rpm.

45 Sacar los tubos de centrífuga y, con los compases calibradores Mitutoyo Absolute Digimatic, medir la altura de la capa de gel (que está en el fondo del tubo) y la altura de la sílice ahumada sin humedecer (parte superior del tubo). Si se desea, la gráfica o ecuación de la FIG. 6 puede emplearse para convertir la altura del gel (en mm) en el volumen del gel (en ml).

50 **Preparación de tinta de reactivo enzimático usando material de sílice hidrófobo**

El siguiente procedimiento se empleó para preparar la tinta de reactivo enzimático a modo de ejemplo descrita en el presente documento.

55 Se preparó una disolución de PVA-antiespumante-ácido cítrico combinando 0,5 ml de antiespumante DC 1500 (comercialmente disponible de BDH/Merck Ltd.) con 7500 gramos de agua (AnalaR, disponible de BDH/Merck Ltd.). A continuación se añadieron 90 gramos de poli(alcohol vinílico) ("PVA", Sigma-Aldrich, MW 85.000-124.000, 87 %-89 % hidrolizado) a la disolución y se homogeneizó a >7000 rpm durante 2 horas. Después de la homogeneización, 81,5 gramos de ácido cítrico se mezclaron en la disolución.

60 Se preparó una disolución de ajuste del pH mezclando 270 gramos de citrato de trisodio en 1000 ml de agua. El pH de la disolución de PVA-antiespumante-ácido cítrico se ajustó entonces a pH 5 añadiendo una cantidad suficiente de la disolución de citrato de trisodio.

65 La disolución de pH 5 se filtró a través de un tamiz de 125 micrómetros y se transfirió a una olla de acero inoxidable de 30 litros. Se añadió agua adicional a la olla de acero de 30 litros hasta que el peso de la disolución total fue 9250

ES 2 446 321 T3

gramos. Entonces se añadieron 44,5 ml de antiespumante DC 1500 a la olla de acero inoxidable. Se añadieron 10 ml de Tergitol a la olla de acero inoxidable.

5 Una mezcladora de palas de 90 mm de diámetro se unió a una mezcladora Dispersmat y se montó en la olla de acero inoxidable de forma que la mezcladora de palas estuviera 2 centímetros por encima del fondo de la olla. La mezcladora se fijó a 800 rpm y luego se añadieron 90 gramos de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (co-polímero PVPNA S-630, comercialmente disponible de ISP Company, y que tiene una relación 60/40 y un peso molecular de 24.000 a 30.000) y 449 gramos de hidroxietilcelulosa ("HEC", comercialmente disponible como Natrosol 250 g), durante los dos primeros minutos de mezcla. A continuación, la velocidad de mezcla aumentó a 5500 rpm y continuó
10 durante cinco minutos adicionales, produciendo una disolución de HEC.

Después del periodo de mezcla, la disolución de HEC se transfirió a un barril de 15 litros y se mezcló suavemente (es decir, se hizo rodar) durante 12 a 25 horas. Entonces se midió la viscosidad y se confirmó que estaba dentro del intervalo de 13.000 a 17.000 cP (medida a 25 °C y 5 rpm).
15

La disolución de HEC rodada se equilibró a entre 7 °C y 10 °C. A continuación, 9000 gramos de la disolución de HEC rodada y equilibrada se mezclaron con 675 gramos de material de sílice hidrófobo (Cab-o-Sil, comercialmente disponible de Cabot Corp., Billerica, Massachusetts, 01821-7001, EE.UU.) en una olla de acero inoxidable de 30 litros para formar una mezcla de HEC/sílice.
20

Una mezcladora de palas de 175 mm de diámetro se unió a la mezcladora Dispersmat y se montó en la olla de acero inoxidable de forma que la mezcladora de palas estuviera en el fondo de la olla. La mezcla de HEC/sílice combinada se mezcló a 2600 rpm durante 16 minutos. Entonces, la densidad de formulación se midió (usando un picnómetro de Cole-Parmer) para determinar que estaba en el intervalo de aproximadamente 0,85 g/cm³ a aproximadamente 1,015 g/cm³.
25

La mezcla de HEC/sílice se transfirió entonces a un barril de 15 litros y se rodó suavemente durante 8 a 16 horas. Entonces se midió la viscosidad y se confirmó que estaba dentro del intervalo de 37.000 a 50.000 cP (medida a 25 °C y 10 rpm).
30

4515 gramos de mezcla de HEC/sílice se combinaron con 1386 gramos de ferrocianuro de potasio y 126 gramos de glucosa oxidasa en una olla de acero inoxidable de 15 litros. Una mezcladora de palas de 125 mm de diámetro se unió a la mezcladora Dispersmat y se montó en la olla de acero inoxidable de forma que la mezcladora de palas estuviera en el fondo de la olla y la mezcla se mezcló a 1500 rpm durante 15 minutos. Después de mezclar, el pH estaba en el intervalo de aproximadamente 4,8 a 5,4 y la viscosidad estaba en el intervalo de aproximadamente 36.000 a 48.000 cP (medida a 25 °C y 10 rpm). Después, la tinta de reactivo enzimático estuvo lista para la impresión en pantalla sobre electrodos y/o sustratos durante la fabricación de tiras reactivas analíticas basadas en 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 así estén cubiertos dispositivos y procedimientos, composiciones y dispositivos dentro del alcance de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fabricar una tinta de reactivo enzimático para su uso en tiras reactivas analíticas, comprendiendo el procedimiento:

- 5 determinar una primera relación entre la humectabilidad de un material de sílice hidrófobo representativo y al menos una primera pendiente de calibración u ordenada en el origen de una tira reactiva analítica que incluye una tinta de reactivo enzimático que contiene el material de sílice hidrófobo representativo, definiendo la primera relación una humectabilidad mínima que proporciona una primera pendiente de calibración aceptable u ordenada en el origen que proporciona determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés;
- 10 determinar una segunda relación que define la humectabilidad de una mezcla de un material de sílice hidrófobo particular y un tensioactivo particular a través de un intervalo de cantidades relativas del material de sílice hidrófobo particular y el tensioactivo particular; y
- 15 combinar, al menos, una cantidad del material de sílice hidrófobo particular, una cantidad del tensioactivo particular, y una cantidad de enzima para formar una tinta de reactivo enzimático;

en el que las cantidades del material de sílice hidrófobo particular y el tensioactivo particular se predeterminan basándose en la segunda relación para proporcionar al menos la humectabilidad mínima definida por la primera relación y, por tanto, una primera pendiente de calibración aceptable u ordenada en el origen que proporciona determinación adecuadamente exacta y precisa de un analito de interés.

- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material de sílice hidrófobo representativo y el material de sílice hidrófobo particular son materiales de sílice ahumada hidrófobos.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el material de sílice hidrófobo representativo y el material de sílice hidrófobo particulares son materiales de sílice hidrófobos no idénticos.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tensioactivo particular es un tensioactivo no iónico.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el tensioactivo no iónico es un tensioactivo no iónico que contiene anillo aromático de éter de poliglicol.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la humectabilidad se determina como altura del gel en una disolución de metanol y agua.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la humectabilidad se determina como volumen del gel en una disolución de metanol y agua.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la tinta de reactivo enzimático es una tinta de reactivo enzimático imprimible en pantalla.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la tira reactiva analítica es una tira reactiva analítica basada en electroquímica configurada para la determinación de glucosa en una muestra de sangre.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enzima es glucosa oxidasa.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad de tensioactivo particular es de forma que el tensioactivo particular esté presente a una concentración de al menos el 0,10 % en v/v cuando se combine con la cantidad de material de sílice hidrófobo particular.
- 50

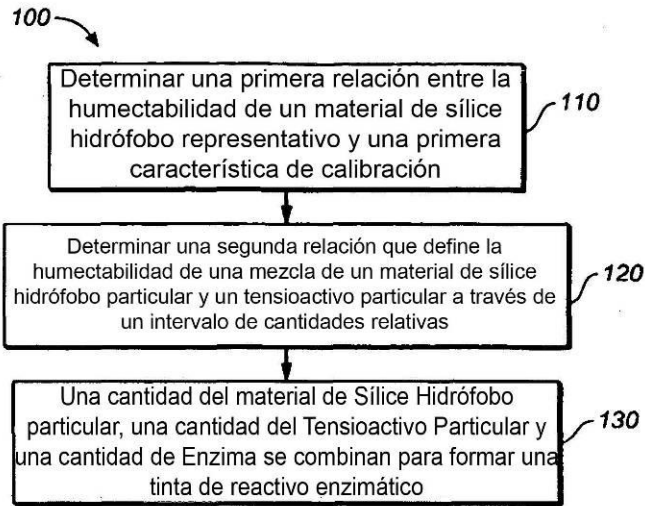


FIG. 1

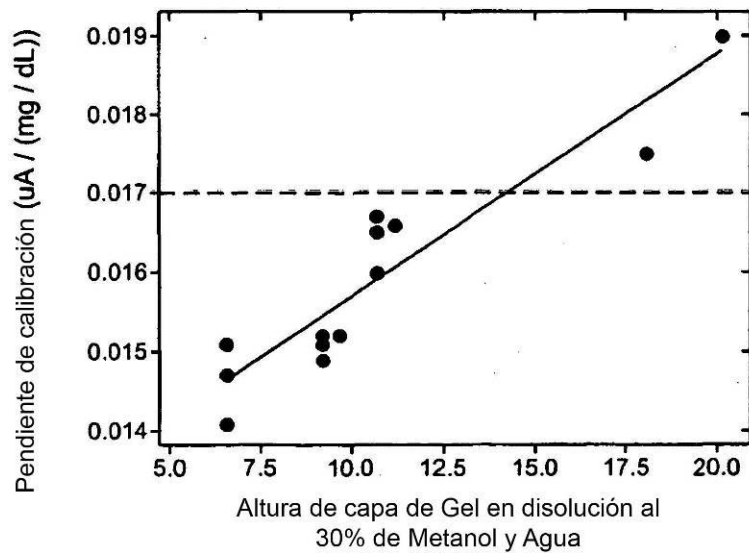


FIG. 2

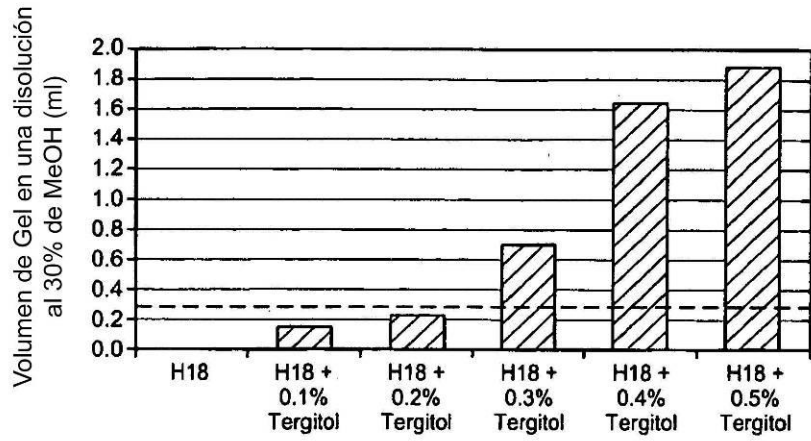


FIG. 3

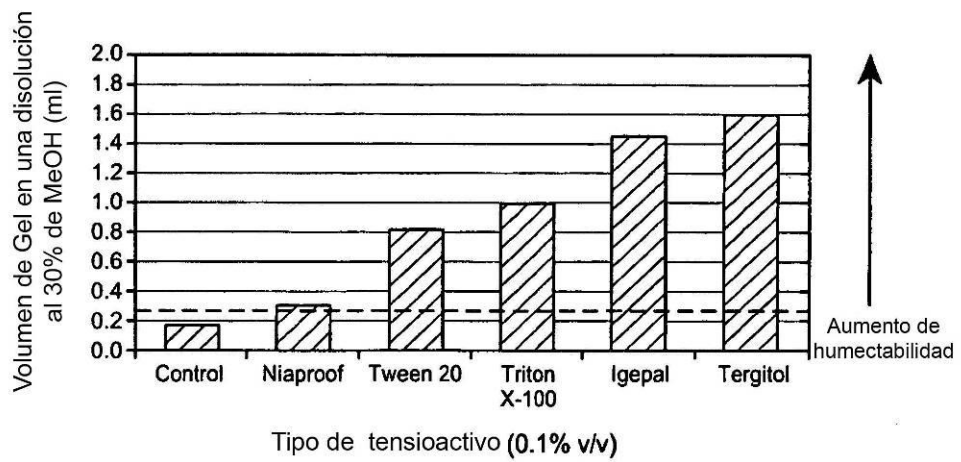


FIG. 4

pendiente de calibración frente a porcentaje de tensioactivo

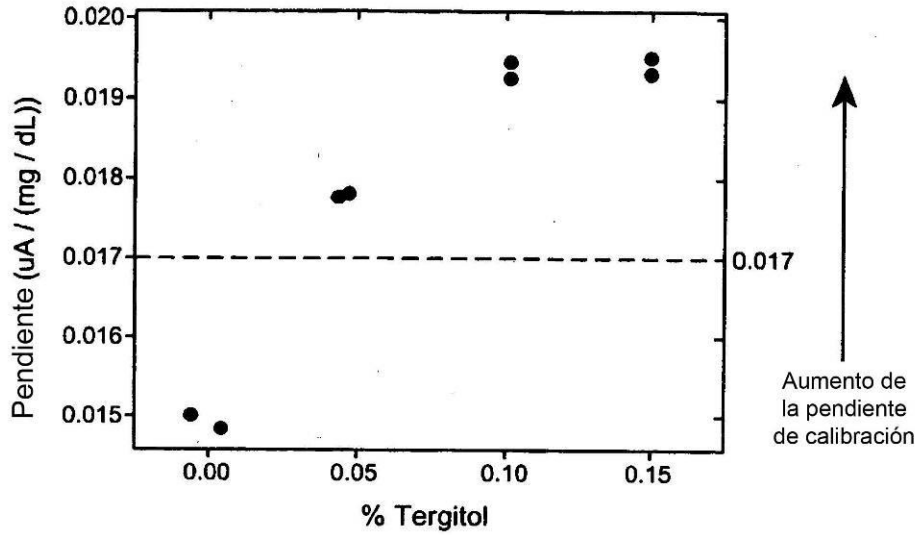


FIG. 5

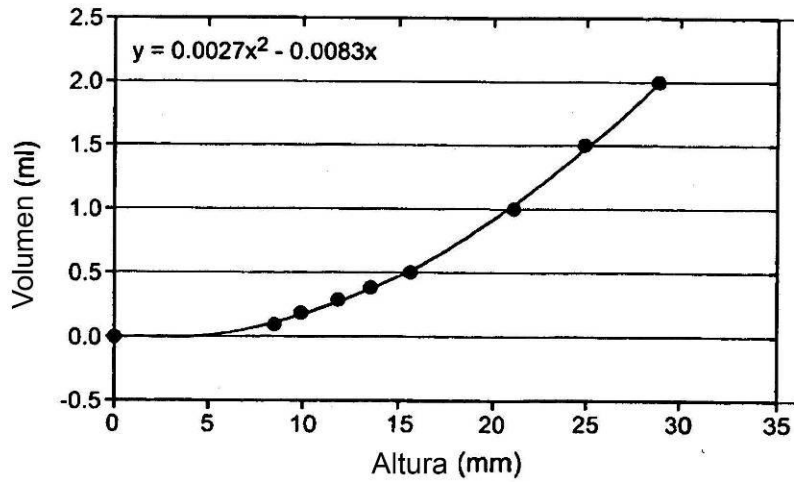


FIG. 7

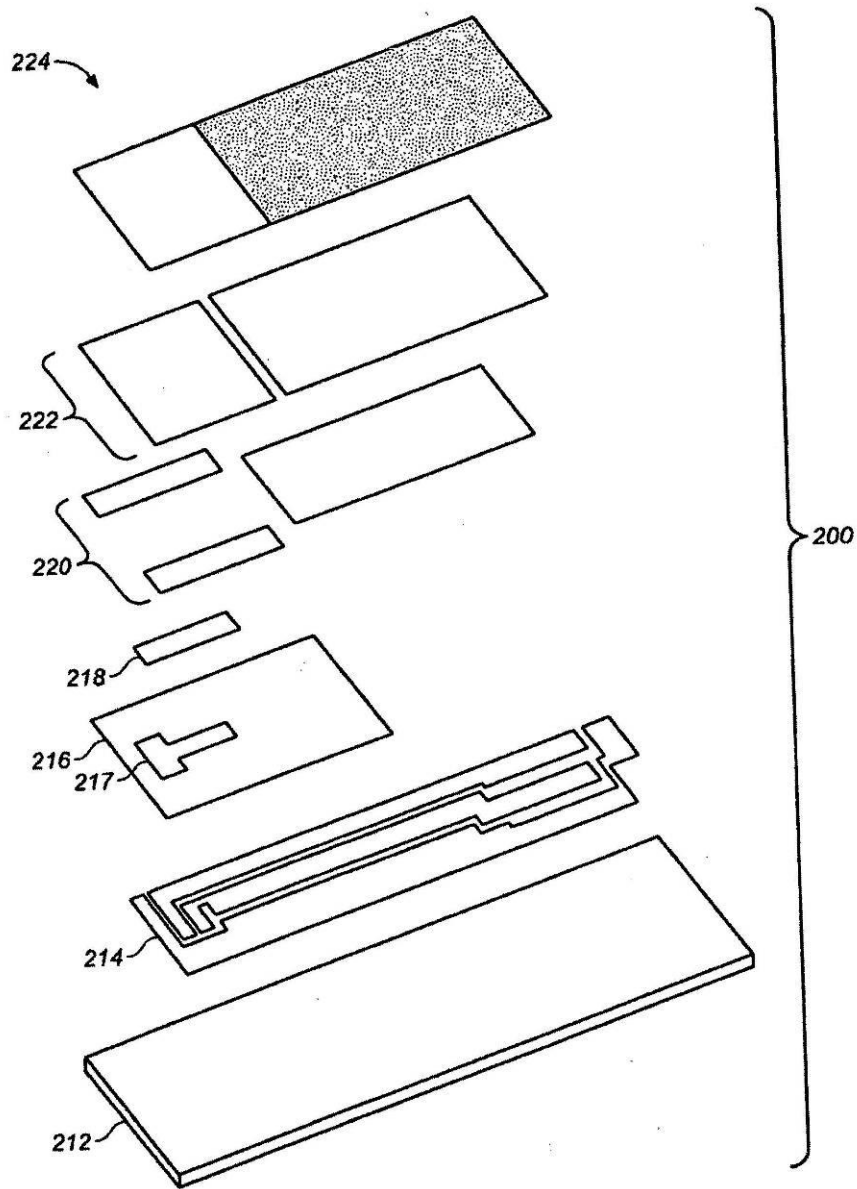


FIG. 6