



(18) ES	(11) NUMERO 456.935	(19) A I
	(22) FECHA DE PRESENTACION 17-3-1977	

PATENTE DE INVENCION

P.- 65.192  
Docket No.  
11676

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 667.981	18-3-76	E.U.A.
724.365	17-9-76	"

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(61) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(84) TITULO DE LA INVENCION

"DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE UN COMPONENTE EN UNA MUESTRA"

(91) SOLICITANTE (S)

MILES LABORATORIES, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana 46514, Estados Unidos de América

(92) INVENTOR (ES)

Katharine Gentry Johnston y Jerome Greyson

(93) TITULAR (ES)

(94) REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

1 Campo de la invención.

La presente invención se refiere al análisis de un componente en una muestra de ensayo, según el cual un sistema reaccionante produce una respuesta detectable por contacto con el componente, y donde la producción de la respuesta detectable cesa tras haber pasado un período de tiempo predeterminado.

5 Discusión de la técnica anterior.

Los campos de la física y química del diagnóstico se han expandido a velocidad fenomenal durante los pasados 25 años, de manera que, especialmente en el área médica, la diagnosis de parámetros de sistema se puede hacer con facilidad y velocidad increíbles.

Una de tales áreas de expansión ha sido la de diagnósticos médicos con los que numerosas funciones corporales se pueden estudiar simplemente sumergiendo una tira cargada de reactivo en una muestra de fluido corporal, tal como orina, y observando una respuesta detectable, tal como una aparición o cambio de color, o un cambio de la cantidad de luz reflejada o absorbida por la tira.

De forma compatible con tales métodos de "sumergir y leer", se han originado numerosas químicas para detectar componentes de fluidos corporales. La mayoría de ellos producen una respuesta detectable que es cuantitativa o al menos semicuantitativa. Así, midiendo la respuesta tras un tiempo predeterminado, el analista puede obtener no solo una indicación positiva de la presencia de un constituyente concreto en un fluido corporal, sino también una estimación de cuánto del constituyente está presente. Por tanto, tales tiras proporcionan al médico una herramienta de fácil diagnós-

1 tico, así como la capacidad de calibrar la magnitud de la  
enfermedad o mal función corporal.

5 Son ilustrativos de tales tiras, actualmente en  
uso, los productos disponibles de la Ames Company Division  
de Miles Laboratories, Inc. bajo las marcas registradas  
CLINISTIX<sup>®</sup>, MULTISTIX<sup>®</sup>, KETOSTIX<sup>®</sup>, N-MULTISTIX<sup>®</sup>, DIAS-  
TIX<sup>®</sup>, PHENISTIX<sup>®</sup>, DEXTROSTIX<sup>®</sup> y otros. Los dispositivos  
10 de ensayo tales como estos comprenden usualmente una o más  
matrices de soporte, tal como papel absorbente, que tienen  
respectivamente absorbido sobre ellas un sistema reaccionan-  
te concreto que manifiesta un cambio o aparición de color  
en presencia de un componente específico de la muestra de  
ensayo. Dependiendo del sistema reaccionante específico in-  
corporado en una matriz concreta, estos dispositivos pueden  
15 detectar la presencia de glucosa, albúmina, cetonas, bili-  
rrubina, sangre oculta, nitrito, urobilinógeno, concentra-  
ción de ión hidrógeno (pH) o similares. La aparición de un  
color específico, y su intensidad observable, dentro de un  
intervalo específico de tiempo tras poner en contacto la ti-  
ra con la muestra, es indicativo de la presencia de un com-  
ponente concreto y su concentración en la muestra. Algunos  
20 de estos dispositivos de ensayo y sus sistemas reaccionan-  
tes se exponen en las patentes de los Estados Unidos  
3.123.443 (CLINISTIX<sup>®</sup>), 3.212.855 (KETOSTOX<sup>®</sup>); 3.814.668,  
3.164.534 y 2.981.606 (DIAS-<sup>®</sup>TIX), y 3.092.465, 3.298.789,  
25 3.164.534 y 2.981.606 (DEXTROSTIX<sup>®</sup>).

30 Típicamente, los ensayos con reactivo de diagnós-  
tico, tales como las tiras de reactivo para "sumergir y leer",  
están acompañados por instrucciones detalladas impresas que  
se han de seguir cuidadosamente, para asegurar la exactitud.

1 En el caso de que la respuesta detectable sea un cambio de  
color se requiere un cuidado particular. Se proporciona un  
diagrama de colores variables para comparación con la tira  
y, dado que en la mayoría de los casos lo cuantitativo del  
5 dispositivo depende de determinar el grado de formación de  
color respecto al tiempo, es imperativo que el cambio de co  
lor se compare con el gráfico dentro de un intervalo de  
tiempo predeterminado tras sumergir en la muestra. Se han de  
observar exactamente los periodos de espera, teniendo una  
10 lectura demasiado temprana el resultado de una formación de  
color demasiado pequeña, y teniendo una lectura demasiado  
tardía el resultado de una formación de color demasiado in  
tensa, o incluso la aparición de un color ajeno que inter  
fiere. Por tanto, si la formación de color se compara con  
15 el diagrama de color demasiado pronto o demasiado tarde, se  
puede obtener, y a menudo se obtiene, un resultado inexac  
to.

En un intento de eliminar el carácter crítico de  
una observación de tiempos exacta en la lectura, lo que es  
20 tanto inconveniente como potencialmente inexacto, se empen  
dió un extenso programa de investigación para hallar la ma  
nera de evitar la necesidad de observar tiempos en la lec  
tura de dispositivos de ensayo de la técnica anterior. Pri  
mordialmente se buscaba la manera de que la producción de  
25 una respuesta detectable se terminase automáticamente tras  
un tiempo predeterminado, y de que la respuesta permanecie  
se constante durante periodos de almacenamiento relativamen  
te largos. Así, la comparación del diagrama de color se po  
dría hacer a la conveniencia del usuario, o en un momento  
30 alejado de la puesta real en contacto del dispositivo con la

1 muestra. Durante largo tiempo ha habido en la técnica de la  
química del reactivo para diagnóstico el consenso de opinión  
de que tales dispositivos de ensayo reforzarían teatralmen-  
te el estado de la técnica. Sin embargo, hasta la fecha no  
5 se ha propuesto ninguno que proporcione con éxito la solu-  
ción esperada desde hace tiempo. Es decir, ninguno hasta  
el descubrimiento de la presente invención.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

10 En breve, la presente invención se refiere a una  
composición de ensayo, un dispositivo de ensayo y un méto-  
do para prepararlos, y un método para determinar la presen-  
cia de un componente en una muestra. La composición compren-  
de un sistema reaccionante que se interacciona con el com-  
15 ponente, por contacto, produciendo una respuesta detectable,  
y un sistema inhibidor que, por contacto con la muestra,  
impide que el sistema reaccionante siga experimentando in-  
teracción con el componente tras haber pasado un tiempo pre-  
determinado. El dispositivo de ensayo comprende una matriz  
de soporte incorporada con la composición de ensayo. El mé-  
20 todo para determinar la presencia de un componente en una  
muestra comprende poner en contacto una muestra de ensayo,  
sospechosa de contener el componente, con una matriz de so-  
porte incorporada con la composición de ensayo, incubar la  
matriz que contiene la composición y muestra de ensayo, du-  
25 rante un tiempo predeterminado, y observar una respuesta de-  
tectable.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención incorpora muchas formas de  
química del diagnóstico, incluyendo sistemas reaccionantes

1 conocidos actualmente en uso, tales como indicadores de pH  
y otras concentraciones de ión, y sistemas reactivos más  
complejos, tales como los usados para determinar componen-  
5 tes de fluido corporal. Estos son idealmente adecuados para  
y compatibles con los conceptos expuestos en la presente.  
Por tanto, todos los dispositivos de ensayo para diagnósti-  
co de la técnica anterior, para sangre oculta, glucosa, bi-  
lirrubina, nitrógeno de urea en sangre, urea bacteriana,  
urobilinógeno, colesterol, proteína y otros, se pueden mo-  
10 dificar según las enseñanzas presentes.

La presente invención estriba en utilizar ventajoso-  
samente sistemas reaccionantes conocidos o nuevos, de tal  
manera que la interacción entre el componente de la muestra  
y el sistema reaccionante deje de tener lugar tras un inter-  
15 valo de tiempo predeterminado. Así, se ve que el cuanto de  
respuesta detectable es fijo para cualquier sistema reaccio-  
nante dado: un color formado en la interacción ni aumenta  
ni se desvanece; la cantidad de un producto sensible a la  
luz ultravioleta formada o consumida por la interacción per-  
20 manece constante.

Los efectos actualmente descritos se pueden con-  
seguir de numerosas maneras. Una manera preferida es propor-  
cionar un sistema inhibidor que impida físicamente que si-  
ga la interacción, formando un gel, polímero o superficie  
25 endurecida, evitando así el contacto físico entre el siste-  
ma reaccionante y el componente tras haber pasado el inter-  
valo de tiempo predeterminado.

Otra manera es proporcionar en la composición de  
ensayo un sistema inhibidor que desactive al sistema reac-  
30 cionante. Así, en el caso de que una enzima lábil al calor

1 sea crítica para el funcionamiento del sistema reaccionante, el sistema inhibidor puede adoptar la forma de un agente generador de calor que eleve la temperatura de la composición de ensayo, hasta el punto en que la enzima quede desactivada, tras haber pasado el intervalo de tiempo predeterminado.

5  
10. Aún otra manera es proporcionar un sistema inhibidor que envenene o interfiera químicamente con uno o más componentes del sistema de reacción, suprimiendo así la interacción con el componente de la muestra tras el tiempo predeterminado. Estos y otros sistemas inhibidores están dentro del ámbito de la presente invención, siendo el factor crucial la capacidad del sistema inhibidor para permitir la interacción entre el sistema reaccionante y el componente en el momento del contacto entre la muestra y la composición de ensayo, pero impedir tal interacción en algún momento posterior, previamente fijado.

15  
20 Si se desea un sistema inhibidor que impida físicamente la interacción sistema reaccionante/componente, es decir, un sistema inhibidor que endurezca o gelifique, hay muchas vías disponibles. Entre los materiales gelificables o endurecibles que se pueden emplear están aquellos que son rápidamente reactivos a temperatura ambiente, y que empiezan a reaccionar, o se inician, por contacto con la muestra de ensayo. Estas composiciones inhibidoras han de endurecer o gelificar a una velocidad suficiente para inhibir la producción de respuesta detectable tras un lapso de tiempo relativamente corto. Es igualmente deseable que el inhibidor gelificado o endurecido disuada o impida más cambios de color, u otra disipación de la respuesta detectable.

25  
30

1 Son típicos de tales sistemas inhibidores los po-  
límeros solubles en agua polimerizables o reticulables, mez-  
clas de epóxido/poliamina, poliisocianatos reactivos con  
5 agua, ésteres acrilato y acrilato sustituido polimerizables  
con ión hidroxilo, mezclas de poli(alcohol vinílico) con di-  
versos compuestos metálicos (p.ej. boratos, vanadatos, Cr  
(III) y Ti (IV)), carboximetilcelulosa sódica y Al (III),  
mezclas de poli(alcohol vinílico) con compuestos polifenó-  
10 licos (p.ej. resorcina, catequina, floroglucina, y coloran-  
tes y sales de diazonio), una mezcla de poli(alcohol viníli-  
co) y dimetilolurea con catalizador de cloruro amónico, mez-  
clas de dimetilolurea con hidroxialcoholcelulosa y copolíme-  
ros de anhídrido maleico hidrolizado o poli(ácido acrílico),  
mezclas de poli(alcohol vinílico)/compuesto polialdehídico,  
15 complejos de polivinilpirrolidona [es decir, con sustancias  
tales como poli(ácidos carboxílicos), un copolímero de éter  
metil-vinílico/anhídrido maleico disponible de GAF Corpora-  
tion, o un poli(ácido acrílico)], mezclas de copolímero áci-  
do/polietilenglicol, y mezclas de poli(alcohol vinílico) con  
20 agentes precipitadores (p.ej.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ).

El retraso en la polimerización o reticulación del  
polímero soluble en agua se puede conseguir aislando los  
iniciadores del polímero soluble en agua, hasta que la com-  
posición de ensayo se haya puesto en contacto con la mues-  
25 tra de ensayo. Una manera de conseguir tal separación entre  
polímero e iniciador es encapsular el iniciador en micro-  
cápsulas solubles en agua, o en microcápsulas que se rompen  
por humedecimiento. Por tanto, las microcápsulas de gelati-  
na que contienen el iniciador se disolverían por contacto  
30 con una muestra de ensayo acuosa, liberando así el inicia-

1 dor para seguir polimerizando al polímero soluble en agua.

5 Las microcápsulas que se rompen por humedecimiento comprenden paredes membranosas semipermeables, osmóticamente frágiles, que encapsulan a una fase acuosa que contiene el iniciador. La fase acuosa tiene una densidad relativa, respecto a la muestra de ensayo, relativamente grande. Cuando se ponen en contacto las cápsulas con la muestra de ensayo, hay un gradiente osmótico a través de la membrana, lo que causa un aumento de presión dentro de la cápsula, 10 suficiente para romper sus paredes liberando así el iniciador.

15 La inhibición física por separación entre el sistema reaccionante y el componente se puede conseguir también con un sistema inhibidor que comprende un epóxido y una fuente de poliamina desactivada, que produce poliaminas disponibles por contacto con agua. Son típicas de tales fuentes de poliamina las cetiminas y los tamices moleculares impregnados con una poliamina. En el primer caso, la cetimina reacciona con agua formando poliamina y una cetona. En el último 20 caso, el agua puede entrar en la retícula del tamiz molecular y desplazar a la poliamina.

25 Alternativamente, en la composición de ensayo se puede incorporar un poliisocianato expandible por agua, tal como Hypol <sup>®</sup>, disponible de la Dewey and Almy Chemical Division de W.R. Grace & Co.

30 De los sistemas inhibidores de acrilato catalizados por base o ión hidroxilo, los ésteres de 2-cinoacrilato son especialmente adecuados para la presente invención. Estos ésteres son componentes esenciales en los adhesivos manufacturados por la Eastman Kodak Company, y son rápidamente

1 polimerizables en presencia de agua, produciendo polímeros  
duros. Los ésteres metílico o etílico son los que están pri-  
mordialmente disponibles en formulaciones de adhesivo comer-  
ciales, tal como de Kodak, conteniendo los adhesivos, además  
5 de los ésteres, estabilizantes y espesantes. El 2-cianoacri-  
lato de metilo está contenido en el Eastman 910, y el 2-cia-  
noacrilato de etilo es el éster primordial del Eastman 910  
EM.

10 El poli(alcohol vinílico), cuando se mezcla con  
ácido bórico, gelifica rápidamente en presencia de álcali,  
tal como hidróxido sódico, y por tanto es adecuado como sis-  
tema inhibidor. Un método preferido para utilizar esta al-  
ternativa es incorporar el álcali en la composición de en-  
sayo en forma de microcápsulas solubles en agua u osmótica-  
mente frágiles. Así, cuando entran en contacto con la mues-  
tra de ensayo, todos los reactivos del sistema inhibidor  
15 se combinan, y la formación de un gel detiene el análisis.

Además de ser útil con bórax (ácido bórico y ál-  
cali), el poli(alcohol vinílico) también gelifica con una  
20 variedad de otros iones y sales metálicos, estando entre  
ellos los vanadatos, el cromo trivalente y el titanio te-  
travalente. Por ejemplo, el oxalato de potasio titanio  
( $\text{TiO}(\text{C}_2\text{O}_4\text{K})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y otros titanatos orgánicos insolubili-  
zan rápidamente al poli(alcohol vinílico) a temperatura am-  
25 biente, a un pH por encima de aproximadamente 7. Adicional-  
mente, el poli(alcohol vinílico) forma geles térmicamente  
reversibles con compuestos polifenólicos tales como resor-  
cina, catequina, floroglucina y ciertos colorantes y sales  
de diazonio.

30 El poli(alcohol vinílico) es adicionalmente útil

1 en la presente invención por su capacidad para reticularse,  
mediante formación de acetal, con 1,3-bis-hidroximetilurea  
(dimetilolurea) y compuestos semejantes, en presencia de  
5 cloruro amónico. Como en muchos de los sistemas anteriores,  
el catalizador o iniciador ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) se puede aislar por me-  
dios tales como microencapsulación.

Los aldehidos polifuncionales también reaccionan  
con poli(alcohol vinílico) formando grupos acetal reticula-  
dores. En esta técnica, un catalizador ácido, tal como áci-  
10 do oxálico u otro ácido compatible con el sistema reaccio-  
nante, se incorpora en la composición de ensayo y el alde-  
hido se aísla del poli(alcohol vinílico), tal como por mi-  
croencapsulación. Desde luego, se puede aislar el ácido en  
vez del aldehido, siempre que este último sea lo suficiente-  
15 mente no reactivo hacia el poli(alcohol vinílico) en ausen-  
cia del catalizador.

Se ha hallado que los precipitados polímeros son  
útiles en la presente invención como sistema inhibidor. Es-  
tos están ejemplificados por la precipitación de poli(alco-  
20 hol vinílico) de solución, por sales tales como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  
 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Además, los ácidos polímeros tales como el  
poli(ácido acrílico) pueden ser precipitados de una solu-  
ción o gelificados por sales acetato de metales pesados, u  
otras fuentes solubles en agua de iones divalentes, así co-  
25 mo por polietilenglicol.

La hidroxipropilcelulosa (KLUCEL<sup>®</sup>), disponible de  
Hercules, Inc.) es otro polímero que se presta para el sis-  
tema inhibidor de la presente composición de ensayo. Este  
material se puede reticular con polímeros ácidos tales como  
30 copolímeros de anhídrido maleico hidrolizado o poli(ácido  
acrílico), por uso de compuestos tales como dimetilolurea,

1 preferiblemente en presencia de un pH bajo.

Otro sistema de gelificación útil en la composición de ensayo es la carboximetil-celulosa sódica y el ión Al (III).

5 EL GANTREZ <sup>®</sup> AN, un copolímero de éter metilvinílico/anhidrido maleico disponible de GAF Corporation, es aplicable a la composición de ensayo de diversas maneras. Forma un complejo insoluble con polivinilpirrolidona a un  
10 pH menor que aproximadamente 5. El poli(ácido acrílico) se comporta de forma similar al GANTREZ <sup>®</sup> AN con polivinilpirrolidona. El GANTREZ <sup>®</sup> AN también forma un complejo insoluble con gelatina en solución ácida. Análogamente, el GANTREZ <sup>®</sup> AN y otros polímeros y copolímeros ácidos son precipitados por compuestos tales como glicoles, poli(alcohol  
15 vinílico), hidroxialcoholcelulosa y diaminas.

Como se ha indicado antes, otros sistemas inhibidores están bien dentro del ámbito de la presente invención. Así, se puede emplear un sistema inhibidor distinto de aquellos que separan físicamente al sistema reaccionante y el  
20 componente a analizar. Por ejemplo, una enzima que sea lábil al calor no funcionará en un sistema reaccionante si la temperatura del sistema se hace lo suficientemente alta para desactivarla. Por tanto, se puede impedir que una composición de ensayo que contenga tal enzima produzca una respuesta detectable tras un tiempo predeterminado, por uso de un  
25 sistema inhibidor generador de calor.

Análogamente, el sistema inhibidor puede comprender un veneno del sistema reaccionante. Por ejemplo, las enzimas que contienen grupos mercapto (-SH) son desactivadas  
30 por Hg (II), y las enzimas, en general, se desactivan en

1 presencia de ácidos y bases fuertes, tales como HCl y NaOH.  
Son ejemplos de enzimas que son inhibidas por Hg (II) la  
glutamato-descarboxilasa, lactato-deshidrogenasa, malato-des-  
5 hidrogenasa, mioquinasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa áci-  
da (pH 5,2), aldehído-oxidasa, diaminoácidooxidasa,  $\beta$ -amila-  
sa, carbónico-anhidrasa, colinesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glu-  
curonidasa, homogentizado-oxidasa, 3-hidroxiantranilato-oxi-  
dasa, e invertasa. Así, la presente invención abarca la in-  
10 corporación de tales sistemas inhibidores en la composición  
de ensayo.

Las enzimas lábiles al calor tales como la sali-  
cilato-hidroxilasa están igualmente dentro del ámbito de la  
presente invención. Entre los materiales que producen ca-  
lor por contacto con una muestra de ensayo acuosa se inclu-  
15 yen el NaOH,  $AlCl_3$ ,  $TiCl_3$ , aluminio-alcoholos, y otros.

Una manera de retrasar la desnaturalización o el  
envenenamiento de una enzima es aislar el sistema inhibidor  
productor de calor, o venenoso, con microcápsulas. Así, se  
pueden elegir materiales de encapsulación solubles en agua  
20 tales que los materiales productores de calor no se estén  
expuestos a la muestra hasta después de haberse disuelto el  
material de encapsulación. Son adecuados para encapsulación  
los materiales solubles en agua tales como gelatina, acríla-  
midas, copolímeros de estireno/ácido maleico, e hidroxipro-  
25 pil celulosa, y mezclas tales como un coacervado de gelati-  
na y polímeros naturales o sintéticos.

Como se ha indicado antes, las microcápsulas de  
diversas clases se prestan especialmente bien para la pre-  
sente invención cuando los ingredientes han de estar tempo-  
30 ralmente separados. Se pueden preparar por una variedad de

1 métodos bien conocidos. Es indicativo de ellos el método  
descrito en Angew. Chem. Internat. Edit., 14:539 (1975), y  
las referencias citadas allí. Las técnicas tales como poli-  
5 condensación interfacial, coacervación y similares produci-  
rán microcápsulas. Otras técnicas, tales como centrifugación,  
secado por pulverización, y otras técnicas físicomecánicas,  
hallarán utilidad, igualmente, en la preparación de las mi-  
crocápsulas.

10 La policondensación interfacial es un método pre-  
ferido para preparar las microcápsulas, debido a la relativa  
facilidad que proporciona. En esta técnica se hace que  
dos especies reactivas (comonómeros u oligómeros) reaccio-  
nen en la interfase de un sistema de fases múltiples. Allí  
15 tiene lugar la policondensación, formando una delgada pelí-  
cula polímera que es insoluble en los medios que contienen  
los monómeros. Se han preparado microcápsulas adecuadas, del  
tipo osmóticamente frágil, disolviendo un primer componente  
comonómero, tal como una amina polifuncional, en una fase  
20 acuosa que contiene la sustancia a aislar. Esta fase acuo-  
sa es preferiblemente una con gran densidad relativa u os-  
molaridad en relación al intervalo de osmolaridad de la  
muestra a analizar. Luego se dispersa o emulsifica esta fa-  
se acuosa en una fase inmisible con agua, tal como un acei-  
te mineral. Luego se añade a la suspensión o emulsión un se-  
25 gundo comonómero, tal como un haluro de ácido polifuncional.  
Cuando los comonómeros son aminas y haluros de ácido poli-  
funcionales, se forman microcápsulas de poliamida, cada una  
de las cuales contiene una porción de la fase acuosa, es de-  
cir, la sustancia aislada.

30 Material polímero adecuado, útil para formar la

1 pared de membrana semipermeable, osmóticamente frágil, de las microcápsulas incluye, además de la poliamida, el poliéster, poliuretano, poliurea y similares.

5 Otra manera de preparar ingredientes del sistema inhibidor, cuando uno de los ingredientes es soluble en agua y el otro en disolventes orgánicos, consiste en utilizar un procedimiento de "dos inmersiones". Así, la matriz de soporte de un dispositivo de ensayo se incorpora primero en una solución acuosa de un ingrediente, se seca, y subsiguientemente se incorpora en una segunda solución, del otro ingrediente, en un disolvente orgánico.

10 En algunos de los sistemas inhibidores antes descritos, que no requieren aislamiento de ingredientes, tales como los que utilizan 2-cianoacrilatos, isocianatos expandibles por agua, y reactivos de epóxido, se ha de tener cuidado en excluir la humedad, tanto durante la preparación de la composición y el dispositivo de ensayo como en el almacenamiento antes del uso final. Así se impide la polimerización del sistema inhibidor hasta el contacto con la muestra de ensayo.

15 Los sistemas inhibidores de gelificación o endurecimiento, tipificados por ciertos de los antes mencionados, junto con un sistema reaccionante deseado, se pueden incorporar en una matriz de soporte por cualquier medio adecuado para producir el dispositivo de ensayo de la presente invención. Así, se puede sumergir una matriz de soporte en una solución única de todos los ingredientes de los sistemas reaccionante e inhibidor. Alternativamente, cuando se requiere un método de "dos inmersiones" debido a la necesidad de aislar ingredientes, la matriz, alternativamente, se su-

20

25

30

1 merge, seca y vuelve a sumergir como se ha descrito antes.  
En el caso de que se empleen microcápsulas, se pueden fi-  
jar a la matriz por uso de adhesivos. Entre los que resul-  
tan ser particularmente deseables están el acetato de ce-  
5 lulosa, acetatobutirato de celulosa, hidroxipropilcelulosa  
y polivinilpirrolidona. Los adhesivos deben ser inmiscibles  
con la muestra de ensayo, y permitir que la muestra se absor-  
ba en la matriz de soporte.

10 Materiales adecuados que se pueden usar como ma-  
triz de soporte del dispositivo de ensayo incluyen papel,  
celulosa, madera, copos de resina sintética, fibra de vidrio  
y otros papeles sintéticos, fieltro de polipropileno, telas  
no tejidas y tejidas, y similares. La matriz se fija venta-  
15 josamente, por cualquier medio adecuado, a un miembro de so-  
porte usual, tal como una tira de polímero, para facilitar  
el uso.

20 En el método de usar el dispositivo de ensayo, la  
matriz que tiene incorporados en ella los sistemas reaccio-  
nante e inhibidor se sumerge en la muestra de ensayo. Se  
deja que pase el intervalo de tiempo predeterminado apropia-  
do para el dispositivo, y luego se analiza el dispositivo  
para observar la respuesta detectable. Cuando la respuesta  
es formación o cambio de color, el dispositivo se puede com-  
25 parar con un diagrama patrón de color. Si la respuesta com-  
prende un cambio de reflectancia de luz, el dispositivo se  
examina en un instrumento apropiado de medida de luz, tal  
como los bien conocidos en la técnica.

30 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar  
más y aclarar la presente invención. Sin embargo, se ha de  
entender que estos solo sirven para ejemplificar realizacio-

1 nes actualmente preferidas, y no se han de interpretar en modo alguno como limitativos del ámbito de la invención.

EJEMPLO 1

5 Una solución al diez por ciento en peso, en cloroformo, de adhesivo Eastman 910 que contiene 2-cianoacrilato de metilo (Eastman Chemical Products, Inc., Kingsport, Tennessee, subsidiaria de Eastman Kodak Compant), se preparó y almacenó en un recipiente de vidrio muy bien tapado. Se preparó un dispositivo de ensayo para detectar glucosa en orina (similar al CLINISTIX<sup>®</sup>), de la siguiente manera. Papeles de filtro Whatman 3MM se impregnaron con una solución de reactivo de ensayo, como se ilustra en las patentes de los EE.UU. nº 2.981.606 y 3.154.534, y luego se secaron. Específicamente, la formulación fué como sigue:

15 Formulación de CLINISTIX<sup>®</sup>

Agua destilada	758,1 ml
Etanol 95%	205,0 ml
Carageenan Viscarin, manufacturado por Marine Colloids, In.	2,5 g
20 Polivinilpirrolidona	25,0 g
Colorantes (FD&C 384)	0,29 g
o-tolidina.2HCl	5,0 g
Acido cítrico (anhid.)	15,42 g
Citrato sódico	67,92 g
25 GANTREZ <sup>®</sup> AN-139	7,5 g
Tensioactivo	2,5 g
Glucosa oxidasa	76,0 ml
Peroxidasa	0,5 g

30 Porciones de este papel impregnado se impregnaron luego adicionalmente con las soluciones antes descritas.

1 Otros se trataron con cloroformo solo, como control. El re-  
cipiente de impregnación permitía que el papel entrara y  
5 saliera, pero estaba cubierto para reducir la evaporación  
del cloroformo, al tiempo que permitía que el exceso de so-  
lución de impregnación escurriese del papel en una atmósfe-  
ra rica en disolvente, dentro del recipiente. Tras retirar  
el papel del baño se dejó que el disolvente se evaporase  
durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente, en una at-  
mósfera de baja humedad controlada ( $< 10\%$  HR). El papel im-  
10. pregnado de monómero se almacenó en la atmósfera oscura se-  
ca, y subsiguientemente se montó en un respaldo de plástico  
y se escindió al formato usual de tira de reactivo. Las ti-  
ras preparadas se almacenaron luego en botellas de vidrio  
oscuro, en presencia de adsorbente de humedad de gel de sí-  
lice.

15 Las tiras así producidas se evaluaron sumergiéndolo  
las individualmente durante tres (3) segundos en muestras  
de orina de concentración de glucosa conocida (0, 50, 100,  
200 y 500 mg/dl), eliminando el exceso de muestra e intro-  
20. duciéndolas en un aparato medidor de reflectancia. Las lec-  
turas de reflectancia a 680 nm se registraron en función del  
tiempo, desde  $t = 15$  segundos, incluyendo el tiempo de in-  
mersión, durante 3,5 minutos. En la Tabla I se muestran los  
cambios de los valores de reflectancia a intervalos, y los  
25. valores de la reflectancia final, para el papel específico  
para glucosa impregnado con 10% de Eastman 910, a las va-  
rias concentraciones de glucosa. El cambio de reflectancia  
a 15 seg es la diferencia del valor de la reflectancia cuan-  
do no hay glucosa presente. Es evidente que no se observa  
30. cambio del valor de la reflectancia tras dos (2) minutos.

Estos colores finales se pueden diferenciar visualmente con claridad, y continúan permaneciendo estables durante periodos de varios días a varias semanas, dependiendo de las condiciones de almacenamiento.

Las tiras de ensayo que solo se impregnaron con cloroformo (controles) desarrollaron colores muy intensos 10 segundos tras sumergir, pero el desarrollo de color continuó rápidamente, y tras dos minutos las tiras estaban negras, y no se podía hacer ninguna diferenciación.

TABLA I

CAMBIO DE LA REFLECTANCIA CON EL TIEMPO TRAS CONTACTO CON LA MUESTRA

Concentración de glucosa. (mg %)	15	40	65	90	115	140	165	215	FINAL % R
	seg $\Delta\%$ R*	seg $\Delta\%$ R +	seg $\Delta\%$ R +	seg $\Delta\%$ R +	seg $\Delta\%$ R +	seg $\Delta\%$ R +	seg $\Delta\%$ R +	seg $\Delta\%$ R +	
50	6,8	8,5	3,5	0,1	0	0	0	0	59,
100	13,8	13,8	5,6	2,0	0,1	0	0	0	43,
200	22,6	15,3	6,2	2,7	0,7	0	0	0	31,
500	30,8	15,7	6,5	2,7	0,7	0	0	0	22,

$$* \%R \text{ a } t = 15 \text{ seg} = \%R(0 \text{ mg\% glucosa}) - \%R(n \text{ mg\% glucosa})$$

$$+ \%R \text{ a } t = t \text{ seg} = \%R(t \text{ precedente}) - \%R(t)$$

EJEMPLO II

Un papel reactivo sensible a la glucosa, previamente preparado, se impregnó como en el Ejemplo I con una solución de cloroformo que contenía 10% en peso de Eastman 910 EM (2-cianoacrilato de etilo), 1% (peso/vol.) de deter-

1 gente no iónico sólido, y 0,01% (peso/vol.) de ácido dicarboxílico sólido. Las tiras preparadas a partir de este papel impregnado presentaron características similares a las del Ejemplo I, y las tiras reaccionadas coloreadas presentaban un aspecto uniforme particularmente igual.

### 5 EJEMPLO III

10 Se preparó papel reactivo sensible a la cetona, según la patente de los EE.UU. nº 3.202.855, sumergiendo papeles de filtro Whatman 3MM en la siguiente mezcla de primera inmersión, secando, y sumergiendo subsiguientemente en la segunda inmersión.

#### Primera inmersión

H <sub>2</sub> O	722 ml
Fosfato sódico tribásico	202,2 g
15 Fosfato sódico dibásico (anhid.)	86,7 g
Acido aminoacético	180,6 g

#### Segunda inmersión

Tensioactivos	1,64 g
20 Copolímero E-535 de polivinilpirrolidona/acetato de vinilo	67 ml
Nitroferricianuro sódico	8,24 g
Sulfóxido de dimetilo	401 ml
Cloroformo	350 ml
Etanol, anhidro	200 ml

25 Las tiras así preparadas se impregnaron luego con una solución en cloroformo que contenía 10% en peso de Eastman 910 EM, como en el Ejemplo I. Las tiras preparadas a partir de este papel impregnado, y evaluadas con orinas que contenían varias concentraciones de ácido acetoacético, presentaron excelentes características de desarrollo de color, y

30

1 las intensidades de color indicativas de la concentración de ácido acetoacético en la orina ensayada permanecieron estables.

5 EJEMPLO IV

Un papel reactivo sensible a la glucosa se impregnó con una solución en benceno de 10% de Eastman 910, que contenía 2-cianoacrilato de metilo. Por evaluación, las tiras de este papel presentaron las excelentes propiedades de los ejemplos anteriores.

10 EJEMPLO V

Se preparó un sistema de "una inmersión" a partir de la formulación siguiente.

Reactivo A

15	Fosfato sódico, tribásico	2,02 g
	Fosfato sódico dibásico anhidro	0,87 g
	Glicina (ácido aminoacético)	1,81 g
	Nitroferricianuro sódico (molido y secado)	82,4 mg

Reactivo B

20	Sulfosuccinato de dioctilsodio	8,4 mr
	Tensioactivo GAFAC <sup>®</sup> RE-610 (disponible de GAF Corp.)	8,0 mg
	Cloroformo	16,7 ml
25	Hypol <sup>®</sup> 2000 (prepolímero de poliuretano), mézclese hasta que se disuelva	0,9 g

30 Todos los constituyentes del "Reactivo A" se molieron en un mortero con su mano, a polvo fino, y se suspendieron en "Reactivo B". Un papel de filtro Whatman 3MM seco (disponible de 3M Co., St. Paul, Minn.) se impregnó con esta suspensión, y las tiras preparadas con este papel

1 impregnado se evaluaron con orinas que contenían varias con-  
 5 centraciones diferentes de ácido acetoacético. Las intensi-  
 dades de color de las tiras reaccionadas fueron estables, y  
 fueron función de la concentración de ácido acetoacético en  
 la orina ensayada.

#### EJEMPLO VI

Se prepararon un reactivo indicador de glucosa y  
 una solución de enzima, que tenían las siguientes composi-  
 ciones:

#### 10 Reactivo indicador de glucosa

Agua destilada	16,6 ml
Polivinilpirrolidona (PVP)	9,5 ml
Yoduro potásico	1,5 g
FD&C Azul nº 1	5,3 mg
15 Acido cítrico	0,497 g
Citrato trisódico	2,182 g
Sal tetrasódica del ácido (etilendinitrilo)-tetracético	1,67 g
GANTREZ <sup>®</sup> AN, solución al 10%	5 ml
20 Solución de Enzima	16,7 ml

#### Solución de enzima

225 ml de glucosa oxidasa

0,842 g de peroxidasa

25 Todos los reactivos anteriores se mezclaron hasta  
 que estuvieron en solución. Volúmenes iguales de esta solu-  
 ción de indicador reactivo, orina que contiene glucosa, e  
 Hypol<sup>®</sup> 2000 se añadieron a una impresión de placa para en-  
 sayo in situ, y se mezclaron con una espátula hasta que em-  
 30 pezó la formación de espuma (aproximadamente 1 minuto). El  
 prepolímero formó una espuma sólida coloreada en 3 a 5 minu-

1. tos.

5 El sistema, cuando se evaluó con orina que contenía 0, 100, 250, 500, 1.000 y 2.000 mg de glucosa/dl, desarrolló un color estable tras corto tiempo, y las intensidades de color era indicativas de la concentración de glucosa. Los colores finales estaban comprendidos entre azul, a verde, a marrón, dependiendo de la concentración de glucosa, y se compararon con patrones de color.

10 Dado que una gota de Hypol <sup>®</sup> 2000 forma la espuma suficiente para llenar la impresión de placa para ensayo in situ, el ensayo se puede efectuar con una gota de muestra de orina, y leerlo aún visualmente.

#### EJEMPLO VII

15 Un papel reactivo específico para cetona, preparado según la patente de los EE.UU. n.º 3.212.855, se impregnó con una solución en cloroformo, al 10%, de Hypo <sup>®</sup> 2000, un prepolímero de uretano expandible con agua, disponible de Dewey and Almy Chemical Division de W.R. Grace Co. Esta solución puede contener además cualquiera de varios detergen-  
20 tes iónicos, en concentración variable entre 1 y 5% del peso del prepolímero. Unas tiras preparadas con este papel impregnado se evaluaron con orinas que contenían diferentes cantidades de ácido acetoacético, y alcanzaron las intensidades finales de color dentro de 2 a 4 minutos. Estas intensi-  
25 dades de color eran estables, y eran función, claramente distinguible visualmente, de la concentración de ácido acetoacético.

30 Por lo que antecede, está claro que la incorporación de los conceptos de la presente invención es aplicable no solo a la producción de tiras o dispositivos de ensayo

1 del tipo de sumergir y leer, sino también a otras formas de ensayo, incluyendo aquellas en forma de sistemas líquidos.

EJEMPLO VIII

5 Un dispositivo para la determinación de urobilinógeno en orina se preparó impregnando primeropapel de filtro Whatman 3MM con la siguiente mezcla:

	Agua destilada	70,5 g
	GANTREZ <sup>®</sup> AN-139	5,6 g
	Acido sulfasalícílico	9,16 g
10	Cafeína	7,05 g
	Acido sulfámico	1,41 g
	p-dimetilaminobenzaldehido	0,53 g
	Sal tetrasódica del ácido (etilen-dinitrilo)-tetracético	0,14 g
15	Acido ascórbico	3,52 g
	Laurilsulfato sódico	0,70 g

20 Luego se secó el papel y se siguió impregnando con una solución al 4% en peso de polivinilpirrolidona en cloroformo. El papel resultante se secó luego y se montó sobre tiras de poliestireno para ensayo. Las tiras reactivas se evaluaron sumergiéndolas durante tres segundos en muestras de orina de concentraciones conocidas de urobilinógeno (0, 4, 8 y 12 unidades Ehrlich). Los colores se desarrollaron dentro de dos minutos, y se halló que eran indicativos de la concentración de urobilinógeno. Este efecto tiempo-ingrediente se consigue por la rápida formación de complejo copolímero hidrolizado de éter metil vinílico/anhi-  
25 drido maleico con polivinilpirrolidona, a pH bajo.

EJEMPLO IX

30 Se preparó una tira usada para la detección de san

1 gre oculta en orina, impregnando papel de filtro Whatman 3MM con la siguiente solución:

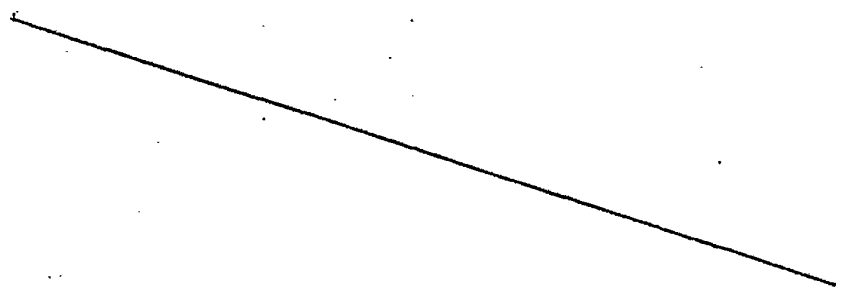
Lauril-sulfato sódico	0,84 g
Hidroperóxido de cumeno	1,67 g
5 6-metoxiquinolina	0,39 g
Citrato sódico.2H <sub>2</sub> O	1,79 g
Acido cítrico	2,32 g
3,3',5,5'-tetrametilbencidina	0,45 g
Borato de trietanolamina	5,58 g
10 Sal tetrasódica del ácido (etilendinitrilo)tetracético.	0,06 g
Dimetilsulfona	5,58 g
Agua	40,67 g
Dimetilformamida	40,67 g

15 Tras secar, el papel se impregnó adicionalmente con una solución al 1% en peso de Eastman 910EM en cloroformo. Las tiras preparadas a partir de este papel, por evaluación en muestras de orina que contenían cantidades conocidas de hemoglobina (0, 0,016, 0,064, 0,16, 0,80 mg/dl), produjeron dentro de dos minutos unos colores notablemente estables, cuya intensidad era función de la concentración de hemoglobina.

20

25

30



1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Dispositivo de ensayo para detectar la presencia de un componente en una muestra, que comprende una matriz de soporte en la que se han incorporado: (a) un sistema reaccionante que por contacto con dicha muestra interacciona con dicho componente, produciendo una respuesta detectable, y (b) un sistema inhibidor que por contacto con la muestra impide que el sistema reaccionante interaccione con el componente tras un lapso de tiempo predeterminado.

15

20

2ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, donde dicho sistema inhibidor es capaz de producir calor por contacto con dicha muestra, elevando así la temperatura de dicho dispositivo tras un tiempo predeterminado, de manera que se impide que dicho sistema reaccionante interaccione con dicho componente.

25

3ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, donde dicho sistema inhibidor es capaz de envenenar a dicho sistema reaccionante tras un tiempo predeterminado, impidiendo así que dicho sistema reaccionante interaccione con dicho componente.

30

14107

4ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, donde dicho sistema inhibidor comprende un material que

1 endurece o gelifica por contacto con dicha muestra.

5 5ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, donde el componente es glucosa, cetona, sangre oculta, bilirrubina, urobilinógeno, colesterol, ión hidrógeno, proteína o nitrito.

6ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, donde dicha respuesta detectable es un cambio de color.

10 7ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, donde la magnitud de producción de dicha respuesta detectable depende de la cantidad de dicho componente en dicha muestra.

15 8ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 4ª, donde dicho material gelifica o endurece a una magnitud suficiente para inhibir la producción de dicha respuesta detectable tras un tiempo predeterminado.

9ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 4ª, donde dicho material es ácido 2-cianoacrílico o un éster del mismo.

20 10ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 4ª, donde dicho material comprende poli(alcohol vinílico).

11ª.- Dispositivo de ensayo según la reivindicación 4ª, donde la gelificación o el endurecimiento de dicho material se inician por contacto con agua.

25 12ª.- Dispositivo de ensayo para detectar la presencia de un componente en una muestra.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

1 Esta Memoria consta de VEINTIOCHO hojas escritas  
a máquina por una sola cara.

Madrid, 21.OCT.1977

P. A.

5 **Fernando de Elzaburu**  
Por Poder.

10

15

20

25

30

14107

VAL