



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 25 334 T2** 2006.08.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 155 310 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 25 334.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/00620**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 906 895.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/042422**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **20.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.11.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **04.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 27/26** (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

228855 **12.01.1999** **US**

(73) Patentinhaber:

Diabetes Diagnostics, Inc., Waltham, Mass., US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**MCALEER, F., Jerome, Wantage OX12 0NR, GB;
SCOTT, David, Witney, Oxon OX8 6S2, GB; HALL,
Geoff, Inverness IV1 2NH, GB; ALVAREZ-ICAZA,
Manuel, Inverness IV3 3AJ, GB; PLOTKIN, V.,
Elliott, Inverness IV2 3JZ, GB; DAVIES, W., Oliver,
Inverness IV2 4QP, GB**

(54) Bezeichnung: **WEGWERFTSTREIFEN MIT EINER INTGRIERTEN REAGENZ/BLUT TRENN SCHICHT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Diese Anmeldung bezieht sich auf wegwerfbare Teststreifen zur Verwendung in elektrochemischen Bestimmungen von Blutanalyten, wie z.B. Glucose, und auf Verfahren und Zusammensetzungen zur Verwendung in der Herstellung solcher Streifen.

[0002] Glucose-Überwachung ist für Individuen mit Diabetes eine Tatsache des täglichen Lebens und die Genauigkeit dieser Überwachung kann im wahrsten Sinne des Wortes den Unterschied zwischen Leben und Tod bedeuten. Um einen normalen Lebensstil mit dem Bedürfnis nach häufiger Überwachung der Glucosespiegel in Einklang zu bringen, sind jetzt eine Reihe von Glucose-Meßgeräten erhältlich, welche dem Individuum erlauben, den Glucosespiegel in einer kleinen Blutmenge zu testen.

[0003] Viele dieser Meßgeräte detektieren Glucose in einer Blutprobe elektrochemisch durch Detektion der Oxidation von Blutglucose unter der Verwendung eines Enzyms, wie z.B. Glucoseoxidase, welches als ein Teil eines wegwerfbaren Elektroden-Systems zur einmaligen Verwendung zur Verfügung gestellt wird. Beispiele für Vorrichtungen von diesem Typ werden im europäischen Patent Nr. 0 127 958 und den U.S. Patenten Nr. 5,141,868; 5,286,362; 5,288,636 und 5,437,999 offenbart.

[0004] Im allgemeinen umfassen vorhandene Glucose-Teststreifen zur Verwendung in elektrochemischen Meßgeräten ein Substrat, Arbeits- und Referenz-Elektroden, die auf der Oberfläche des Substrats gebildet sind, und ein Mittel zur Herstellung der Verbindung zwischen den Elektroden und dem Meßgerät. Die Arbeitselektrode ist mit einem Enzym, das in der Lage ist, Glucose zu oxidieren, und einer Vermittler-Verbindung beschichtet, welche Elektronen von dem Enzym zu den Elektroden überträgt, was zu einem meßbaren Strom führt, wenn Glucose anwesend ist. Repräsentative Vermittler-Verbindungen schließen Ferricyanide, Metalloccen-Verbindungen, wie z.B. Ferrocen, Chinone, Phenaziniumsals, Redox-Indikator DCPIP und Imidazol-substituierte Osmium-Verbindungen ein.

[0005] Arbeitselektroden dieses Typs wurden auf eine Vielzahl von Art und Weisen formuliert. Zum Beispiel wurden Mischungen aus leitfähigem Kohlenstoff, Glucoseoxidase und einem Vermittler in eine Paste oder Tinte formuliert und auf ein Substrat aufgetragen, EP 0 127 958 und US 5,286,362. US 5,628,890 offenbart einen elektrochemischen Sensor, wobei die bedruckten Elektroden aus einer Mischung eines Enzyms, eines Vermittlers und eines leitfähigen Materials gebildet werden. US 5,762,770 offenbart die Verwendung eines Biosensor-Reagens, um die Elektroden eines elektrochemischen Teststreifens abzudecken. Im Falle von wegwerfbaren Glucosestreifen wird diese Auftragung durch Rasterdruck durchgeführt, um die dünnen Schichten zu erhalten, welche für einen kleinen flachen Teststreifen geeignet sind. Die Verwendung von Rasterdruck führt jedoch Probleme beim Betreiben der Elektrode ein.

[0006] Im Gegensatz zu einer dicken Kohlenstoff-Pasten-Elektrode, welche ziemlich intakt während der Messung verbleibt, neigen Rasterdruck-Elektroden, die aus Kohlenstoff-Pasten oder -Tinten gebildet werden, dazu, beim Kontakt mit der Probe zu zerbrechen. Die Konsequenzen dieses Zerbrechens sind zweifach. Erstens werden die Komponenten der Elektroden-Formulierung in die Lösung freigesetzt. Wenn diese Komponenten mehr als eine Diffusions-Länge von der unterliegenden leitfähigen Schicht wegtreiben, tragen sie nicht länger zu der Messung bei, sondern schwächen die Antwort in Wirklichkeit durch eine Verringerung von nach innen diffundierendem Analyten ab. Zweitens bedeutet das Zerbrechen der Rasterdruck-Elektrode, daß das effektive Elektrodengebiet mit der Zeit sinkt.

[0007] Die Kombination dieser beiden Effekte resultiert in Strom-Transienten, welche rapide nach einem initialem Peak über die Zeitspanne der Messung abfallen, und in einer hohen Sensitivität gegenüber Sauerstoff, welcher schnell mit dem Vermittler um das Enzym konkurriert. Dieser Fakt wird eindeutig durch die wesentlich geringeren Ströme demonstriert, die in Blutproben im Vergleich zu Plasmaproben oder anderen wäßrigen Medien gemessen werden, und kann in fehlerhaften Meßwerten resultieren. Eine weitere Konsequenz ist, daß die Transienten oftmals „gehäuft“ („lumpy“) sind, da die Elektrode auf eine chaotische Weise zerbricht. Gehäufte Transienten führen entweder zu fehlerhaften Meßwerten oder abgewiesenen Streifen, wobei beides nicht akzeptabel ist.

[0008] Zusätzlich zu dem Potential des Zerbrechens von Elektroden von Raster-bedruckten Kohlenstoff-basierten Elektroden sind bekannte Elektroden, die in wegwerfbaren Glucose-Teststreifen verwendet werden, kinetisch kontrolliert, d.h. der Strom hängt von der Rate der Umwandlung der Glucose durch das Enzym ab. Weil

die Antwort, die durch das Instrument gemessen wird, ein Gleichgewicht zwischen den Reaktionen des Enzyms und des Vermittlers, des Enzyms und der Glucose und des Enzyms und des Sauerstoffes darstellen und weil jede dieser Reaktionen ihre eigene Abhängigkeit von der Temperatur hat, ist die Antwort eines kinetisch kontrollierten Teststreifens sensitiv gegenüber der Temperatur der Probe. Substantielle Variationen im gemessenen Glucosewert können daher als ein Ergebnis von Variationen bei der Behandlung der Probe auftreten.

[0009] Eine weitere Herausforderung, der Sensoren für die elektrochemische Glucose-Detektion gegenüberstehen, ergibt sich als Ergebnis der Beeinträchtigung durch Blutzellen, die in der Probe anwesend sind. Der Spiegel der roten Blutzellen reflektiert sich im Hämatokrit-Meßwert. Typischerweise führen hohe Hämatokrit-Proben zu Meßwerten, die niedriger sind als der wahre Wert, wohingegen niedrige Hämatokrit-Proben zu Meßwerten führen, die höher sind, weil die Blutzellen dazu tendieren, die Oberfläche der Elektrode zu verschmutzen und den Elektrodentransfer zu limitieren. Weiterhin konkurriert der Sauerstoff, der an das Hämoglobin der roten Blutzellen gebunden ist, mit dem Vermittler um das reduzierte Enzym, was die Glucose-Antwort weiter verringert. Es wurden Versuche unternommen, den Hämatokrit-Effekt durch Addieren einer Membran zu limitierten, um Blutkomponenten auszufiltern (siehe U.S. Patent Nr. 5,658,444 und EP 0 289 269), aber dies addiert einen zusätzlichen Schritt zum Herstellungsprozeß, was zur Erhöhung der Kosten und oftmals zu herabgesetzter Leistung auf anderen Gebieten führt, wie z.B. der Präzision.

[0010] Aufgrund der Bedeutung für das Wohlbefinden eines Patienten, der das Meßgerät und wegwerfbare Teststreifen verwendet, akkurate Glucose-Meßwerte zu erhalten, wäre es sehr wünschenswert, einen Glucose-Teststreifen zu haben, welcher nicht unter diesen Nachteilen leidet und welcher daher eine konsistentere und verlässlichere Anzeige von tatsächlichen Blutglucose-Werten zur Verfügung stellt, und zwar ohne Rücksicht auf die tatsächlichen Bedingungen. Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung in mindestens ihren bevorzugten Ausführungsformen wegwerfbare Glucose-Teststreifen zur Verfügung zu stellen, welche einen Glucose-Meßwert zur Verfügung stellen, der im wesentlichen unabhängig von dem Hämatokrit der Probe ist, und welche eine integrierten Reagenz-/Blut-Separationsschicht einschließen.

[0011] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung wegwerfbarer Glucose-Teststreifen zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt einen verbesserten wegwerfbaren Teststreifen zur Verwendung in einem Test-Meßgerät des Typs zur Verfügung, welcher einen wegwerfbaren Teststreifen und eine Blutprobe eines Patienten aufnimmt und eine elektrochemische Analyse der Menge eines Blutanalyten, wie z.B. Glucose, in der Probe durchführt, wie in Anspruch 1 beansprucht.

[0013] US 5,708,247 offenbart einen Teststreifen gemäß des Oberbegriffes von Anspruch 1. Die vorliegende Erfindung wird durch den kennzeichnenden Teil von Anspruch 1 gegenüber US 5,708,247 charakterisiert.

[0014] In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Glucose-Teststreifen mit einer integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht gebildet, die einen Füllstoff, der sowohl hydrophobe als auch hydrophile Oberflächenregionen aufweist, ein Enzym, das wirksam ist, um Glucose zu oxidieren, wie z.B. Glucoseoxidase, und einen Vermittler umfaßt, der wirksam ist, um Elektronen von dem Enzym auf das leitfähige Element zu übertragen. Der Füllstoff wird ausgewählt, ein Gleichgewicht zwischen Hydrophobizität und Hydrophilizität aufzuweisen, so daß die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht beim Trocknen ein zwei-dimensionales Netzwerk auf der Oberfläche des leitfähigen Elementes bildet. Bevorzugte integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschichten umfassen nicht-leitfähige Silica-Füllstoffe in Kombination mit Materialien, wie z.B. Hydroxyethylcellulose (HEC). Das Silica und HEC bilden ein zweidimensionales Netzwerk, welches rote Blutzellen ausschließt und damit den Teststreifen im wesentlichen unsensitiv gegenüber dem Hämatokrit des Patienten macht.

[0015] Die Teststreifen werden mit einer Schicht zur Isolation hergestellt, die über mindestens dem ersten leitfähigen Element aufgetragen wird. Diese Schicht zur Isolation hat eine Apertur, die darin gebildet ist und welche zu einem Teil des ersten leitfähigen Elements ausgerichtet ist. Und die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht wird aufgetragen, um Kontakt mit dem ersten leitfähigen Element durch diese Apertur herzustellen.

[0016] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird auch ein Verfahren zur Herstellung eines wegwerfbaren Teststreifens zur Verfügung gestellt, wie in Anspruch 8 beansprucht wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- [0017] [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) zeigen eine Elektroden-Struktur, die gemäß der Erfindung in einem wegwerfbaren Teststreifen nützlich ist;
- [0018] [Fig. 2](#) zeigt einen Teststreifen gemäß der Erfindung;
- [0019] [Fig. 3A–Fig. 3C](#) zeigen den Strom, der als eine Funktion der Glucose-Konzentration für drei verschiedene Hämatokrit-Spiegel gemessen wurde;
- [0020] [Fig. 4](#) zeigt die Beziehung der Abhängigkeit der Glucose-Konzentration von dem gemessenen Strom als eine Funktion des Hämatokrits;
- [0021] [Fig. 5A–Fig. 5C](#) zeigen den Strom, der als eine Funktion von Glucose in Blut und in einer Kontrolllösung für drei verschiedene leitfähige Elemente gemessen wurde;
- [0022] [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen den Strom, der als eine Funktion von Glucose bei zwei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde;
- [0023] [Fig. 7](#) zeigt eine weitere Ausführungsform eines Glucose-Teststreifens gemäß der Erfindung;
- [0024] [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) zeigen Strom-Transienten, die unter der Verwendung eines Teststreifens gemäß der Erfindung und eines kommerziellen Kohlenstoff-basierenden Teststreifens beobachtet wurden;
- [0025] [Fig. 9A–Fig. 9C](#) zeigen einen dreistufigen Prozeß zur Herstellung eines Teststreifens gemäß der Erfindung und
- [0026] [Fig. 10A–Fig. 10G](#) zeigen die Herstellung eines Teststreifens gemäß der Erfindung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

- [0027] [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) zeigen Elektroden, die nützlich in einem wegwerfbaren Teststreifen gemäß der Erfindung sind. Wie gezeigt, werden die Elektroden auf einem Substrat **10** gebildet. Auf dem Substrat **10** sind zwei leitfähige Elemente **14'** und **16** angeordnet, die durch Leitungen **14** und **15** mit den leitfähigen Kontakten **11**, **12** und **13** verbunden sind. Eine isolierende Maske **18** wird dann gebildet, wobei mindestens ein Teil der leitfähigen Elemente **14'** und **16** und die Kontakte **11**, **12** und **13** bloßgelegt bleiben. Eine nicht-leitfähige integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht **17** wird dann über die isolierende Maske aufgebracht, um Kontakt mit dem leitfähigen Element **16** herzustellen.
- [0028] Die Anordnung, die in [Fig. 1](#) gezeigt ist, stellt eine vollständig funktionelle Anordnung für die Messung eines Blutanalyten dar, wenn sie mit einem Meßgerät verbunden wird. Jedoch werden die Elektrodenstreifen der Erfindung vorteilhafterweise durch Auftragen eines Nylon- oder Polyester-Netzes **21** über die Proben-Auftragungsregion, die durch den Ort der integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht **17** der Elektroden-Anordnung **22** definiert ist, und danach durch Auftragen einer Oberschicht **23**, um ein Verspritzen der Blutprobe zu verhindern, fertiggestellt ([Fig. 2](#)). Das Polyester-Netz dient dazu, die Probe zu der Referenzelektrode, dem leitfähigen Element **14'**, zu führen und dabei die Vorrichtung anzusteuern und den Test zu beginnen.
- [0029] Die Verwendung einer nicht-leitfähigen integrierten Reagenz-/Blut-Separationsschicht stellt eine bedeutenden Unterscheidung zu bekannten Teststreifen und einen Vorteil gegenüber diesen bekannten Teststreifen dar, welche eine leitfähige Reagenz-enthaltende Aufschlammung verwenden, um die Reagenzien aufzudrucken. In diesen Systemen wird die aufgedruckte Aufschlammung ein funktioneller Teil der Elektrode und Ladungswechsel kann auf der äußeren Oberfläche der Reagenz-Schicht stattfinden. Wenn sich die Schicht in direktem Kontakt mit dem Blut befindet, d.h. wenn keine intervenierende Separationsschicht aufgetragen wurde, können rote und weiße Blutzellen, Fett und Proteine, die in der Probe anwesend sind, mit der Reagenzschicht interagieren und mit der Messung der Menge des Analyten in der Probe interferieren.
- [0030] Im Gegensatz dazu ist in der vorliegenden Erfindung die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht nicht-leitfähig und daher kein Teil der Elektrode, weder strukturell noch funktionell. Der Ladungstransfer findet nicht statt ehe elektroaktive Spezies durch die Öffnungen/Poren der integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht hindurchgehen, um das unterliegende leitfähige Element zu erreichen. Daher stellt die integrierte Re-

agenz-Blut-Separationsschicht eine Barriere für den Durchlaß von Störern, wie z.B. Zellen und Makromolekülen, zu dem leitfähigen Element dar, was zu einer Vorrichtung mit hervorragenden Eigenschaften führt und welche zudem einfacher herzustellen ist.

[0031] Zum Erreichen dieses Ergebnisses ist es insbesondere wünschenswert, daß die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht auf eine solche Weise aufgebracht wird, daß kein Teil des leitfähigen Elements **16** der Probe direkt ausgesetzt werden kann, wenn diese in die Proben-Auftragungsregion gegeben wird. Die oben beschriebene Methode, in welcher eine isolierende Schicht mit Aperturen verwendet wird, die Zugang zu den leitfähigen Elementen **14'** und **16** zur Verfügung stellt, ist insbesondere geeignet, um dieses Ergebnis zu erreichen. Daher erlaubt diese Methodik die Bildung des Teststreifens in nur drei Schritten, wie in den [Fig. 9A](#) bis [Fig. 9C](#) gezeigt. Im ersten Schritt ([Fig. 9A](#)) werden zwei leitfähige Elemente **14'** und **16** und assoziierte Leitungen und Kontakte auf ein Substrat aufgebracht. In einem zweiten Schritt ([Fig. 9B](#)) wird eine Schicht aus isolierendem Material über die leitfähigen Elemente aufgebracht. Das isolierende Material hat zwei Aperturen **94** und **96**, wovon eine mit jedem der konduktiven Elemente **14'** und **16** ausgerichtet ist. Im dritten Schritt ([Fig. 9C](#)) wird die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht **17** über die Apertur **96** aufgetragen. Durch Herstellen der aufgetragenen Schicht **17** in Dimensionen, die größer sind als die Apertur **96**, deckt die Reagenz-Schicht das unterliegende leitfähige Element vollständig ab, so daß es nicht direkt der Probe ausgesetzt wird, womit effektive Blut-Separation zur Verfügung gestellt wird.

[0032] Das vollständige Abdecken des leitfähigen Elements **16** adressiert auch eine andere Fehlerquelle, welche als ein Ergebnis elektrochemischer Oxidation kleiner Moleküle, wie z.B. Ascorbinsäure, Harnsäure und Acetaminophen, welche in der Probe anwesend sind, auftreten kann. Wenn anwesend, führt die Oxidation dieser Moleküle an der Oberfläche der Elektrode zu fälschlicherweise erhöhten Stromspiegeln und daher zu einer ungenauen Messung des gewünschten Analyten, z.B. Glucose. Die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht der Erfindung wird im allgemeinen diese Moleküle nicht ausschließen, weil diese klein sind im Vergleich zu den beobachteten Porengrößen sind. Jedoch kann man durch Einschließen eines pH-Puffers in die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht den lokalen pH an der Oberfläche der Elektrode auf eine Höhe ändern, wo das elektrochemische Potential dieser Spezies höher ist. Daher wird z.B. die Verwendung einer integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht, in welcher der pH auf eine Höhe von ungefähr pH 5 gepuffert ist, den Einfluß dieser interferierenden Stoffe wesentlich reduzieren. Um die Effektivität dieses Pufferns zu maximieren, muß jedoch das gesamte leitfähige Element abgedeckt sein, weil auch eine relativ kleine Region von ausgesetzter (nicht gepuffert) Elektroden-Oberfläche zu einem großen Interferenz-Strom führen kann.

[0033] Die Teststreifen der Erfindung stellen nicht nur Leistungsvorteile zur Verfügung, die aus der Separation des leitfähigen Elements von der Blutprobe resultieren, die Teststreifen der Erfindung sind auch gegenüber anderen Fehlerquellen resistent. Zum Beispiel können während der Zeitspanne eines Tests Reagenzien lateral von dem originalen Auftragungsort hinweg diffundieren. Wenn die Reagenzschicht direkt auf das leitfähige Element aufgetragen wird, werden diese Reagenzien zu dem gemessenen Signal beitragen. Jede Variation in der konvektiven Diffusion von Test zu Test (z.B. als ein Ergebnis von Differenzen in der Temperatur oder Differenzen bei der Behandlung des Instruments) werden sich daher in einer Nicht-Reproduzierbarkeit des Signals manifestieren. Wenn jedoch die Reagenz-Schicht mit dem Isolations-Druck überlappt, wird laterale Diffusion hinweg von der Apertur nicht zum Signal beitragen und daher nicht zu Variationen im Signal führen.

[0034] Zusätzlich zur zur Verfügung Stellung eines Teststreifens mit vorteilhaften Eigenschaften bietet die in den [Fig. 9A](#) bis [Fig. 9C](#) vorgestellte Methodik verschiedene Vorteile aus der Perspektive der Herstellung. Erstens wird das „aktive Gebiet“ durch das Gebiet der Reagenz-Schicht definiert, wenn die Reagenz-Schicht direkt auf das leitfähige Element aufgedruckt wird. Die Präzision des Tests wird daher durch die Präzision bestimmt, mit welcher die Reagenz-Schicht aufgedruckt werden kann. Im Gegensatz dazu wird das aktive Gebiet durch die Größe der Apertur in der Isolationsschicht definiert, wenn zuerst eine offene („apertured“) Isolationsschicht aufgebracht wird, die die Region des Kontaktes zwischen der Reagenz-Schicht und dem unterliegenden leitfähigen Element definiert. Da die Isolierungsschichten typischerweise unter Verwendung eines feineren Rasters („screen“) gedruckt werden, kann eine viel bessere Kantendefinition und daher eine größere Präzision der Vorrichtung erreicht werden. Daher sind weder das Gebiet des leitfähigen Elements **16** noch die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht kritisch für die Leistungseigenschaften des fertiggestellten Teststreifens. Die leitfähigen Elemente und die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht können daher unter der Verwendung von Techniken aufgebracht werden, welche weniger Präzision zur Verfügung stellen als in anderen Prozessen verwendet werden kann.

[0035] Den Fachleuten wird bewußt sein, daß, während beide leitfähigen Elemente für die elektroaktiven Spezies in einer Probe, die in der Proben-Auftragungsregion aufgebracht wird, zugänglich sein müssen, es die be-

deutende Funktion der Isolationsmaske ist, eine Apertur zur Verfügung zu stellen, die die Kontaktregion zwischen dem leitfähigen Element und der integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht **17** definiert. Daher ist es im limitierenden Fall nur notwendig, eine Apertur in der Isolationsschicht zu bilden. Das zweite leitfähige Element kann entlang einer Kante der Isolationsschicht bloßgelegt werden oder kann auf einer zugewandten Oberfläche in einer gefalteten Elektrodenstruktur lokalisiert sein.

[0036] Das Substrat **10**, das zur Herstellung der Teststreifen der Erfindung verwendet wird, kann jedes nicht-leitfähige, dimensional stabile Material sein, das zur Einfügung in ein Glucose-Test-Meßgerät geeignet ist. Geeignete Materialien schließen Polyester-Filme, z.B. einen 330 Mikron Polyester-Film, und andere isolierende Substrat-Materialien ein, wie z.B. Polyvinylchlorid (PVC) und Polycarbonat.

[0037] Die leitfähigen Elemente und assoziierte Leitungen und Kontakte können aus im wesentlichen jedem leitfähigen Material gebildet werden, einschließlich Silber, Ag/AgCl, Gold oder Platin/Kohlenstoff, und müssen nicht alle aus dem selben Material gebildet werden. Das leitfähige Element **16** wird bevorzugterweise aus leitfähigem Kohlenstoff gebildet. Bevorzugter leitfähiger Kohlenstoff kann ERCON ERC1, ERCON ERC2 und Acheson Carbon Electrodag 423 sein. Kohlenstoff mit diesen Spezifikationen ist von Ercon Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) oder Acheson Colloids (Princess Rock, Plymouth, England) erhältlich. Das leitfähige Element **16** stellt den Kontakt mit der Leiterbahn **15** der Arbeits-Elektrode her und ist nahe, aber nicht in Kontakt mit dem leitfähigen Element **14'**, das als Ende der Leiterbahn **14** der Referenz-Elektrode aufgetragen wird.

[0038] Die isolierende Schicht **18** kann aus Polyester-basierenden bedruckbaren dielektrischen Materialien gebildet sein, wie z.B. ERCON R488-B(HV)-B2 Blue. Die obere Abdeckung **23** wird geeigneterweise aus einem Polyester-Streifen oder „heiß geschmolzenem“ beschichtetem Plastik gebildet.

[0039] Die Teststreifen der vorliegenden Erfindung benötigen nicht die Bildung einer getrennten Ausgangsöffnung, um der Luft zu erlauben, aus der Vorrichtung zu entkommen, wenn die Probe in die Elektrodenkammer eindringt, sondern verwendet statt dessen einen getrennten Ausgang entlang aller Kanten des Netzes. Wenn sich die Probenflüssigkeit entlang des Netzes fortbewegt („wicks“), sickert Luft aus den Kanten des Netzes rundum die Vorrichtung unterhalb der oberen Schicht. Die Probenflüssigkeit sickert nicht durch, weil die Isolationsschicht diesem Teil des Netzes signifikante Hydrophobizität vermittelt. Die flüssige Probe verbleibt daher in der zentralen hydrophilen Region.

[0040] Der entscheidende Punkt, der durch die vorliegende Erfindung erreicht wird, liegt in der Natur der integrierten Reagenz-/Blut-Separationsschicht **17**. Diese Schicht kann aus einer Mischung gebildet werden, die einen Füllstoff enthält, welcher sowohl hydrophobe als auch hydrophile Oberflächenregionen aufweist, und im Falle eines Glucose-Teststreifens ein Enzym, welches Glucose oxidieren kann, und einen Vermittler enthält, welcher Elektronen von dem Enzym auf die unterliegende leitfähige Element-Schicht **16** übertragen kann. Diese Schicht wird geeigneterweise durch Formulieren einer Tinte, welche den Füllstoff, das Enzym und den Vermittler in einem geeigneten Träger enthält, und unter Verwendung dieser Tinte gebildet, um die Schicht auf die Vorrichtung zu drucken.

[0041] Ein bevorzugter Füllstoff zur Verwendung in der Schicht **17** ist Silica. Silica ist in einer Vielfalt von Graden und mit einer Vielfalt von Oberflächen-Modifikationen erhältlich. Während alle getesteten Silica-Verbindungen zu einem Produkt führten, welches Glucose unter einigen Bedingungen messen konnte, werden die hervorragenden Leistungseigenschaften des Glucose-Teststreifens der Erfindung erhalten, wenn ein Silica verwendet wird, das eine Oberflächen-Modifikation aufweist, die teilweise hydrophob macht. Materialien dieses Typs schließen Cab-O-Sil TS610, ein Silica, welches durch teilweise Oberflächen-Behandlung mit Methylchlorosilan modifiziert ist; Cab-O-Sil 530, ein Silica, welches durch vollständige Oberflächenbehandlung mit Hexamethyldisilazan modifiziert ist; Spherisorb C4 Silica, welches mit vier Kohlenstoffketten Oberflächen-modifiziert wird; und andere ähnlich modifizierte Silica-Verbindungen oder Kombinationen davon ein. Silica mit einer Oberflächen-Modifikation, welche zu hydrophob ist, sollte vermieden werden. Zum Beispiel wurde beobachtet, daß C18-modifiziertes Silica zu hydrophob ist, um eine druckbare Tinte zu bilden.

[0042] Während des Prozesses zur Herstellung der Tinte der Erfindung werden die Partikel durch Homogenisierung zerlegt, um hydrophile innere Teile der Silica-Partikel bloßzulegen. Daher weisen die tatsächlichen Partikel, die in der Tinte vorhanden sind, jeweils hydrophile und hydrophobe Regionen auf. Die hydrophilen Regionen bilden Wasserstoffbrücken-Bindungen miteinander und mit dem Wasser.

[0043] Wenn dieses Material in eine Tinte formuliert wird, wie unten in Beispiel 1 beschrieben, und durch Rasterdruck („screen printed“) auf das leitfähige Element aufgebracht wird, verursacht die doppelte Natur des Ma-

terials, das sich Schichten eines zweidimensionalen Netzwerkes bilden, welche die Form einer Art von Bienenwaben annimmt, welche durch mikroskopische Untersuchung sichtbar ist. Nach Rehydrierung zerbricht diese Schicht nicht, aber quillt auf, um eine gelierte Reaktionszone in der Nähe des unterliegenden leitfähigen Elements **16** zu bilden. Reaktanten, wie z.B. das Enzym, der Vermittler und die Glucose, bewegen sich frei innerhalb dieser Zone, aber interferierende Spezies, wie z.B. rote Blutzellen, die oxidiertes Hämoglobin enthalten, werden ausgeschlossen. Dies führt zu einer Vorrichtung, in welcher die Menge an Strom, die als Antwort auf eine gegebene Menge an Glucose generiert wird, um weniger als 10 % über einen Hämatokrit-Bereich von 40–60 % variiert, und welche dadurch im wesentlichen unsensitiv gegenüber dem Hämatokrit der Probe ist und tatsächlich im wesentlichen gleichermaßen in Blut wie in zellfreier Kontroll-Lösung arbeitet ([Fig. 3A](#) bis C, [Fig. 4](#) und [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5C](#)).

[0044] Weiterhin stellt die gelierte Reaktionszone eine größere Barriere gegenüber dem Eintritt von Blutanalyten, wie z.B. Glucose, dar, was die Vorrichtung eher Diffusions-limitiert als kinetisch-limitiert macht. Das führt zu einer Vorrichtung, in welcher der gemessene Strom um weniger als 10 % über einen Temperaturbereich von 20°C bis 37°C variiert und welche dadurch im wesentlichen Temperatur-unabhängig ist ([Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#)).

[0045] Bei der Herstellung eines Glucose-Teststreifens wird die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht vorteilhafterweise durch eine wäßrige Zusammensetzung gebildet, die 2 bis 10 Gew.%, bevorzugt 4 bis 10 % und weiter bevorzugt ungefähr 4,5 % eines Bindemittels enthält, wie z.B. Hydroxyethylcellulose oder Mischungen aus Hydroxyethylcellulose mit Alginat oder anderen Verdickungsmitteln; 3 bis 10 Gew.%, bevorzugt 3 bis 5 % und weiter bevorzugt ungefähr 4% Silica enthält; 8 bis 20 Gew.%, bevorzugt 14 bis 18 % und weiter bevorzugt ungefähr 16 % eines Vermittlers enthält, wie z.B. Ferricyanid, und 0,4 bis 2 Gew.%, bevorzugt 1 bis 2 % und weiter bevorzugt ungefähr 1,6 % eines Enzyms enthält, wie z.B. Glucoseoxidase, unter der Annahme einer spezifischen Aktivität von ungefähr 250 Einheiten/mg oder ungefähr 1000 bis 5000 Einheiten pro Gramm der Tinten-Formulierung.

[0046] Die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht kann auch zusätzliche Inhaltsstoffe einschließen, ohne sich aus dem Bereich der Erfindung zu entfernen. Zum Beispiel kann die nicht-leitfähige Schicht ein Anti-Schaummittel einschließen. Zusätzlich kann die nichtleitfähige Schicht mit einem puffernden Mittel formuliert sein, um den pH der Reaktionszone zu kontrollieren. Der pH kann auf einem Spiegel innerhalb des Bereiches von ungefähr pH 3 bis pH 10 aufrecht erhalten werden. In einer Ausführungsform der Erfindung ist es von besonderem Nutzen, den pH der Vorrichtung bei einer Höhe über 8 aufrecht zu erhalten, weil bei diesem pH Sauerstoff, das an Hämoglobin gebunden ist, nicht freigesetzt wird. Weiterhin ist die Reaktionsrate von Glucoseoxidase mit Sauerstoff bei diesem pH sehr niedrig. Daher kann die Auswahl eines geeigneten pH-Wertes die Leistung des Teststreifens gegenüber den Effekten von variierendem Hämatokrit weiter stabilisieren. In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung kann das Aufrechterhalten eines niedrigen pH-Wertes (unter pH 5,5, dem optimalen pH-Wert für die Reaktion von Glucoseoxidase mit Sauerstoff) bevorzugt sein. Zum Beispiel ist das Aufrechterhalten eines pH-Wertes von ungefähr pH 5 besser, wenn das primäre Anliegen die Eliminierung von elektrochemischen Interferenzen ist, die sich aus der Oxidation von interferierenden Substanzen, wie z.B. Ascorbinsäure, Harnsäure oder Acetaminophen, ergibt, weil diese Verbindungen bei einem niedrigeren pH schwieriger zu oxidieren sind.

[0047] Während eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ein Glucose-Teststreifen, wie oben beschrieben, ist, sind die Teststreifen der Erfindung nicht auf die Detektion von Glucose beschränkt. Zum Beispiel könnte ein Fructosamin-Teststreifen zwei Schichten einschließen, die über das leitfähige Element aufgetragen sind. Die erste untere Schicht wird aus einer Tinte gebildet, die einen Carbonatpuffer (pH > 10) in einem Silica-Mix umfaßt, wie im wesentlichen in Beispiel 7 beschrieben, aber ohne Enzym, Vermittler oder Citrat-Puffer. Die zweite obere Schicht wird aus einer Tinte gebildet, die weiterhin ein Oxidationsmittel, wie z.B. Ferricyanid, umfaßt.

[0048] [Fig. 7](#) zeigt eine alternative Ausführungsform der Erfindung. In dieser Ausführungsform wird eine zweite nicht-leitfähige Schicht **71** über die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht **17** aufgetragen. Diese Schicht wird aus einer Zusammensetzung gebildet, welche identisch zu der ersten integrierten Reagenz-/Blut-Separationsschicht ist, außer daß das Enzym oder sowohl das Enzym als auch der Vermittler weggelassen werden. Diese Schicht isoliert weiter das leitfähige Element **16** vor einem Kontakt mit den Sauerstofftragenden Blutzellen und reduziert daher weiter die Effekte des Sauerstoffes. Weiterhin kann in dem Ausmaß, in dem das Enzym dazu tendieren könnte, von der Oberfläche der Elektrode während des Verlaufs der Messung hinweg zu diffundieren, eine solche Schicht, die einen Vermittler enthält, eine vergrößerte Region zur Verfügung stellen, in welcher der Vermittler für den Transfer von Elektronen verfügbar ist.

Beispiel 1

[0049] Eine nicht-leitfähige Formulierung für die Herstellung der integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht **17** wurde wie folgt hergestellt. 100 ml 20 mM wäßriges Trinatriumcitrat wurden durch die Addition von 0,1 M Zitronensäure auf pH 6 eingestellt. Dazu wurden 6 g Hydroxyethylcellulose (HEC) addiert und durch Homogenisierung gemischt. Der Mischung wurde erlaubt, über Nacht zu stehen, um Luftbläschen zu erlauben zu dispergieren, und wurde dann als eine Stammlösung für die Formulierung der Beschichtungs-Zusammensetzung verwendet.

[0050] 2 g Cab-o-Sil TS610 Silica und 0,1 g Dow Corning Anti-Schaum-Verbindung wurden allmählich per Hand zu 50 g der HEC-Lösung addiert, bis ungefähr 4/5 der Gesamtmenge addiert waren. Der Rest wurde unter Mischen durch Homogenisierung addiert. Die Mischung wurde dann für 10 Minuten in einem Kühlschrank gekühlt. 8 g Kaliumhexacyanoferrat (III) wurden dann addiert und bis zur vollständigen Lösung gemischt. Zuletzt wurden 0,8 g Glucoseoxidase-Enzympräparation (250 Einheiten/mg) addiert und dann gründlich in die Lösung gemischt. Die resultierende Formulierung war fertig zum Drucken oder könnte unter Kühlung gelagert werden.

Beispiel 2

[0051] Um Glucose-Teststreifen unter der Verwendung der Tinten-Formulierung von Beispiel 1 herzustellen, wurden eine Reihe von Mustern verwendet, um Druckschichten auf ein 330 Micron Polyestersubstrat (Melinex 329) zu drucken. Der erste Schritt besteht im Drucken von Kohlenstoff-Feldern („carbon pads“). Eine Anordnung von 10 × 50 Feldern von Kohlenstoff wird auf der Oberfläche des Polyestersubstrates durch Drucken mit EC2-Kohlenstoff (Ercon) gebildet. Das bedruckte Substrat wird dann durch einen erhitzten Trockner passiert und optional bei erhöhten Temperaturen (z.B. 70°C) für eine Zeitspanne von 1–3 Wochen ausgehärtet.

[0052] Als nächstes wird eine Anordnung von Silber/Silberchlorid-verbindenden Leiterbahnen und Kontakten auf das Substrat unter Verwendung von ERCON R-414 (DPM-68) 1.25 Bioelektroden-Sensor-Beschichtungsmaterial gedruckt und getrocknet. Eine Arbeits-Leiterbahn, welche Kontakt mit dem Kohlenstoff-Feld herstellt, und eine Referenz-Leitungsbahn werden für jedes Kohlenstoff-Feld der Anordnung gedruckt.

[0053] Eine dielektrische Schicht wird danach unter Verwendung von ERCON R488-B(HV)-B2-Blue gedruckt und getrocknet. Die dielektrische Schicht wird in einem Muster gedruckt, welches im wesentlichen alles von jeder Vorrichtung abdeckt und nur die Kontakte, die Spitze der Referenz-Elektrode und die Kohlenstoff-Felder unbeschichtet läßt.

[0054] Oben auf der dielektrischen Schicht wird die Tinte von Beispiel 1 verwendet, um eine integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht zu bilden, die oben auf jedem leitfähigen Kohlenstoff-Feld überzogen ist.

[0055] Polyester-Netzstreifen (Scrynel PET230HC) werden dann über das Substrat in Linien hingelegt, wobei die Reaktionsgebiete, die durch die Fenster in der dielektrischen Schicht bloß gelegt werden, bedeckt werden. Ein 5 mm breiter Polyester-Streifen (50 Micron dick) wird dann über den Netzstreifen aufgebracht und die Ecken der Elektroden werden Hitzeversiegelt. Letztlich wird das Substrat in Stücke geschnitten, um 50 individuelle Elektroden zur Verfügung zu stellen, die z.B. eine Größe von 5,5 mm Breite und 30 mm Länge haben.

Beispiel 3

[0056] Teststreifen, die unter der Verwendung der Tinten-Formulierung von Beispiel 1 auf die Weise hergestellt wurden, die in Beispiel 2 beschrieben ist, wurden in ein Test-Meßgerät mit einer angelegten Spannung von 500 mV gegeben und verwendet, um Blut-Proben, die variierende Glucose-Konzentrationen und Hämokrit-Werte im Bereich von 40% bis 60% aufwiesen, zu testen. [Fig. 3A](#) bis [Fig. 3C](#) zeigen den Strom, der 25 Sekunden nach dem Anlegen der Spannung als eine Funktion der Glucose-Konzentration gemessen wurde, und [Fig. 4](#) trägt den Anstieg der Glucose-Antwort als eine Funktion des Hämatokrits auf. Wie gesehen werden kann, produzieren die Indikatoren hoch reproduzierbare Strom-Spiegel, welche im wesentlichen unabhängig von Hämatokrit sind.

Beispiel 4

[0057] Glucose-Teststreifen gemäß der Erfindung wurden gemäß Beispiel 2 mit der Ausnahme hergestellt, daß die nicht-leitfähige Schicht mit 7 g Spherisorb C4 und 1 g Cab-o-Sil TS610 hergestellt wurde. Diese For-

mulierung wurde auf drei verschiedenen Typen von Kohlenstoff-enthaltenden leitfähigen Elementen wie folgt hingelegt:

A:	Ercon EC1
B:	Ercon EC2
C:	Ercon EC2 oben auf Acheson Carbon, Electrodag 423 SS.

[0058] Diese Teststreifen wurden verwendet, um variierende Spiegel an Glucose in entweder einer Kontroll-Lösung (One Touch Control Solution, Lifescan Inc.), die Glucose in einer inerten Lösung enthält, oder in Blut bei einer angelegten Spannung von 425 mV zu messen. Der Strom wurde gemessen, der 25 Sekunden nachdem die Spannung angelegt wurde beobachtet wurde. [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5C](#) zeigen die Ergebnisse, die für die drei Formulierungen A, B bzw. C erhalten wurden. In allen Fällen war der Anstieg der Geraden, der die Antwort des Meßgerätes auf verschiedene Glucose-Konzentrationen zeigt, im wesentlichen der gleiche, wenn auch die Messungen in Blut oder der Kontroll-Lösung gemacht wurden. Dies demonstriert weiterhin die Unabhängigkeit der Teststreifen der Erfindung vom Sauerstoffgehalt und Hämatokrit der Probe sowie die Fähigkeit, verschiedene Materialien als leitfähiges Element verwenden zu können.

Beispiel 5

[0059] Teststreifen, die gemäß Beispiel 2 hergestellt wurden, wurden bei zwei verschiedenen Proben-temperaturen, und zwar 37°C und 20°C, unter der Verwendung einer angelegten Spannung von 425 mV getestet. [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen den Strom, der 25 Sekunden nach dem Anlegen der Spannung als eine Funktion der Glucose-Konzentration gemessen wurde. Wie gesehen werden kann, sind die Anstiege der zwei Geraden im wesentlichen identisch (0,1068 bei 20°C im Vergleich zu 0,1009 bei 37°C), was daher demonstriert, daß die Teststreifen ein im wesentlichen Temperatur-unabhängiges Verhalten über einen Temperaturbereich von Raumtemperatur bis zu physiologischen Temperaturen zur Verfügung stellen.

Beispiel 6

[0060] Die Strom-Transiente wurde für einen Teststreifen, der gemäß Beispiel 2 hergestellt wurde, und für einen kommerziellen Teststreifen gemessen, der mit einer Kohlenstoff-enthaltenden Tinte hergestellt wurde. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) gezeigt. Wie gezeigt, stellt der Teststreifen der Erfindung ([Fig. 8](#)) eine sehr flache Transiente zur Verfügung, welche mehr als 50 % des Spitzenstroms für eine Zeitspanne von mehr als 25 Sekunden nach der anfänglichen Antwort des Teststreifens aufrecht erhält. Im Gegensatz dazu zeigte die Kohlenstoff-basierte Elektrode einen fast sofortigen Abfall im Strom, wobei 50 % des Spitzenstroms in der Zeitspanne der ersten 1–2 Sekunden nach der anfänglichen Antwort des Teststreifens verloren gingen. Dies macht die Zeitaufnahme der Messung schwierig, falls die Werte des Spitzenstroms festgehalten werden sollen, oder dies reduziert den dynamischen Bereich des Meßgeräts, wenn Strom gemessen werden muß, nachdem wesentlicher Abfall stattgefunden hat. Daher sind die Teststreifen der Erfindung vorteilhaft dahingehend, daß der Strom, der als Antwort auf eine gegebene Menge von Glucose generiert wird, um weniger als 50 % in den 5 Sekunden nachfolgend der Spitzenstrom-Generierung abfällt.

Beispiel 7

[0061] Eine Tinte zum Drucken der Glucose-Teststreifen gemäß der Erfindung wurde wie folgt formuliert:
 67,8 g 20 mM Citrat-Puffer, pH 6
 0,68 g Polyvinylalkohol (Molekulargewicht 85.000 bis 146.000, 88% hydrolysiert)
 0,68 g Polyvinylpyrrolidonvinylacetat
 0,42 g Dow Corning DC1500 Antischaum
 3,4 g Hydroxyethylcellulose (Natrosol 250G, Hercules)
 5,5 g Oberflächen-modifiziertes Silica (Cabo-Sil-TS 610, Cabot)
 1,5 g Glucoseoxidase
 20,0 g Kaliumferricyanid.

Beispiel 8

[0062] [Fig. 10A](#) bis [Fig. 10I](#) zeigen die schrittweise Herstellung eines Teststreifens gemäß der Erfindung. Wie aus einem Vergleich dieses Teststreifens und des Streifens von [Fig. 1](#) offensichtlich wird, ist die genaue Anordnung der Elektroden auf dem Streifen nicht kritisch. Weiterhin können verschiedene Materialien zur Her-

stellung des Streifens verwendet werden.

[0063] Der erste Schritt bei der Herstellung des Teststreifens ist die Ablagerung von Silber-Leitbahnen **101**, **102** auf dem Substrat **100**. Ein bevorzugtes Substrat ist ein 500 Micron dicker Polyesterfilm, der unter dem Handelsnamen Valox™ verkauft wird. Die Silberelektroden können durch Rasterdrucken unter der Verwendung einer Tinten-Zusammensetzung, die wie in Beispiel 2 formuliert ist, gebildet werden.

[0064] Nach der Aufbringung der Silberelektroden wird ein zweiter Elektroden-Druck durchgeführt, um Kohlenstoff-leitfähige Elemente **103**, **104** und **105** zu bilden, wie in [Fig. 10B](#) gezeigt. Das leitfähige Element **103** wird in Kontakt mit der Silber-Leitbahn **101** gebildet und wird die Arbeits-Elektrode im fertiggestellten Teststreifen bilden. Kohlenstoff-Felder („carbon pads“) **104** und **105** sind elektrisch mit den Enden der Silber-Leitbahnen **101** und **102** verbunden und stellen die Verbindung zwischen dem Streifen und einem Test-Meßgerät zur Verfügung. Die Kohlenstoff-leitfähigen Elemente können durch Raster-Druck mit einer leitfähigen Kohlenstoff-Tinten-Formulierung gebildet werden, wie z.B. denjenigen, die in den vorangegangenen Beispielen beschrieben sind.

[0065] Der nächste Schritt im Herstellungsprozeß ist die Ablagerung einer Isolationsschicht **106**, z.B. durch Rasterdruck einer Isolationstinte, z.B. der dielektrischen Tinte von Beispiel 2 ([Fig. 10C](#)). Wie gezeigt ist, enthält die Isolationsschicht drei Fenster **107**, **108** und **109**. Das Fenster **108** ist nach dem Ende des Kohlenstoff-leitfähigen Elementes **103** ausgerichtet. Das Fenster **107** ist mit dem Ende der Silber-Leitbahn **102** ausgerichtet, um Anschluß an die Referenz-Elektrode zur Verfügung zu stellen. Das dritte Fenster **109** wird zur Verfügung gestellt, um Durchlaß des Isolierungsmaterials von der zweiten isolierenden Beschichtung durch die Netzschicht zu erlauben, ist aber nicht erforderlich.

[0066] [Fig. 10D](#) zeigt den nächsten Schritt im Prozeß, welcher die Bildung einer integrierten Reagenz-Blut-Separationsschicht **110** ist. Diese Schicht wird über das Fenster **108** aufgetragen und erstreckt sich über die Isolationsschicht **106** entlang allen Seiten des Fensters **108**. Eine geeignete Formulierung für die Druck-Schicht **110** hat die folgende Zusammensetzung, um eine integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht mit einem gepufferten pH von ungefähr 6 zur Verfügung zu stellen:

Komponente	Menge
Wasser (analar)	3 l
Trinatriumcitrat	15,57 g
NAT 250 G	150 g
Zitronensäure	6,3 g
Polyvinylalkohol	30 g
DC 1500 Anti-Schäumer	15 ml
Cabosil	225 g
Glucoseoxidase	48 g
Kalium-Hex/60299	660 g
PVPVA	30 g

[0067] Nachdem die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht **110** gebildet ist, wird eine Schicht von Netz **111** über die Proben-Sammlungsregion des Teststreifens aufgebracht ([Fig. 10E](#)). Das Netz **111** ist bevorzugterweise ein Nylonnetz, welches mit Aceton und mit dem Oberflächen-aktiven Stoff Fluorad FC **170C** vorbehandelt wurde, um das Netz hydrophil zu machen. Der Zweck des Netzes **111** ist der gleichmäßige Transport der flüssigen Probe durch das Gebiet zwischen der Arbeits- und der Referenz-Elektrode.

[0068] Ein zweiter isolierender Druck **112** wird dann unter der Verwendung einer etwas flexibleren Isolations-Tinte (ERCON Insulayer 820202) durchgeführt, um die Proben-Sammlungsregion zu definieren ([Fig. 10F](#)). Eine Streifen-Abdeckung **113** wird dann über das obere der Teststreifen, wie oben in Beispiel 2 beschrieben, aufgebracht, um einen fertigen Teststreifen zu bilden ([Fig. 10G](#)).

Patentansprüche

1. Ein wegwerfbarer Teststreifen zur Verwendung in einem Test-Meßgerät des Typs, welcher einen wegwerfbaren Teststreifen und eine Blutprobe aufnimmt und eine elektrochemische Analyse der Menge eines Blutanalyten in der Probe durchführt, umfassend:

- (a) ein Substrat **(10)**;
- (b) ein erstes leitfähiges Element **(16)**, das auf dem Substrat angeordnet ist;
- (c) ein zweites leitfähiges Element **(14')**, das auf dem Substrat **(10)** in ausreichender Nähe zu dem ersten leitfähigen Element angeordnet ist, um einen elektrischen Stromkreis zwischen dem ersten und zweiten leitfähigen Element **(16, 14')** herzustellen, wenn eine Blutprobe auf den Teststreifen gegeben wird;
- (d) eine nicht-leitfähige, integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht **(17)**, die über dem ersten leitfähigen Element **(16)** angeordnet ist, wobei die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht **(17)** Reagenzien für die elektrochemische Detektion des Analyten umfaßt, die in einer nicht-leitfähigen Matrix verteilt sind, welche bewirkt, daß Blutzellen von der Oberfläche des ersten leitfähigen Elements **(16)** ausgeschlossen werden, während der Zutritt zu dem ersten leitfähigen Element **(16)** durch lösliche elektroaktive Spezies erlaubt wird;
- (e) Kontakte **(11, 12, 13, 14, 15)** für die Herstellung einer elektrischen Verbindung zwischen dem ersten und zweiten leitfähigen Element **(16, 14')** und dem Test-Meßgerät; und
- (f) eine Isolationsschicht **(18)**, die mindestens über dem ersten leitfähigen Element **(16)** angeordnet ist, dadurch charakterisiert, daß die Isolationsschicht eine erste Apertur **(96)** aufweist, die zu dem ersten leitfähigen Element **(16)** ausgerichtet ist, wobei die nicht-leitfähige, integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht **(17)** mit dem ersten leitfähigen Element **(16)** durch die Apertur **(96)** in der Isolationsschicht **(18)** in Kontakt kommt und wobei die nicht-leitfähige, integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht **(17)** durch Bedecken der gesamten ersten Apertur **(96)** gebildet wird, wobei kein Teil des ersten leitfähigen Elements **(16)** der auf den Teststreifen aufgebracht Probe direkt ausgesetzt wird.

2. Teststreifen nach Anspruch 1, wobei die integrierte Reagenz-Blut-Separationsschicht **(17)** ein Enzym für die Oxidation von Glucose und einen Redox-Vermittler umfaßt, der bewirkt, daß Elektronen von dem Enzym auf das erste leitfähige Element übertragen werden.

3. Teststreifen nach Anspruch 2, wobei die Matrix Silica umfaßt, das hydrophobe und hydrophile Oberflächen aufweist.

4. Teststreifen gemäß Anspruch 3, wobei die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht **(17)** von einer wäßrigen Zusammensetzung gebildet wird, die 2 bis 10 Gew.% eines Bindemittels; 3 bis 10 Gew.% Silica; 8 bis 20 Gew.% Redox-Vermittler und 1000 bis 5000 Einheiten des Enzyms pro Gramm der wäßrigen Zusammensetzung umfaßt.

5. Teststreifen nach Anspruch 3 oder 4, wobei das erste und zweite leitfähige Element **(16, 14')** leitfähigen Kohlenstoff umfaßt.

6. Teststreifen gemäß der Ansprüche 3, 4 oder 5, wobei das Enzym Glucoseoxidase ist.

7. Teststreifen gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei der Redox-Vermittler Ferricyankalium ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines wegwerfbaren Teststreifens für die Verwendung in einem Test-Meßgerät des Typs, welcher einen wegwerfbaren Teststreifen und eine Blutprobe aufnimmt und eine elektrochemische Analyse der Menge eines Blutanalyten in der Probe durchführt, umfassend:

- (a) Bilden der ersten und zweiten leitfähigen Elemente **(16, 14')** auf einem Substrat **(10)**;
- (b) Bilden einer Schicht zur Isolation **(18)**, die das erste leitfähige Element **(16)** bedeckt, wobei die Schicht zur Isolierung **(18)** eine erste Apertur **(96)** darin aufweist, die zu einem Teil des ersten leitfähigen Elements **(16)** in einer Proben-Auftragungsregion ausgerichtet ist;
- (c) Bilden einer Reagenzschicht **(17)**, die auf die Isolationsschicht **(18)** aufgetragen wird, und in Kontakt bringen mit dem ersten leitfähigen Element **(16)** durch die erste Apertur **(96)** in der Isolationsschicht **(18)**, wobei die Reagenzschicht **(17)** Reagenzien für die elektrochemische Detektion von Glucose umfaßt, die in einer nicht-leitfähigen Matrix verteilt sind, welche bewirkt, daß Blutzellen von der Oberfläche des ersten leitfähigen Elements **(16)** ausgeschlossen werden, während der Zutritt zur ersten leitfähigen Spezies durch lösliche elektroaktive Spezies erlaubt wird, wobei das erste leitfähige Element **(16)** vom direkten Kontakt mit einer Probe, die auf den Teststreifen gegeben wird, isoliert ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Reagenzschicht **(17)** eine nicht-leitfähige, integrierte Rea-

genz-Blut-Separationsschicht ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die nicht-leitfähige, integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht (17) durch Abdecken der gesamten ersten Apertur (96) gebildet wird, wobei kein Teil des ersten leitfähigen Elements (16) einer auf dem Teststreifen aufgetragenen Probe direkt ausgesetzt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht (17) ein Enzym zur Oxidation von Glucose und einen Redox-Vermittler umfaßt, der effektiv Elektronen von dem Enzym auf das erste leitfähige Element (16) überträgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Matrix aus Silica gebildet wird, das hydrophobe und hydrophile Oberflächen aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 10, 11 oder 12, wobei die integrierte Reagenz-/Blut-Separationsschicht (17) aus einer wäßrigen Zusammensetzung gebildet wird, die 2 bis 10 Gew.% eines Bindemittels; 3 bis 10 Gew.% Silica; 8 bis 20 Gew.% des Redox-Vermittlers und 1000 bis 5000 Einheiten des Enzyms pro Gramm der wäßrigen Zusammensetzung umfaßt.

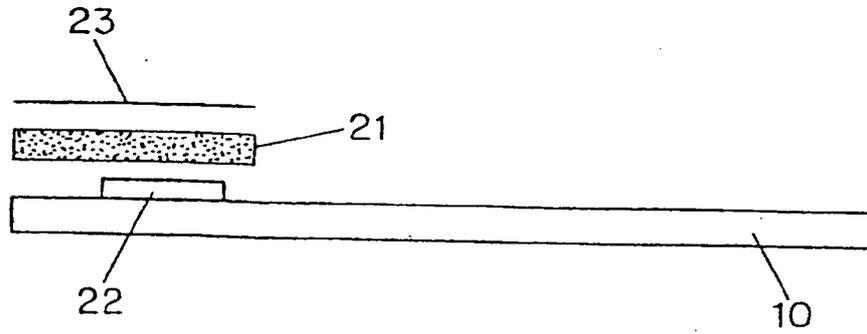
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei das erste und zweite leitfähige Element (16, 14') leitfähigen Kohlenstoff umfaßt.

15. Verfahren nach Anspruch 12, 13 oder 14, wobei das Enzym Glucoseoxidase ist.

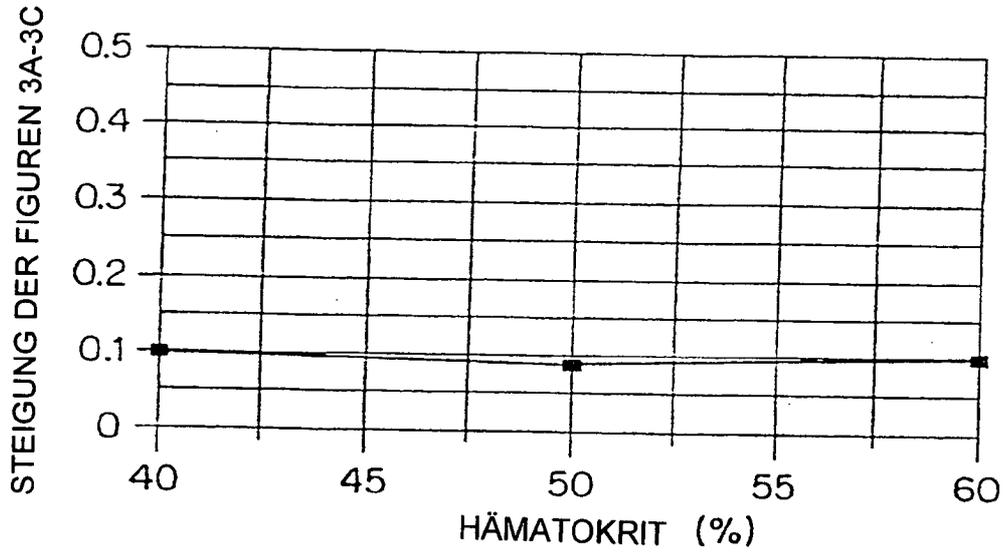
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Redox-Vermittler Ferricyankalium ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, wobei die Isolierungsschicht (18) über dem ersten und zweiten leitfähigen Element (16, 14') gebildet wird und eine zweite Apertur (94) einschließt, die nach dem zweiten leitfähigen Element (14') ausgerichtet ist.

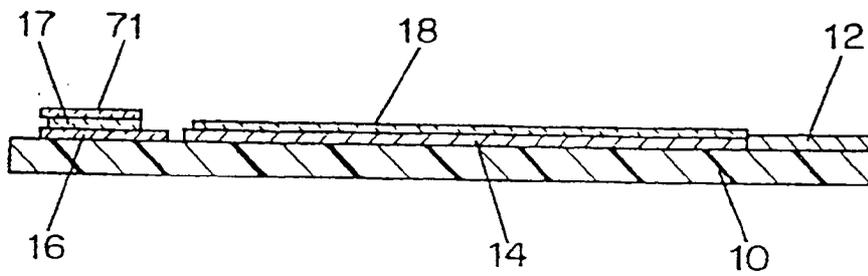
Es folgen 9 Blatt Zeichnungen



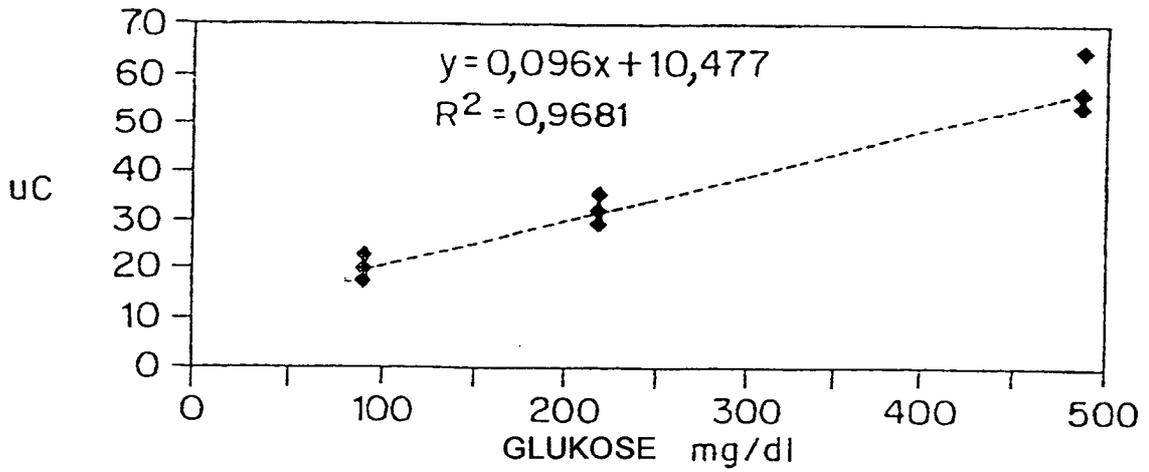
FIGUR 2



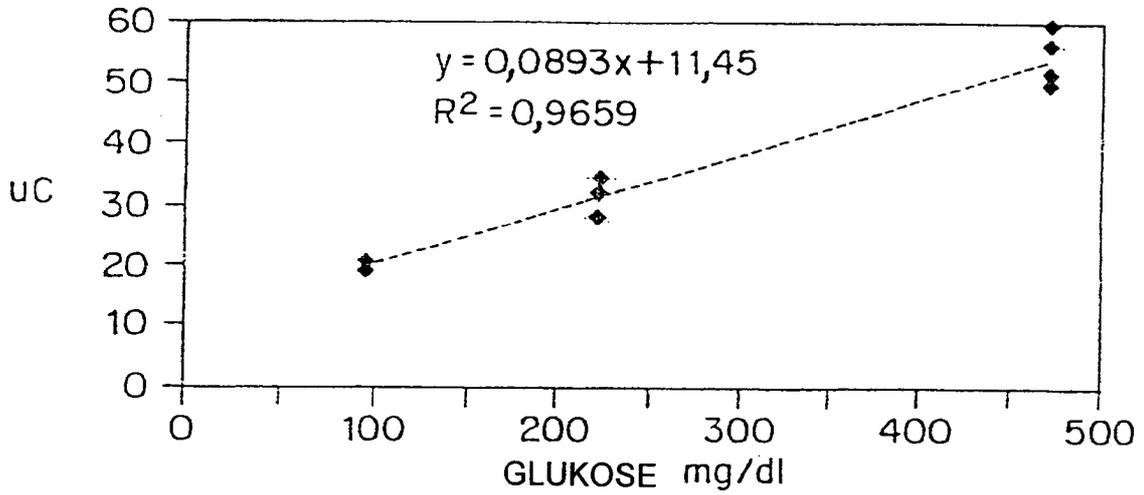
FIGUR 4



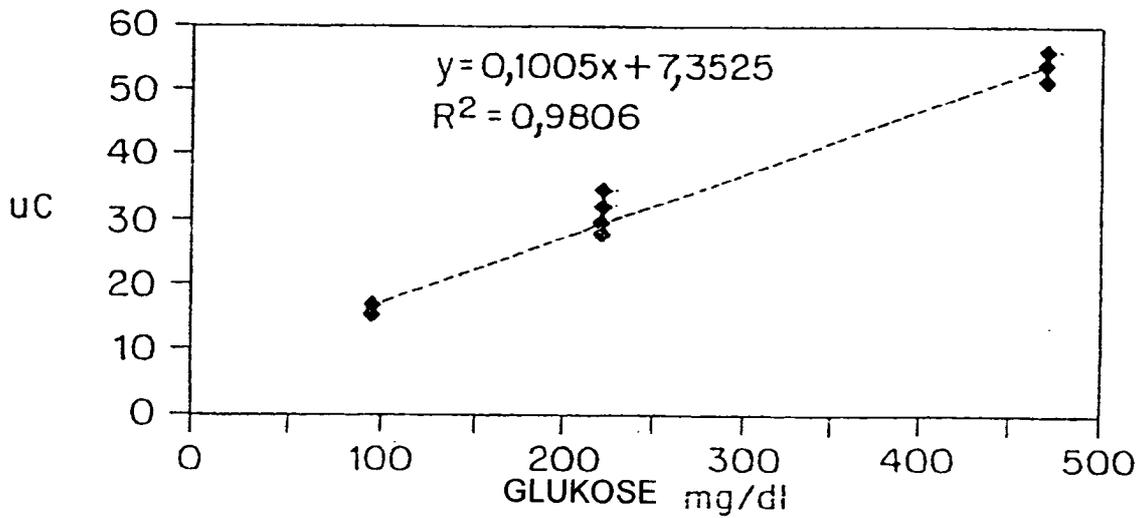
FIGUR 7



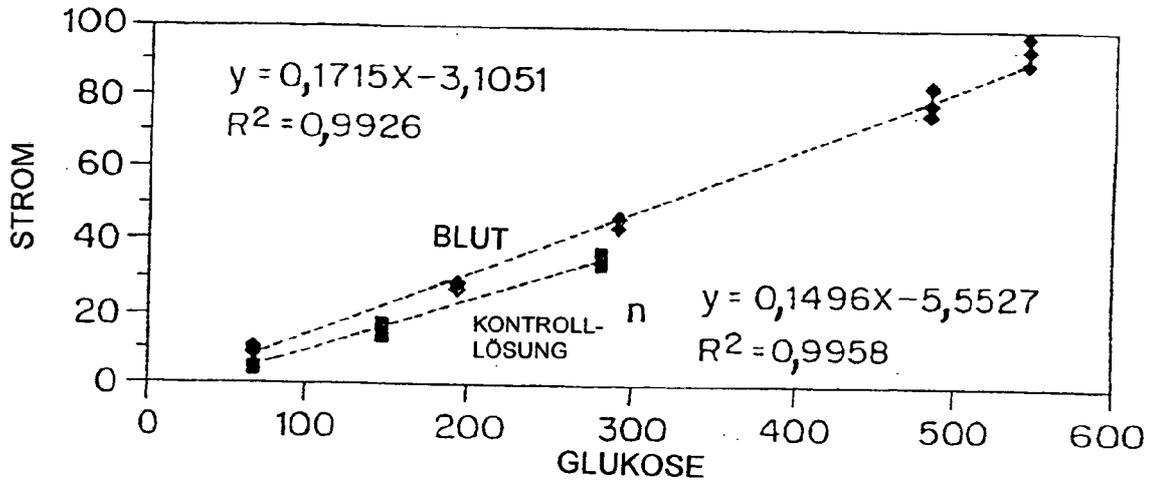
FIGUR 3A



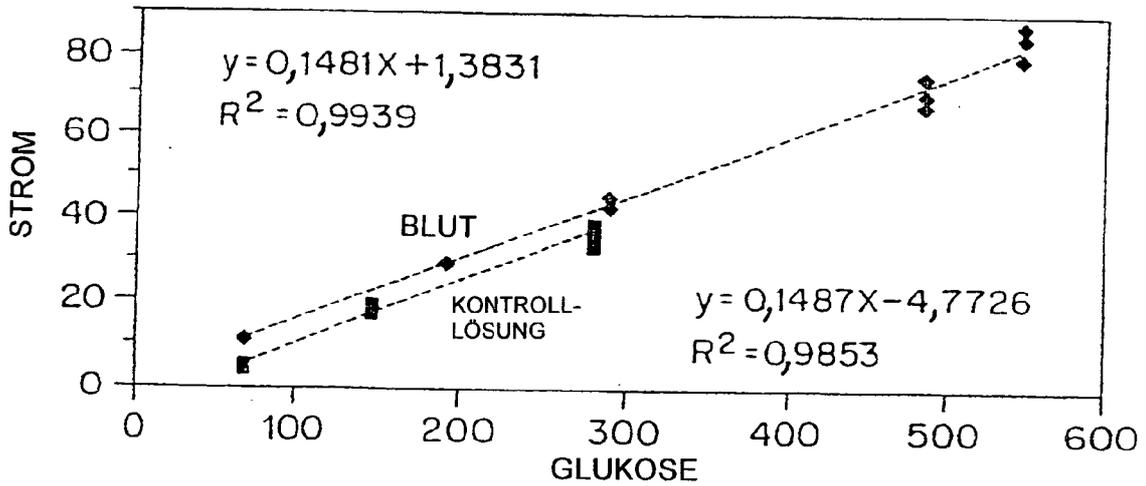
FIGUR 3B



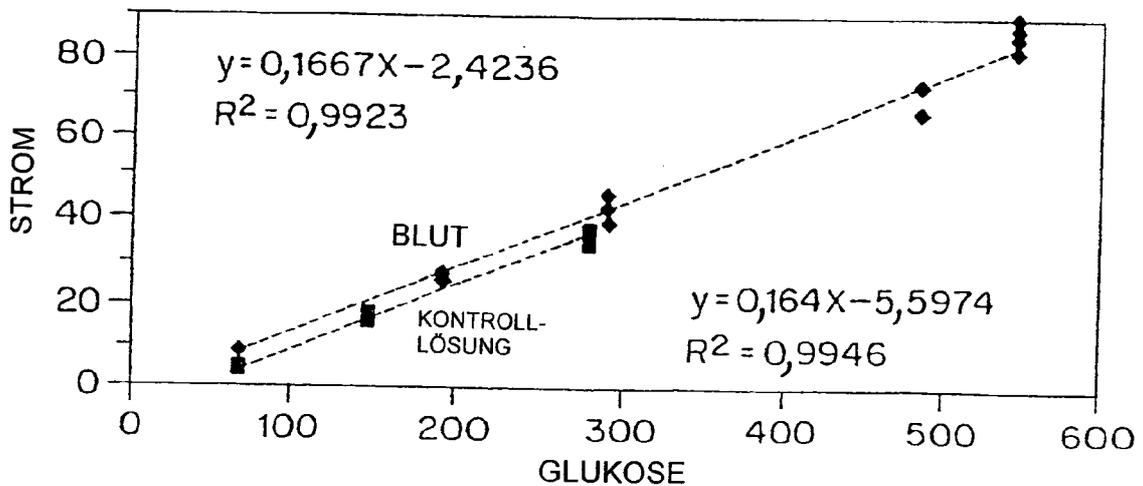
FIGUR 3C



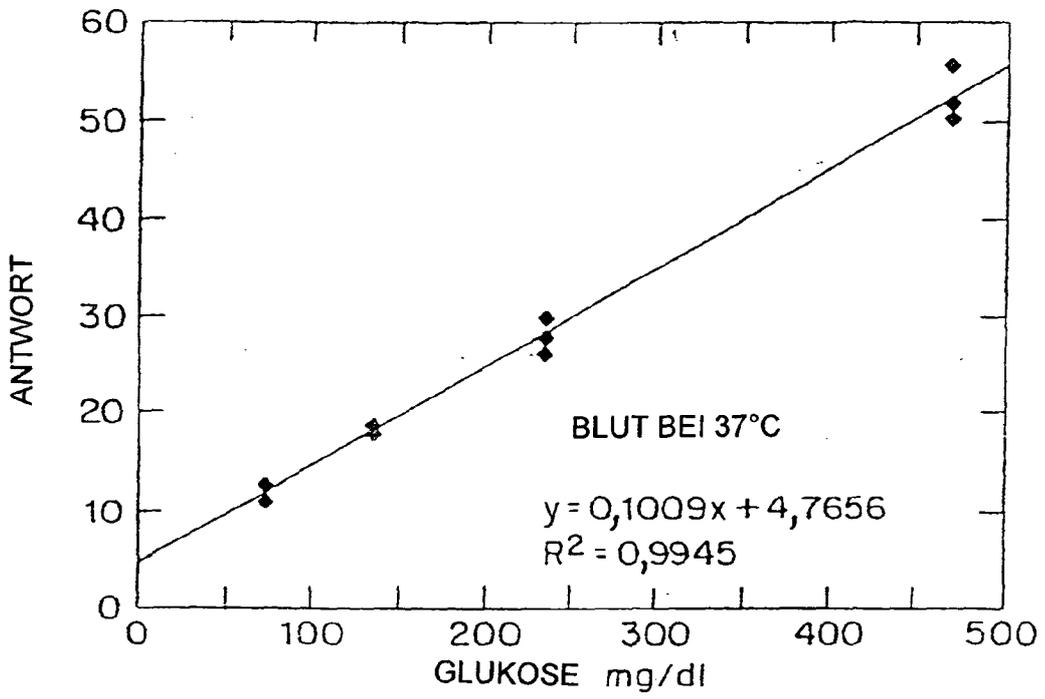
FIGUR 5A



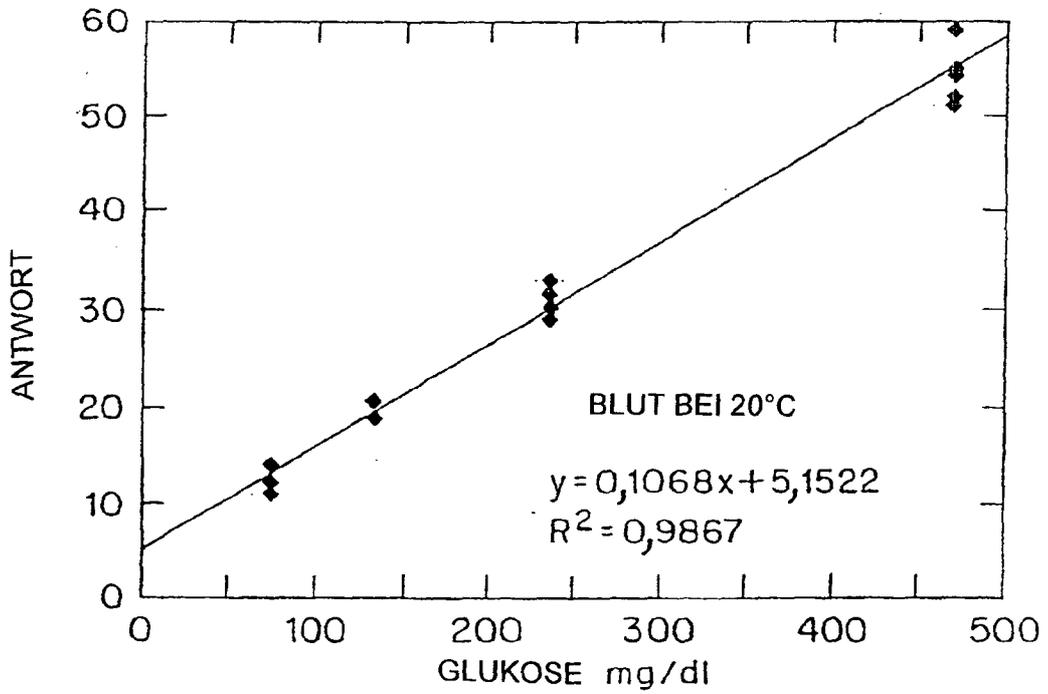
FIGUR 5B



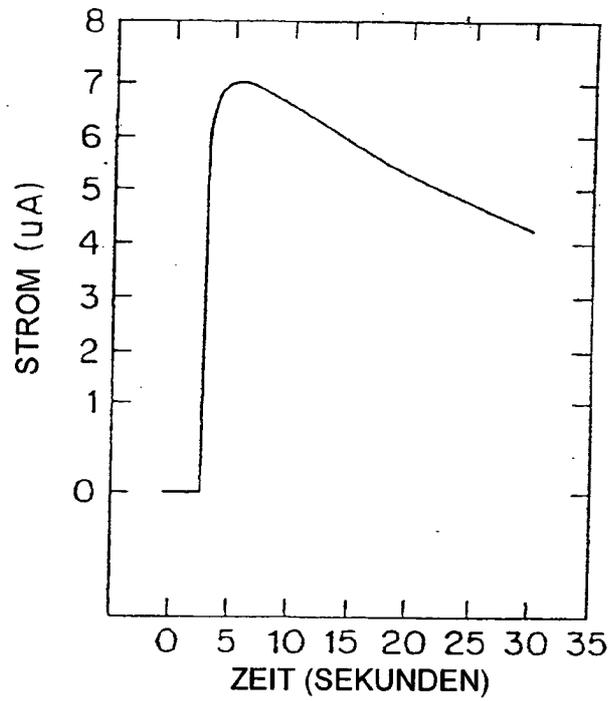
FIGUR 5C



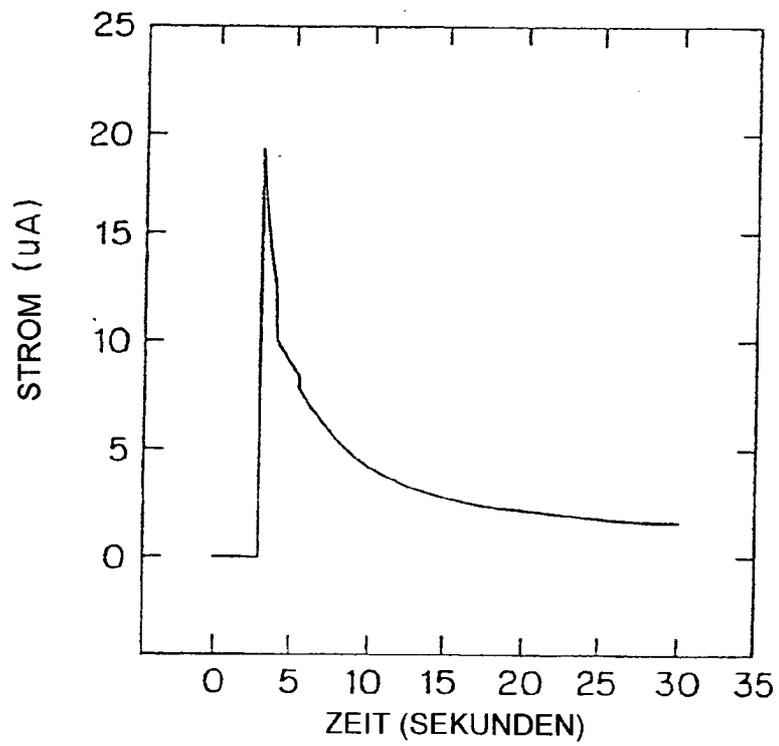
FIGUR 6A



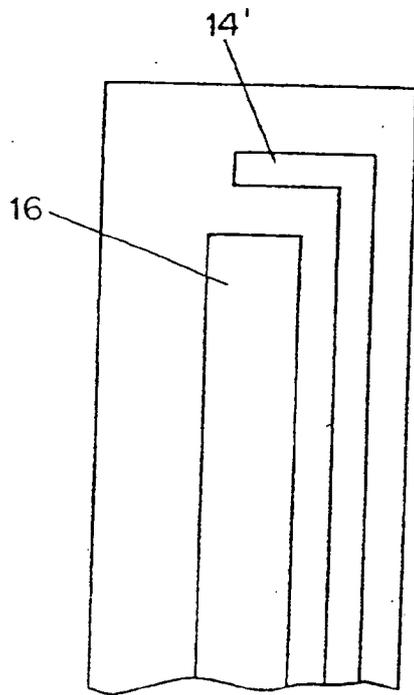
FIGUR 6B



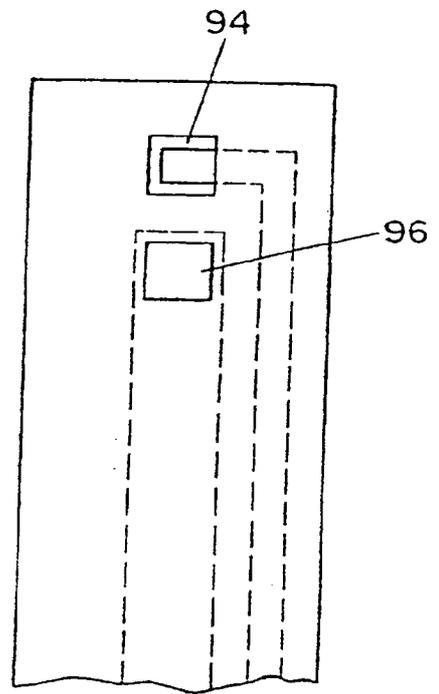
FIGUR 8A



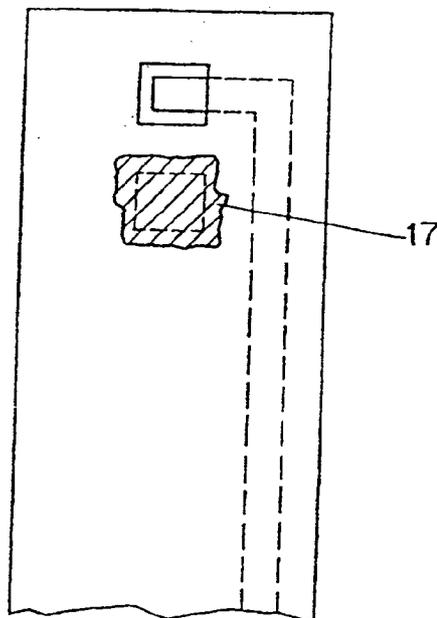
FIGUR 8B



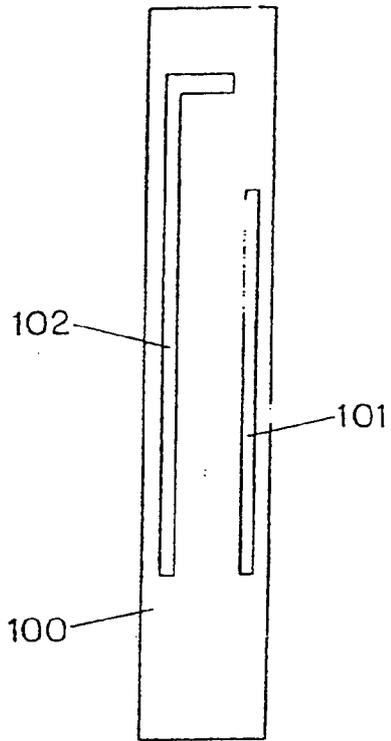
FIGUR 9A



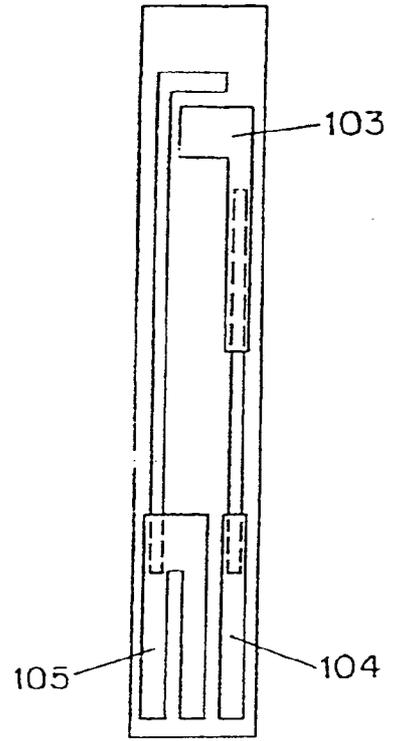
FIGUR 9B



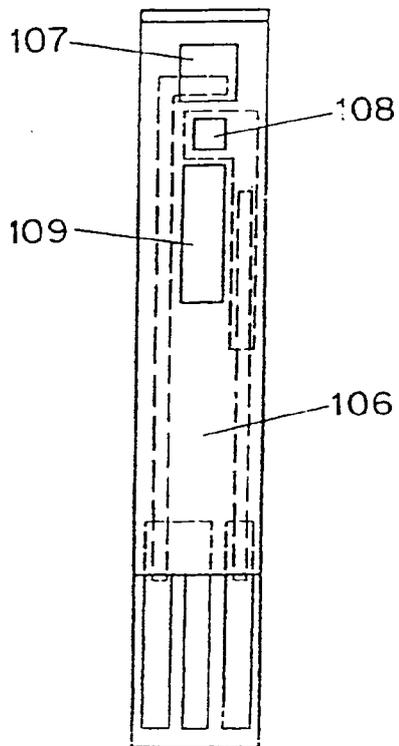
FIGUR 9C



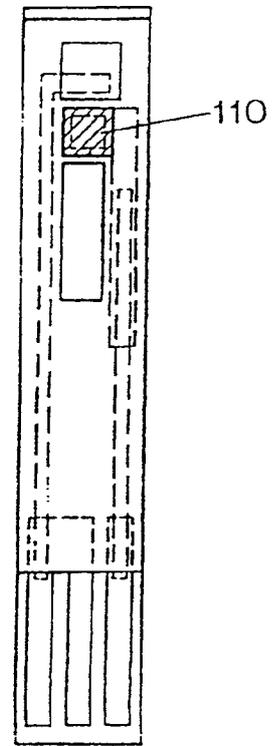
FIGUR 10A



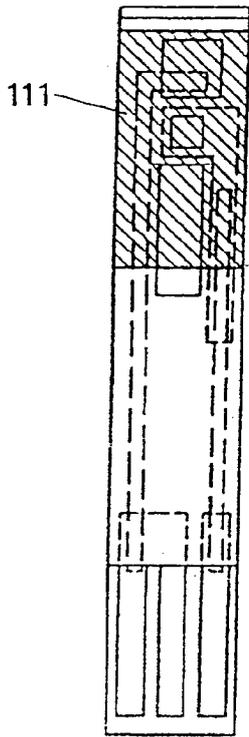
FIGUR 10B



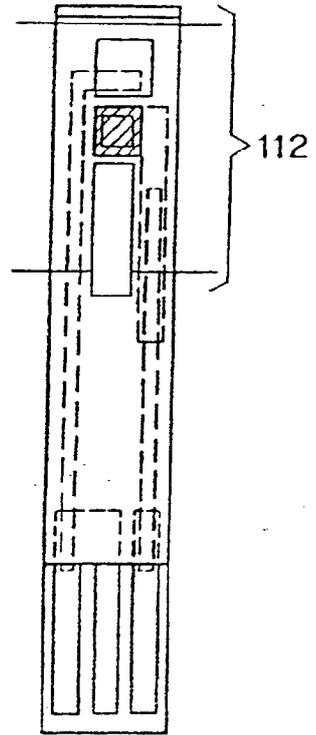
FIGUR 10C



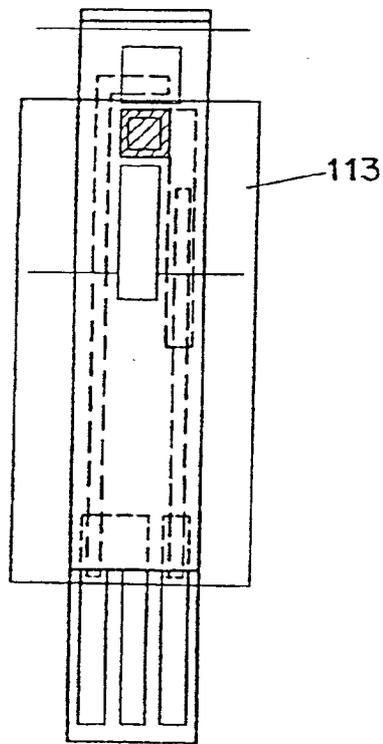
FIGUR 10D



FIGUR 10E



FIGUR 10F



FIGUR 10G