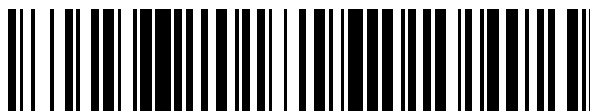


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 229**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 33/32 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011 E 11754712 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2609424**

54 Título: **Tintas reactivas enzimáticas para su uso en tiras reactivas que tiene un código de calibración predeterminado**

30 Prioridad:

23.08.2010 US 861822

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

29.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YOUNG, GARY;
O'CONNELL, MICHAEL;
MCARTHUR, IAN;
MCNEILAGE, ALAN;
PHIPPEN, NICK y
ALVAREZ-ICAZA, MANUEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 539 229 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

Tintas reactivas enzimáticas para su uso en tiras reactivas que tiene un código de calibración predeterminado.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a tintas reactivas enzimáticas, o tintas de enzima, útiles en tiras reactivas electroquímicas. En particular, la invención se refiere a tintas reactivas para su uso en tiras reactivas electroquímicas que tienen un código predeterminado de calibración.

10

Antecedentes de la invención

Las tiras reactivas electroquímicas están diseñadas para medir la concentración de un analito, tal como glucosa, en una muestra de fluido corporal. En el caso de la medición de glucosa en una muestra de sangre, la medición de glucosa se basa en la oxidación selectiva de glucosa, por ejemplo, por la enzima glucosa oxidasa. La glucosa se oxida a ácido glucónico por la forma oxidada de glucosa oxidasa y la enzima oxidada se convierte en su estado reducido. Después, la enzima reducida se vuelve a oxidar mediante reacción con un mediador, tal como ferricianuro. Durante esta re-oxidación, el mediador de ferricianuro se reduce a ferrocianuro.

15

20

Cuando estas reacciones se realizan con un voltaje de ensayo aplicado entre dos electrodos, la re-oxidación del mediador reducido en la superficie de electrodo crea una corriente de ensayo. Ya que, en un ambiente ideal, la cantidad de mediador reducido creado durante la reacción química es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra colocada entre los electrodos, la corriente de ensayo generada es proporcional al contenido de glucosa de la muestra.

25

Los medidores de ensayo que usan este principio permiten a un individuo probar y analizar una muestra de sangre y determinar la concentración de glucosa en sangre en cualquier momento dado. El medidor de ensayo detecta la corriente de glucosa generada y la convierte en una lectura de concentración de glucosa usando un algoritmo que relaciona la corriente de ensayo con una concentración de glucosa por medio de una fórmula matemática simple. En general, los medidores de ensayo funcionan en conjunto con una tira reactiva desechable que incluye una cámara receptora de muestra y al menos dos electrodos dispuestos en la cámara receptora de muestra además de la enzima y el mediador.

30

35

Tal prueba de glucosa que usa un medidor de ensayo y tira reactiva usa información de calibración de lotes sobre la tira reactiva, tal como inclinación de lote y valores de intersección, determinados a partir de la fabricación de un lote particular de tiras. Cuando un usuario realiza una prueba de glucosa usando un tira de un lote particular de tiras, usuario debe introducir la información de la inclinación de lote y la intersección de lote en el medidor de ensayo en forma de un código de calibración si la información varía de lote a lote. Si un usuario olvida explicar un cambio en los factores de calibración cuando usa un lote diferente de tiras reactivas, hay una posibilidad de que pueda ocurrir un resultado impreciso de medición de glucosa. Tal error puede llevar a que el usuario cometa errores en la dosis de insulina dando como resultado un episodio de hipo- o hiperglucemia.

40

45

Para superar esta desventaja de usar tiras reactivas, los fabricantes de tiras reactivas han desarrollado tiras reactivas y métodos para fabricar las tiras, en los que pueden prepararse lotes de tiras reactivas que no requieran que el usuario introduzca ninguna información de calibración antes de realizar una medición de prueba porque puede producirse un alto porcentaje de lotes de tiras reactiva que tienen una inclinación de lote y una intersección de lote relativamente constante. Así, los lotes de tiras reactivas tienen efectivamente la misma calibración y, cuando las tiras de ensayo se usan un medidor para prueba de glucosa fabricado con la información de calibración, no es necesario ningún código de calibración del usuario durante cada uso de las tiras reactivas.

50

55

US 6.241.962 describe una tira reactiva de glucosa desechable para su uso en un medidor de ensayo del tipo que recibe una tira reactiva desechable y una muestra de sangre de un paciente y realiza un análisis electroquímico hecho usando un reactivo integrado no conductor/capa de separación de sangre que contiene un relleno, una enzima efectiva para oxidar glucosa, por ejemplo, glucosa oxidasa, y un mediador efectivo para transferir electrones de la enzima. La formulación de capa integrada se imprime sobre un elemento de carbón conductor para formar un electrodo de trabajo. El relleno se selecciona para que tenga un equilibrio de hidrofobicidad e hidrofiliidad de tal manera que una vez seco forme una red bi-dimensional sobre la superficie del elemento conductor.

60

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una vista en perspectiva, en despiece de una tira reactiva.

La Figura 1B es una vista superior en planta de la tira de la Figura 1A.

65

La Figura 1C es una vista ampliada de una parte de la tira reactiva de la Figura 1A.

La Figura 2 es un diagrama de dispersión de tendencia versus nivel de glucosa de las tintas de los Ejemplos 2 a 6.

La Figura 3 es un gráfico de valores Delta_150 versus área de superficie para las tintas de los Ejemplos 2 a 6.

La Figura 4 es un gráfico de valores Delta_150 versus contenido de carbón para las tintas de los Ejemplos 2 a 6.

10 Descripción detallada de la invención

Es un descubrimiento de la invención que la tendencia, en respuesta a los altos y bajos niveles de glucosa, de un lote de tira de ensayo puede estar impactada por la selección de humos de sílice usados en la tinta de la enzima de las tiras. Más específicamente, es un descubrimiento de la invención que el uso de al menos dos humos de sílice, uno con una mayor área de superficie y contenido de carbón que la otra, en la tinta de enzima de las tiras reactiva proporcionen una tendencia de tira reactiva en los extremos bajo y alto de glucosa que corresponde al rango objetivo deseado proporcionando así un método mejorado para la producción de lotes de tiras reactiva con un único código de calibración con producciones buenas. En una realización, las tiras reactivas del proceso tienen valores de tendencia que corresponden a rangos objetivos predeterminados, por ejemplo, a rangos objetivos predeterminados.

En una realización la invención proporciona una composición de tinta de enzima que comprende, consiste esencialmente en una enzima capaz de reconocer de manera selectiva glucosa en una muestra de sangre, un mediador y uno o más materiales capaces de regular el transporte de masa del mediador de manera que las tendencias en respuesta a uno o más de un valor bajo de glucosa y un valor alto de glucosa corresponde a un objetivo predeterminado para un código de calibración predeterminado.

La invención puede encontrar su mayor utilidad en tintas de enzima para su uso en tiras reactivas con base electroquímica para la determinación de niveles de glucosa en muestras de sangre total. Más preferentemente, las tintas de enzima de la invención se usan en tiras reactivas electroquímicas para medir glucosa, cuyos electrodos tienen electrodos co-planares. Más preferentemente las tintas de la invención se usan en tiras reactivas de tipo ULTRA™ como se desvela en las patentes de Estados Unidos números 5.708.247, 5.95.836 (aquí falta un número), 7.112.265, 6.241.862, 6.284.125, 7.462.265 y publicaciones de patentes de Estados Unidos números 20100112678 y 20100112612.

Las tintas de la invención contienen al menos dos materiales hidrofóbicos de humo de sílice que son químicamente equivalente, lo que significa que los materiales tienen la misma estabilidad y están compuestos de sustancialmente los mismos materiales, pero difieren en área de superficie medida por BET y contenido total de carbón. Por "área de superficie medida por BET" se entiende que el área de superficie BET de sílice hidrofílica.

Los humos de sílice útiles en la invención pueden ser cualquier sílice capaz de proporcionar la respuesta de tendencia deseada en altos y bajos niveles de glucosa. Se cree que esto puede llevarse a cabo usando materiales que regulen el transporte de masa del mediador manteniendo de este modo la funciones del electrodo contador/de referencia a lo largo de la duración del ensayo. Los humos de sílice útiles en la invención están disponibles en el mercado o pueden producirse mediante métodos conocidos tales como quema de tetracloruro de silicio en una llama de oxígeno-hidrógeno o a partir de vaporización de arena de cuarzo en un arco eléctrico. Los sílices adecuados incluyen, sin limitación, aquellos bajo los nombres comerciales HDK® disponible en Wacker Chemie GmbH, CAB-O-SIL® disponible en Cabot y AEROSIL® disponible en Evonik deGussa Ltd. Preferentemente, los humos de sílice usados son sílices HDK.

Un experto en la técnica reconocerá que cualquier material que sea soluble en agua, inerte y pueda modificar el transporte de masa del mediador en la almohadilla reactiva de solvatación de la tira reactiva puede usarse en lugar de humos de sílice. Sin embargo, los sílices pueden proporcionar el mejor material ya que la sílice típicamente se usa en el reactivo y puede mezclarse fácilmente con un segundo sílice.

En la presente invención, un material de sílice con un área de superficie medida por BET de aproximadamente 130 a 170 m²/g y contenido de carbón de aproximadamente 0,8 a 1,2 por ciento de peso se combina con un segundo material de sílice que tiene un área de superficie medida por BET de aproximadamente 270 a 330 m²/g y contenido de carbón de aproximadamente 1,4 a 2,6 por ciento de peso. Para fines de la invención, el área de superficie se calcula usando la teoría BET para adsorción física de moléculas de gas sobre una superficie sólida de acuerdo con el procedimiento de ensayo DIN ISO 9277/DIN 66132. Preferentemente, los humos de sílice usados son sílices HDK y más preferentemente son una combinación de sílices HDK H15 y HDK H30.

La cantidad de cada uno de los sílices usados en la invención es una cantidad efectiva para proporcionar el grado deseado de respuesta de tendencia en uno o ambos de los niveles alto y bajo de glucosa. Típicamente, la cantidad del humo de sílice con la menor área de superficie y la menor cantidad de carbón, tal como HDK H15, será de aproximadamente 99 a aproximadamente 1, preferentemente de 75 a aproximadamente 45 y más

preferentemente de aproximadamente 71 a aproximadamente 68 por ciento de peso de la cantidad total de humo de sílice usado en la tinta de enzima. La cantidad del sílice con la mayor área de superficie y el mayor contenido de carbón, tal como HDK30, será de aproximadamente 1 a aproximadamente 99, preferentemente de 25 a aproximadamente 55, y más preferentemente de aproximadamente 29 a aproximadamente 32 por ciento de peso.

Los humos de sílice pueden combinarse con una enzima y mediador adecuados para formar la tinta reactiva de enzima. Las enzimas útiles son cualquier enzima que sea capaz de reconocer de manera selectiva glucosa en una muestra de sangre y preferentemente sea una enzima de reducción-oxidación (redox) incluyendo, sin limitación, glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa. La glucosa deshidrogenasa puede ser un co-factor de pirroloquinolina quinona o un co-factor de flavín adenín dinucleótido. Más preferentemente, la enzima es glucosa oxidasa. Los mediadores adecuados incluyen sin limitación, ferricianuro, hexamina tricloruro de rutenio o similares. Preferentemente, el mediador es ferricianuro de potasio. Los componentes adicionales de la tinta enzimática pueden ser, sin limitación, un tampón, un promotor de adhesión, preferentemente alcohol de polivinilo ("APV"), una gente formador de película, preferentemente polivinil pirrolidona-acetato de vinilo, un compuesto anti-espuma, un agente gelificante y espesante, preferentemente hidroxietilcelulosa ("HEC"), agua, preferentemente de grado Analar, y combinaciones de los mismos.

Una formulación más preferente de la tinta enzimática de la invención es: aproximadamente 0,3 por ciento por masa de un compuesto anti-espuma; aproximadamente 0,6 por ciento por masa de APV; aproximadamente 0,6 por ciento por masa de ácido cítrico; aproximadamente 1,9 por ciento por masa de citrato trisodio; aproximadamente 0,6 por ciento por masa de copolímero polivinilpirrolidona-acetato de vinilo; aproximadamente 3,27 por ciento por masa de hidroxietilcelulosa; aproximadamente 3,6 por ciento por masa de humo de sílice con un área de superficie medida por BET de aproximadamente 130 a 170 m²/g y contenido de carbón de aproximadamente 1,8 a 1,2% de peso; aproximadamente 1,3 por ciento por masa de un humo de sílice que tiene un área de superficie medida por BET de aproximadamente 270 a 330 y un contenido de carbón de aproximadamente 1,2 a 2,6% de peso; aproximadamente 0,03 por ciento por masa de hexacianoferrato de potasio II; y 23 por ciento por masa de ferricianuro de potasio; y 2,1 por ciento por masa de glucosa oxidasa y aproximadamente 62,4 por ciento por agua en grabeo de masa Analar. La tinta reactiva enzimática de la invención puede estar hecha mediante cualquier proceso convencional.

La tendencia de las tiras de la invención puede calibrarse mediante cualquier método conveniente que incluye sin limitación el siguiente método. Una cantidad, típicamente alrededor de 1500 tiras, se seleccionan aleatoriamente del lote. Se pincha sangre de 12 donantes diferentes en cada uno de los seis niveles de glucosa y se da sangre a ocho tiras de donantes y niveles idénticos para que se realicen $12 \times 6 \times 8 = 576$ pruebas para cada lote. Éstas se comparan con la concentración real de glucosa en sangre midiendo éstas usando un analizador estándar de laboratorio tal como un Yellow Springs Instrument ("YSI"). Se traza un gráfico de concentración de glucosa medida en comparación con la concentración de glucosa real (o corriente medida versus corriente YSI), y se incluye una fórmula $y = mx + c$ mínimos cuadrados en el gráfico para dar un valor para la pendiente de lote m e intercepción de lote c para el resto de las tiras del lote o remesa. La diferencia en respuesta a altos y bajos contenidos de glucosa en sangre puede describirse mediante cualquier método que mida el cambio de tendencia durante un rango operacional. Por ejemplo, la linealidad puede describirse por el término a en la calibración cuadrática $ax^2 + mx + c$, donde m es la pendiente y c es la intercepción de pendiente. Otra medida convenientes es el linealidad métrica Delta 150 que se define como la diferencia entre la tendencia porcentual en 500 mg/dl glucosa y en 150 mg/dl y puede representarse mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Delta}_{150} = \% \text{inclinación}_{500\text{mg/dl}} - \% \text{inclinación}_{150\text{mg/dl}}$$

La cantidad de humos de sílice en la tinta de enzima puede usarse para afectar a la difusión de ferricianuro de potasio en la tira y, así, alterar la eficiencia de electrodo contador-electrodo de referencia. Esto puede usarse para alterar la tendencia en uno o ambos de los niveles altos y bajo de glucosa. Después de fijar la cantidad de humos de sílice, puede realizarse una verificación de que se ha conseguido una linealidad sustancialmente igual a los valores objetivos. Si la linealidad es sustancialmente igual a los valores objetivos, entonces los métodos avanzarán a la producción de lotes a gran escala. Sin embargo, si la segunda linealidad no es sustancialmente igual al rango diana, entonces la proporción de los humos de sílice usados se ajusta y se preparan y prueban más tiras para verificar que las cantidades modificadas proporcionan la tendencia que se desea. Esto puede repetirse si es necesario.

Debería señalarse que otros factores que incluyen, sin limitación, la cantidad de mediador, el lote de tinta conductora, lotes de mediador oxidado, tiempo de mezcla, proceso de mezcla, tiempo de reposo, pre-acondicionamiento del sustrato, tipo de malla, deformabilidad de malla, longitud de electrodo de trabajo, área de electrodo de trabajo, separación de electrodo de trabajo y distancia de periodo, pueden afectar a uno o ambos de la pendiente de intercepción e lote. Estos pueden controlarse para ser suficientemente idénticos durante cada ciclo de manera que se obtengan una pendiente e intercepción sustancialmente constantes de lote a lote. Preferentemente, el área del electrodo de trabajo y la cantidad de mediador reducido se controlan, como lo describe la publicación de patente de Estados Unidos N° 20090208743A1- para conseguir una constante e intercepción sustancialmente constantes.

Una tira reactiva que usa la tinta de enzima de la invención puede fabricarse usando cualquier método conocido conveniente incluyendo, sin limitación, impresión en red, impresión en pantalla y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la tira puede fabricarse mediante formación secuencial alineada de una capa conductora marcada, capa de aislamiento, capa reactiva, capa adhesiva marcada, capa hidrofóbica y una película superior en un sustrato eléctricamente aislante.

Una impresión en red ejemplar es del siguiente modo. Se usa un sustrato que puede ser nylon, policarbonato, poliimida, cloruro de polivinilo, polietileno, polipropileno, poliéster glicolado, poliéster y combinaciones de los mismos. Preferentemente, el sustrato es poliéster, más preferentemente Melinex ST328, que es fabricado por DuPont Teijin Films. Antes de entrar en una o más estaciones de impresión, el sustrato puede pre-acondicionarse para reducir la cantidad de expansión y elasticidad que puede ocurrir en el proceso de fabricación de tiras. En la etapa de pre-acondicionamiento, el sustrato puede calentarse a una temperatura, que no excederá en los siguientes pasos de impresión. Por ejemplo, el sustrato puede calentarse a aproximadamente 160 °C. Generalmente, el calentamiento tiene lugar bajo tensión de aproximadamente 150N y 180N, más típicamente alrededor de 165N. Alternativamente, en el pre-acondicionamiento del sustrato puede calentarse a una temperatura suficiente para eliminar la elasticidad irreversible, de nuevo opcionalmente mientras está bajo tensión como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, el sustrato se mantiene bajo una tensión de aproximadamente 165N a lo largo del proceso con el fin de mantener el registro de las capas que se imprimirán. El sustrato también se somete a varias temperaturas de aproximadamente 140 °C o menos con el fin de secar las tintas secas durante cada etapa de impresión. Opcionalmente, antes de la impresión puede usarse un sistema de limpieza que limpia, o imprime, el lado superior y el lado inferior del sustrato usando un sistema de vacío y cepillado.

Pueden usarse una o más impresiones con carbón con partículas metálicas, tinta de plata/cloruro de plata o tintas basadas en paladio o cualquier combinación de las mismas en una etapa de impresión para proporcionar una capa de electrodo. En una realización, antes del proceso de impresión e inmediatamente después del secado, el sustrato pasa sobre un primer rodillo frío, para enfriar rápidamente el sustrato a una temperatura predeterminada, típicamente a temperatura ambiente de alrededor de 18-21 °C y típicamente 19,5 °C +/- 0,5 °C. Después de que los patrones de carbón impreso se hayan depositado en el proceso de impresión, el sustrato puede pasar sobre un segundo rodillo frío.

Puede usarse cualquier tinta adecuada para su uso como una tinta de aislamiento y aplicable en una estación de impresión en un proceso de fabricación de red sin limitación, Ercon E6110-116 Jet Black Insulayer Ink, que puede comprarse en Ercon, Inc. Inmediatamente después del secado, el sustrato, incluyendo el carbón impreso y los patrones de aislamiento, pasa sobre un tercer rodillo frío como se ha descrito anteriormente.

Después tiene lugar una primera impresión con tinta de enzima usando una tinta de la invención. Después del primer proceso de impresión con tinta de enzima e inmediatamente después del secado, el sustrato, que incluye carbón impreso y patrones de aislamiento, pasa sobre un cuarto rodillo frío. Puede proporcionarse una o más humidificación de lado superior, lado inferior o lateral. Por ejemplo, una disposición de tuberías puede proporcionar una corriente de aire humidificado sustancialmente constante por arriba, por abajo y por lo lados en el sustrato y capas asegurando que el contenido de agua de la tinta se mantenga en un nivel constante. La cantidad y disposición de humidificación, típicamente tuberías que transportan aire humidificado, dependerán, entre otras cosas, de la cantidad de humidificación requerida, el contenido de agua de la tinta, la humedad y temperatura del aire circundante, la temperatura del sustrato cuando se acerca a la estación de impresión enzimática, la temperatura del rodillo de impresión, el tamaño de la pantalla y la exposición de la pantalla al aire no humidificado que lo rodea.

La Figura 1A es una vista en perspectiva en despiece de una tira reactiva ejemplar 100, que puede incluir siete capas dispuestas en el sustrato 5. La Figura 1B es una vista ejemplar superior en planta de las capas individuales de la Figura 1A. Las siete capas dispuestas en el sustrato 5 pueden ser una capa conductora 50, que también puede referirse como una capa de electrodo 50, una capa de aislamiento 16, dos capas reactivas superpuestas 22a y 22b, una capa adhesiva 60, una capa hidrofílica 70 y una capa superior 80.

Para la tira reactiva 100, como se ilustra en las Figura 1A, 1B y 1C, la capa conductora 50 puede incluir un electrodo de referencia 10, un primer electrodo de trabajo 12, un segundo electrodo de trabajo 14, una primera almohadilla de contacto 13, una segunda almohadilla de contacto 15, una almohadilla de contacto de referencia 11, una primera trayectoria de electrodo de trabajo 8, una segunda trayectoria de electrodo de trabajo 9, una trayectoria de electrodo de referencia 7 y una barra de detección de tira 17. La capa conductora puede estar formada por tinta de carbón. La primera almohadilla de contacto 13, la segunda almohadilla de contacto 15 y la almohadilla de contacto de referencia 11 pueden estar adaptadas para conectarse eléctricamente a un medidor de ensayo. La primera trayectoria de electrodo de trabajo 8 proporciona una secuencia eléctricamente continua desde el primer electrodo de trabajo 12 a la primera almohadilla de contacto 13. Similarmente, la segunda trayectoria de electrodo de trabajo 9 proporciona una secuencia eléctricamente continua desde el segundo electrodo de trabajo 14 a la segunda almohadilla de contacto 15. Similarmente, la trayectoria del electrodo de referencia 7 proporciona una secuencia eléctricamente continua desde el electrodo de referencia 10 a la almohadilla de contacto de referencia 11. La barra

de detección de barra 17 está eléctricamente conectada a la almohadilla de contacto de referencia 11. Un medidor de ensayo puede detectar que la tira reactiva 100 se ha insertado apropiadamente midiendo una continuidad entre la almohadilla de contacto de referencia 11 y una barra de detección de tira 17, como se ilustra en las Figura 1A, 1B y 1C.

5 La capa de tinta de enzima puede estar dispuesta sobre una parte de la capa conductora 50, sustrato 5, una capa de aislamiento 16 como se ilustran en las Figura 1A y 1B. En una realización, dos capas sucesivas de tinta de enzima 22a y 22b pueden estar impresas en pantalla en la capa conductora 50, típicamente superponiéndose también ligeramente a la capa de aislamiento 16. Para la tira reactiva 100, la capa adhesiva 60 puede incluir una
10 primar almohadilla adhesiva 24, una segunda almohadilla adhesiva 26, una tercera almohadilla adhesiva 28, como se ilustra en las Figura 8^a a 8F y 9. La capa adhesiva 60 puede depositarse en la tira reactiva 100 después de la deposición de capa reactiva 22. La primera almohadilla adhesiva 24 y la segunda almohadilla adhesiva 26 pueden estar alineadas para estar inmediatamente adyacentes a, o tocar, o parcialmente superponerse a la capa reactiva 22. La capa adhesiva 60 puede incluir un adhesivo sensible a la presión de copolímero acrílico con base de agua que está disponible en el mercado en Tape Specialties LTD, que está localizado en Tring, Herts, Reino Unido (parte #A6435). La capa adhesiva 60 está dispuesta en una parte de la capa de aislamiento 16, capa conductora 50 y sustratos 5. La capa adhesiva 60 se une a la capa hidrofílica 70 en la tira reactiva 100.

20 La capa hidrofílica 70 puede incluir una parte hidrofílica distal 32 y una parte hidrofílica proximal 34, como se ilustra en las Figuras 8A y 8B. La capa hidrofílica 70 puede ser un poliéster que tenga una superficie hidrofílica tal como un revestimiento anti-vaho, que está disponible en el mercado en 3M.

25 La capa final que se añadirá a la tira reactiva 100 es la capa superior 80, como se ilustra en las Figuras 1A y 1B. La capa superior 80 puede incluir una parte clara 36 y una parte opaca 38, como se ilustra en las Figuras 1A y 1B. La parte superior 80 está dispuesta y adherida a la capa hidrofílica 70. La capa superior 80 puede ser un poliéster que tenga un revestimiento adhesivo en un lado. Debería señalarse que la parte clara 36 sustancialmente se superpone a la parte hidrofílica distal 32, lo que permite al usuario confirmar visualmente que la cámara receptora de muestra 92 puede llenarse de manera suficiente. La parte opaca 38 ayuda al usuario a observar un alto grado de contraste entre una fluido coloreado tal como, por ejemplo, sangre dentro de la cámara receptora de muestra 92 y
30 la parte opaca 38.

La invención se aclarará además tomando en consideración los siguientes ejemplos no limitativos.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Se empleó el siguiente procedimiento para preparar una tinta enzimática ejemplar de la invención.

40 Se preparó una solución de ácido cítrico anti-espuma APV combinando 0,5 ml de Antiespuma DC 1500 (disponible en BDH/Merek Ltd.) con 7500 gramos de agua (AnalaR, disponible en BDH/Merck Ltd.). Después se añadieron 90 gramos de APV (Sigma-Aldrich, PM 85.000-124.000, 87%-89% hidrolizado) a la solución y se homogenizaron a >7000 RPM durante 2 horas. Después de la homogenización, 81,5 gramos de ácido cítrico se mezclaron en la solución.

45 Se preparó una solución ajustadora de pH mezclando 270 gramos de citrato trisodio en 1000 ml de agua. El pH de la solución de ácido cítrico anti-espuma APV se ajustó después a pH 5 añadiendo una cantidad suficiente de solución de citrato trisodio.

50 La solución con pH 5 se filtró a través de un tamiz de 125 micrones y se transfirió a un bote de acero inoxidable de 30 litros. Se añadió más agua al bote de acero de 30 litros hasta que el peso total de la solución fue 9250 gramos. Después se añadieron 4,5 mL de Anti-espuma DC 1500 al bote de acero inoxidable.

55 Una cuchilla mezcladora de 90 mm de diámetro se unió a la mezcladora Dispersmat y se montó en el bote de acero inoxidable para que la cuchilla mezcladora estuviera 2 centímetros por encima de la parte inferior del bote. La mezcladora se fijó a 800 RPM y después se añadieron 90 gramos de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (copolímero PVP/AV S-630, disponible en el mercado en ISP Company, y que tiene una proporción 60/40 y una peso molecular de 24.000 a 30.000) y 449 gramos de HEC (disponible en el mercado como Natrosol 250G) durante los dos primeros minutos de la mezcla. Después, la velocidad de la mezcla aumentó a 5500 RPM y continuó durante
60 cinco minutos más, dando como resultado una solución de HEC.

Después del periodo de mezcla, la solución de HEC se transfirió a un barril de 15 litros y se mezcló suavemente (eso es, se estiró) durante 12 a 25 horas. Después se midió la viscosidad y se confirmó que estaba en el rango de 13.000 a 17.000 cP (medido a 25 °C y 5 RPM).

La solución de HEC estirada se equilibró entre 7 °C y 10 °C. Después, 9000 gramos de la solución de HEC estirada y equilibrada se mezclaron con 446 gramos de material de sílice hidrofóbica H15 y 209 gramos de material de sílice hidrofóbica H30 (grado Wacker HDK, disponible en el mercado en Wacker Chemie AG) en un bote de acero inoxidable de 30 litros para formar una mezcla HEC/sílice.

Una cuchilla mezcladora de 175 mm de diámetro se unió a la mezcladora Dispersmat y se montó en el bote de acero inoxidable para que la cuchilla estuviera en la parte inferior del bote. La mezcla combinada de HEC/sílice se mezcló a 2600 RPM durante 16 minutos. Después se midió la densidad de la formulación (usando un picnómetro Cole-Palmer) para determinarse en el rango de desde 0,9650-1,0150 g/cm³.

La mezcla de HEC-sílice se transfirió después a un barril de 15 litros y se estiró suavemente durante 8 a 16 horas. Después se midió la viscosidad y se confirmó que estaba entre 37.000 y 50.000 cP (medida a 25 °C y 10 RPM).

Se combinaron 415 gramos de mezcla de HEC-sílice con 1386 gramos de ferricianuro de potasio, 1,6 g de hexacianoferrato 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 para que la cuchilla estuviera en la parte inferior del bote y la mezcla se mezcló a 1500 RPM durante 15 minutos. Después de mezclar, el pH estaba en el rango de aproximadamente 4,8 a 5,4 y la viscosidad estaba en el rango de aproximadamente 36.000 a 48.000 cP (medida a 25 °C y 10 RPM).

Ejemplos 2 a 6

El métodos del Ejemplo 1 se usó para preparar tintas de enzima excepto en que las cantidades de humos de sílice usadas fueron las expuestas en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1

Ejemplo	%H30 Área de superficie Contenido de Carbón	%H15 Área de superficie Contenido de Carbón	Mezcla Área de superficie Contenido de Carbón
2	0% 300 m ² /g 2	100% 150 m ² /g 1	--- 150 m ² /g 1
3	100% 300 m ² /g 2	0% 150 m ² /g 1	--- 300 m ² /g 2
4	20% 300 m ² /g 2	80% 150 m ² /g 1	--- 180 m ² /g 1,2
5	50% 300 m ² /g 2	50% 150 m ² /g 1	--- 225 m ² /g 1,5
6	80% 300 m ² /g 2	20% 150 m ² /g 1	--- 270 m ² /g 1,8

Las tiras se fabricaron usando la tinta de enzima de acuerdo con el proceso expuesto en la especificación antes mencionada. Las tiras se calibraron seleccionando aleatoriamente 1500 tiras. Se pinchó sangre de 12 donantes diferentes a cda uno de los 6 niveles (50, 100, 150, 200, 300 y 500 mg) de glucosa y se dio sangre a 8 tiras de donantes y niveles idénticos de manera que se realizaron un total de 12 x 6 x 8 = 576 pruebas para cada lote. Éstas se compararon con la concentración real de glucosa en sangre midiendo éstas usando un analizador estándar de laboratorio, un Yellow Springs Instrument 2300 ("YSI"). Se trazó un gráfico de concentración de glucosa medida en comparación con la concentración de glucosa real (o corriente medida versus corriente YSI), y se incluyó una fórmula $y = mx+c$ mínimos cuadrados en el gráfico para dar un valor para la pendiente de lote m e intercepción de

lote c. Además, se calcularon la tendencia (nivel de 50 mg) y la tendencia porcentual (niveles 100-500 mg) para cada nivel de glucosa junto con Delta_150 para la mezcla de tinta de cada ejemplo. La tendencia, la tendencia porcentual y Delta_150 se muestran en la Tabla 2 más abajo. Un diagrama de dispersión o tendencia porcentual versus nivel de glucosa se muestra en la Figura 2.

5

Tabla 2

10

Ej.	Tendencia media (50 mg) % tendencia (100-500 mg)						Delta 150
	50	100	150	200	300	500	
2	-4,2	-6,1	-5,4	-4,7	-5,2	-9,4	-4,1
3	-7,3	-10,0	-7,2	-4,2	-1,9	0,6	7,7
4	-5,9	-8,8	-7,2	-6,6	-5,8	-8,7	-1,6
5	-6,2	-8,5	-6,5	-4,9	-3,9	-4,4	2,1
6	-6,4	-8,6	-5,6	-3,4	-0,8	0,5	6,2

15

20

Los resultados demuestran que las tintas de enzima con mayores niveles de humo de sílice H30 produjeron mayores lecturas de glucosa en 500 mg/dl produciendo un valor pequeño de tendencia. Las tintas con poco o nada de H30 tuvieron lecturas más bajas de glucosa en 500 mg/dl. Un gráfico de Delta_150 trazado en comparación con el área efectiva normal del humo de sílice conseguido con la mezcla H30-H50 como el preparado y la regresión resultante se muestra en la Figura 3.

25

Se muestra una fuerte correlación entre Delta_150 y el área específica. Un gráfico de Delta_150 trazado en comparación con el contenido porcentual de carbón de cada grado (H30 y H15) asumiendo que los grados contenían la cantidad nominal de carbón para ese grado y la regresión resultante se muestran en la Figura 4. El mismo valor alto de R-cuadrado de 99,6% indica una fuerte correlación entre Delta_150 y el contenido de carbón.

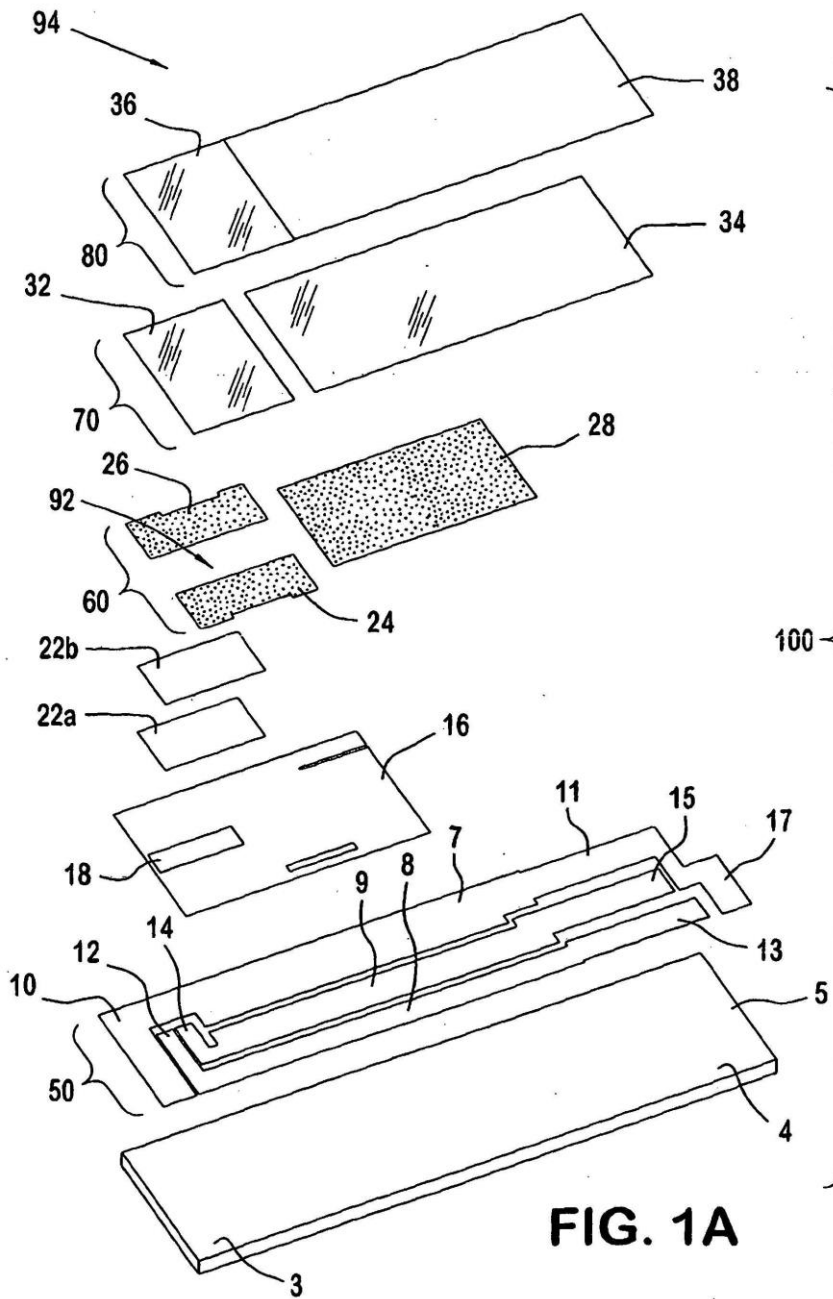
30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de tinta de enzima, que comprende una enzima capaz de reconocer de manera selectiva una glucosa en una muestra de sangre, un mediador y una primer y segundo humo de sílice, donde el primer humo de sílice comprende un área de superficie medida por BET de aproximadamente 130 a 170 m²/g y un contenido de carbón de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,23 por ciento de peso y el segundo humo de sílice comprende una superficie medida por BET de aproximadamente 270 a 330 m²/g y un contenido de carbono de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,6 por ciento de peso.
- 10 2. La tinta de enzima de la reivindicación 1, donde el primer humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 99 a 1 por ciento de peso de la cantidad total de los humos de sílice y el segundo humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 99 por ciento de peso.
- 15 3. La tinta de enzima de la reivindicación 1, donde el primer humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 75 a 45 por ciento de peso de la cantidad total de los humos de sílice y el segundo humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 55 por ciento de peso.
- 20 4. La tinta de enzima de la reivindicación 1, donde la enzima se selecciona del grupo consistente en glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa con un co-factor de pirroloquinolina quinona, y glucosa deshidrogenasa con un co-factor de flavín adenín dinucleótido y el mediador se selecciona del grupo consistente en ferricianuro y hexamina tricloruro de rutenio.
- 25 5. La tinta de enzima de la reivindicación 1, donde la enzima es glucosa oxidasa y el mediador es ferricianuro.
- 30 6. Una tinta de enzima de la reivindicación 1, que comprende aproximadamente 0,3 por ciento por masa de un compuesto anti-espuma, aproximadamente 0,6 por ciento por masa de alcohol de polivinilo, aproximadamente 0,6 por ciento por masa de ácido cítrico, aproximadamente 1,9 por ciento por masa de citrato trisodio, aproximadamente 0,6 por ciento por masa de copolímero polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, aproximadamente 3,27 por ciento por masa de hidroxietilcelulosa, aproximadamente 3,6 por ciento por masa de un primer humo de sílice con un área de superficie medida por BET de aproximadamente 130 a 170 m²/g y contenido de carbón de aproximadamente 1,8 a 1,23 por ciento de peso, aproximadamente 1,3 por ciento por masa de un segundo humo de sílice con un área de superficie medida por BET de aproximadamente 270 a 330 m²/g y un contenido de carbón de aproximadamente 1,2 a 2,6 por ciento de peso, aproximadamente 0,03 por ciento por masa de hexacianoferrato de potasio II, aproximadamente 23 por ciento por masa de ferricianuro de potasio; aproximadamente 2,1 por ciento por masa de glucosa oxidasa y aproximadamente 62,4 por ciento por masa de agua.
- 35 7. Una tira reactiva que comprende al menos dos electrodos co-polares, donde al menos uno de los electrodos comprende una composición de tinta de enzima que comprende una enzima capaz de reconocer de manera selectiva una glucosa en una muestra de sangre, un mediador y una primer y segundo humo de sílice, donde el primer humo de sílice comprende un área de superficie medida por BET de aproximadamente 130 a 170 m²/g y un contenido de carbón de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,23 por ciento de peso y el segundo humo de sílice comprende una superficie medida por BET de aproximadamente 270 a 330 m²/g y un contenido de carbono de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,6 por ciento de peso.
- 40 8. La tira reactiva de la reivindicación 7, donde el primer humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 99 a 1 por ciento de peso de la cantidad total de los humos de sílice y el segundo humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 99 por ciento de peso.
- 45 9. La tira reactiva de la reivindicación 7, donde el primer humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 75 a 45 por ciento de peso de la cantidad total de los humos de sílice y el segundo humo de sílice está presente en una cantidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 55 por ciento de peso.
- 50 10. La tira reactiva de la reivindicación 7, donde la enzima se selecciona del grupo consistente en glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa con un co-factor de pirroloquinolina quinona, y glucosa deshidrogenasa con un co-factor de flavín adenín dinucleótido y el mediador se selecciona del grupo consistente en ferricianuro y hexamina tricloruro de rutenio.
- 55 11. La tira reactiva de la reivindicación 7, donde la enzima es glucosa oxidasa y el mediador es ferricianuro.
- 60 12. La tira reactiva de la reivindicación 7, donde la tinta de enzima comprende aproximadamente 0,3 por ciento por masa de un compuesto anti-espuma, aproximadamente 0,6 por ciento por masa de alcohol de polivinilo, aproximadamente 0,6 por ciento por masa de ácido cítrico, aproximadamente 1,9 por ciento por masa de citrato trisodio, aproximadamente 0,6 por ciento por masa de copolímero polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, aproximadamente 3,27 por ciento por masa de hidroxietilcelulosa, aproximadamente 3,6 por ciento por masa de un primer humo de sílice con un área de superficie medida por BET de aproximadamente 130 a 170 m²/g y contenido
- 65

ES 2 539 229 T3

- 5 de carbón de aproximadamente 1,8 a 1,23 por ciento de peso, aproximadamente 1,3 por ciento por masa de un segundo humo de sílice con un área de superficie medida por BET de aproximadamente 270 a 330 m²/g y un contenido de carbón de aproximadamente 1,2 a 2,6 por ciento de peso, aproximadamente 0,03 por ciento por masa de hexacianoferrato de potasio II, aproximadamente 23 por ciento por masa de ferricianuro de potasio; aproximadamente 2,1 por ciento por masa de glucosa oxidasa y aproximadamente 62,4 por ciento por masa de agua.



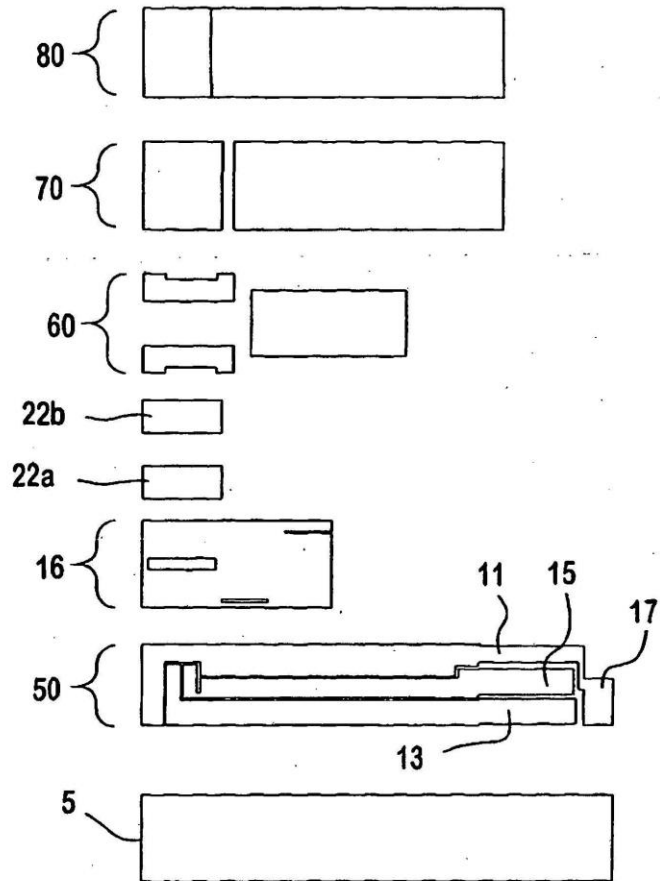


FIG. 1B

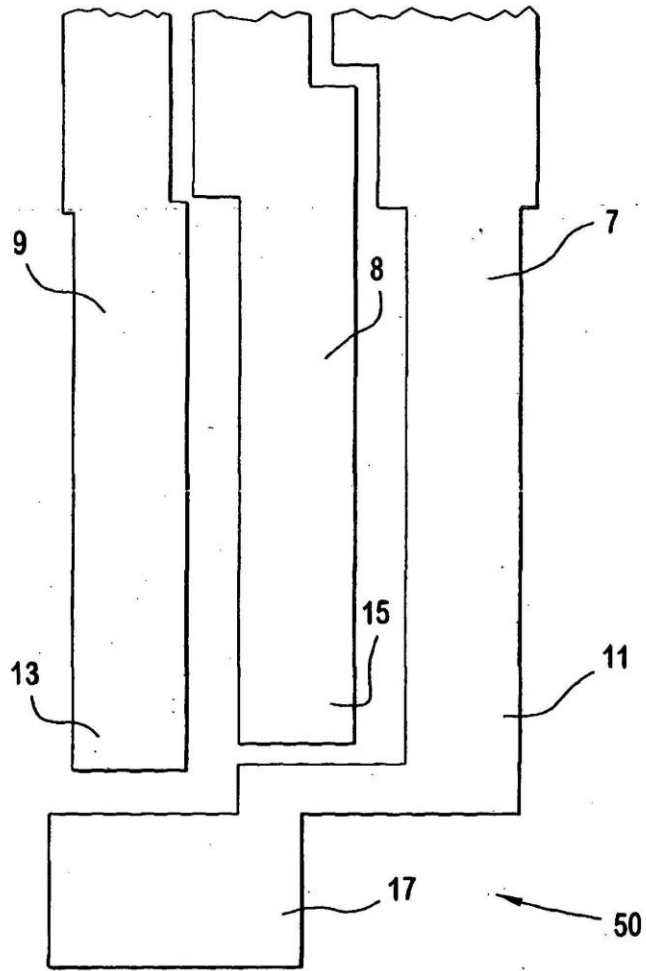


FIG. 1C

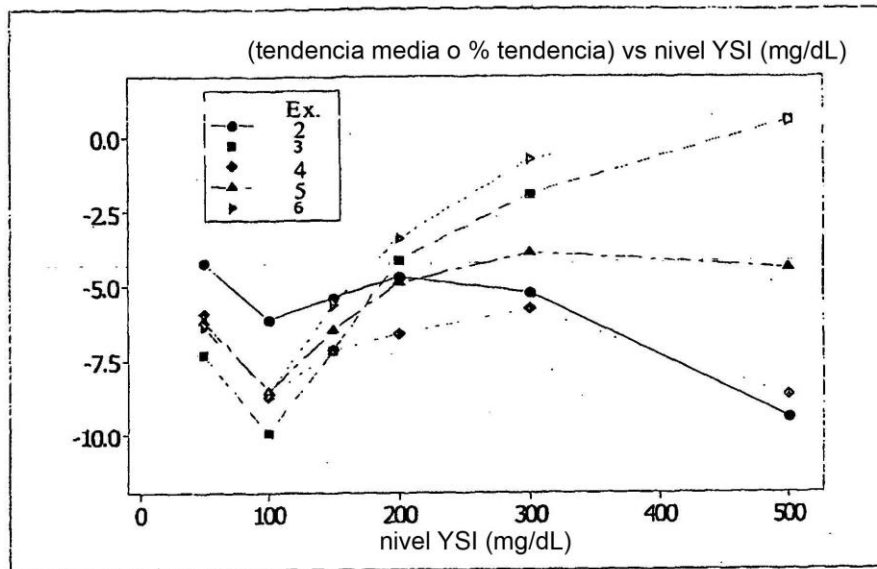


FIG. 2

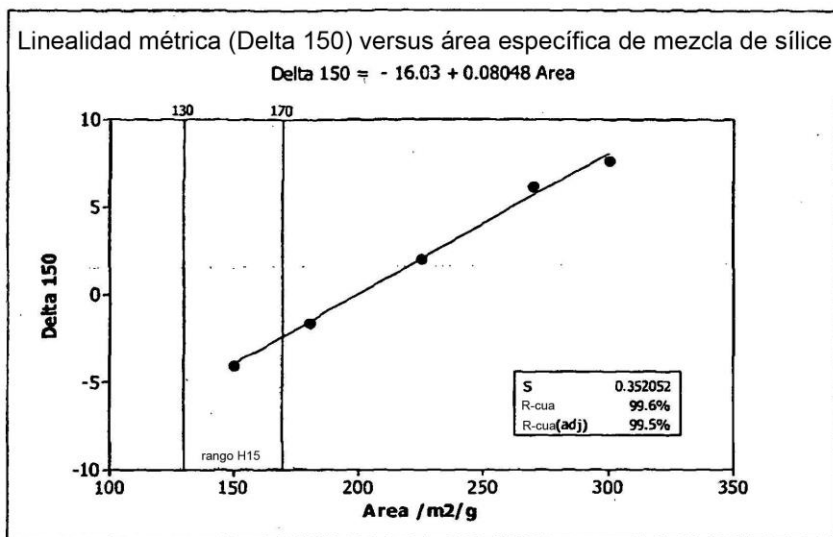


FIG. 3

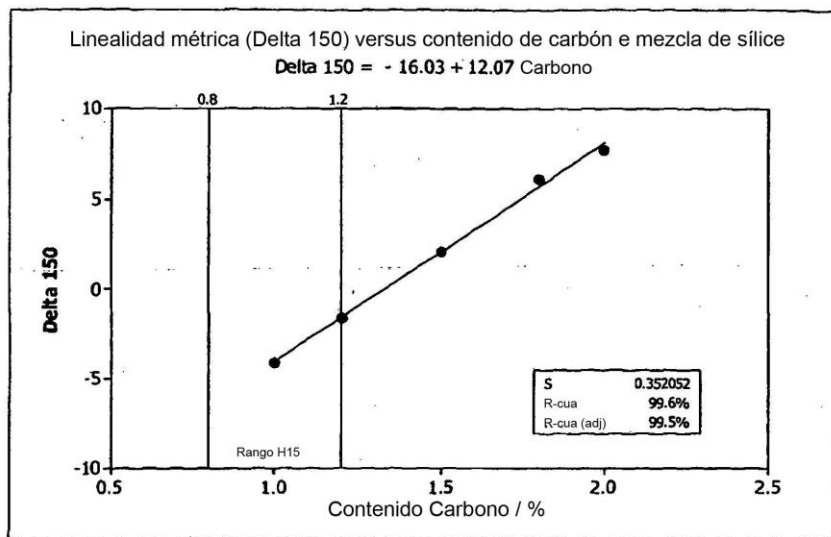


FIG. 4