



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 664**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/54 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08003602 .3**

96 Fecha de presentación : **27.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **1964928**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Quinonas como mediadores de ensayos fotométricos.**

30 Prioridad: **27.02.2007 EP 07004083**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH
ROCHE DIAGNOSTICS GmbH

72 Inventor/es: **Knappe, Wolfgang**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 357 664 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Quinonas como mediadores de ensayos fotométricos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección óptica de un analito de una muestra, un reactivo de detección idóneo para este fin, kits y elementos de ensayo.

5 Los sistemas de medición de la analítica bioquímica constituyen componentes importantes de procedimientos analíticos clínicamente importantes. Ocupa un lugar predominante la medición de analitos, que pueden determinarse directa o indirectamente mediante enzimas. Los analitos se transforman para ello mediante un complejo de enzima-coenzima y después se cuantifica, empleando opcionalmente reactivos adicionales. Para ello se pone en contacto el analito a determinar con una enzima apropiada y una coenzima, empleando la enzima por lo general en una cantidad catalíticamente suficiente. La coenzima se modifica con la reacción enzimática, p.ej. se oxida o se reduce. Este proceso puede detectarse directa o indirectamente, por medios electroquímicos y/o fotométricos. Gracias al calibrado se consigue establecer una relación directa entre el valor medio y la concentración del analito a determinar.

10 Sin embargo, los procesos analíticos ya conocidos por el estado de la técnica adolecen de ciertos inconvenientes. Por ejemplo, recurren a numerosas tiras analíticas, que permiten la detección fotométrica del analito, este es un sistema de detección, en el que se emplea como enzima la glucosa-colorante-oxidoreductasa (GlucDOR; EC 1.1.5.2), una glucosa-deshidrogenasa dependiente de la PQQ. Al mismo tiempo que, en el marco de la reacción enzimática, se oxida el sustrato, tiene lugar una reducción simultánea de la coenzima correspondiente. En el caso de la coenzima PQQ (PQQ: pirroloquinolinaquinona; ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrololo[2,3-f]-quinolina-2,7,9-tricarboxílico) tiene lugar una reducción que conduce a la PQQH₂, que, a su vez, puede ceder electrones a un indicador óptico reducible. El inconveniente de este sistema estriba en la escasa especificidad de la glucosa-colorante-oxidoreductasa, que además de la glucosa hace reaccionar también a otros sacáridos, por ejemplo la maltosa y la galactosa y, debido a la reacción secundaria, puede arrojar resultados ligeramente falseados.

15 La glucosa-deshidrogenasa dependiente de la NAD⁺ (EC 1.1.1.47) es una enzima, que en presencia de la coenzima dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD⁺) cataliza la oxidación de la glucosa a la glucono-δ-lactona y posee una especificidad claramente superior para la glucosa que para la glucosa-colorante-oxidoreductasa. Por ejemplo, en el ensayo en cubeta (o en ensayos de química húmeda o en solución), la glucosa-deshidrogenasa provoca la reacción de la glucosa y además de la xilosa y manosa, pero solamente en un 15% y un 8%, respectivamente, mientras que la galactosa y la fructosa no constituyen sustratos apropiados para la enzima (Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Company, 2ª edición, 1994, coordinadores: C.A. Burtis, E.R. Ashwood, páginas 964-965).

20 El NADH formado en el marco de la oxidación de la glucosa con glucosa-deshidrogenasa y posterior reducción de la NAD⁺, tiene una reactividad escasa y no reacciona directamente con indicadores ópticos reducibles, por ejemplo el ácido molibdatofosfórico o las 4-nitrosoanilinas. Para contrarrestar esta lentitud de reacción del NADH se emplean en la práctica mediadores que aumentan la reactividad de la coenzima. Como mediadores se conocen ya por ejemplo la diaforasa (EC 1.6.99.2) o el metosulfato de N-metil-fenazonio inestable.

25 En EP 0 831 327 A1 se describe el uso de compuestos activos en reacciones redox para la fabricación de reactivos de detección en un procedimiento de determinación de un analito, así como kits de reactivos, que contienen estos compuestos activos en reacciones redox. Como compuestos activos en reacciones redox se describen en este contexto los compuestos con subestructura de benzoquinoxalindiona, que entre otros pueden utilizarse también como mediadores para aplicaciones colorimétricas y electroquímicas.

30 En EP 1 566 637 A1 se describen elementos de ensayo y procedimientos para la detección óptica de analitos, dichos elementos de ensayo constan de un soporte por lo menos en parte ópticamente en alto grado transparente y una película monocapa reactiva, que contiene un reactivo para la determinación del analito, dicha película tiene un grosor de ≤ 10 μm. El reactivo comprende por lo menos una enzima y por lo menos un sustrato enzimático que puede detectarse directa o indirectamente después de la reacción enzimática.

35 En WO 99/19507 se describe el uso de compuestos de fenantrolinaquinona como mediadores en el marco de la detección amperométrica de analitos. Para ello se deposita una muestra, en la que se quiere detectar la presencia de un analito, sobre una tira analítica electroquímica, que consta de un soporte, un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia/contraelectrodo así como elementos conductores, se oxida el analito con una enzima dependiente de la nicotinamida en presencia de una coenzima de la nicotinamida y del mediador y se mide la corriente requerida para la reoxidación del mediador reducido, dicha corriente guarda relación con la concentración del analito.

40 En WO 2004/038401 A2 se describen biosensores para la detección amperométrica de la concentración de analitos, por ejemplo glucosa, 3-hidroxiacetato y lactato, de una muestra empleando tiras analíticas electroquímicas, descritas en WO 99/19507. Como mediador se emplea la 1,10-fenantrolina-5,6-quinona, que para proteger contra el oxígeno se combina con iones de metales de transición (p.ej. manganeso, hierro, osmio, etc.) o iones de metales alcalinotérreos pesados (p.ej. calcio, bario, etc.).

45 El inconveniente de los procedimientos descritos en WO 99/19507 y WO 2004/038401 A2 estriba en el uso de elementos analíticos electroquímicos, que, en el marco de una detección cualitativa o cuantitativa del analito, no

permiten la comprobación visual de la verosimilitud de los resultados obtenidos en la medición por cotejo con los colores de referencia.

5 El objeto de la invención consiste, pues, en desarrollar un procedimiento de detección de analitos de una muestra, que permita una ejecución sencilla y económica y al mismo tiempo una gran selectividad y seguridad de medición.

Este objeto se consigue según la invención con un procedimiento de detección óptica de un analito de una muestra, que consta de los pasos siguientes:

10 a) poner en contacto la muestra con un reactivo de detección, formado por una oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, una coenzima de nicotinamida reducible, un mediador, que es una quinona y un indicador óptico reducible o un sistema de indicador óptico reducible, dicho analito se oxida con una oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, se reduce la coenzima de nicotinamida y se transfieren los electrones de la coenzima de nicotinamida reducida a través del mediador al indicador óptico o al sistema de indicador óptico y

b) determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador,

15 dicha oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida es una alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), una glucosa-deshidro-genasa (EC 1.1.1.47) o una glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), el indicador óptico es un heteropoliácido y el mediador es una 1,10-fenantrolinaquinona, una 1,7-fenantrolinaquinona, una 4,7-fenantrolinaquinona o una sal N-alquilada o N,N'-dialquilada de las mismas.

20 El procedimiento de la invención sirve para la detección óptica de un analito de una muestra, que puede proceder de cualquier tipo de fuente. En una forma preferida de ejecución la muestra procede de un fluido corporal, que incluye, pero no se limita a: la sangre total, el plasma, el suero, el líquido linfático, el líquido biliar, el líquido cerebroespinal, la orina, así como los líquidos segregados por glándulas, por ejemplo la saliva o el sudor, siendo especialmente preferidos la sangre total, el plasma y el suero. La cantidad de muestra requerida para la realización de los análisis se sitúa por lo general entre 0,01 μ l y 100 μ l, con preferencia entre 0,1 μ l y 2 μ l.

25 El analito a determinar por métodos cualitativos y cuantitativos es una sustancia biológica o química, que pueda detectarse en una reacción redox. El analito se elige con preferencia entre el grupo formado por el alcohol y la glucosa. En otra forma especialmente preferida de ejecución, el analito a determinar es la glucosa.

30 En el marco de la presente invención se pone en contacto la muestra para la detección del analito con un reactivo de detección de la invención, que comprende una oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, una coenzima de nicotinamida reducible, un mediador, que es una quinona, y un indicador óptico reducible o un sistema de indicador óptico reducible; dicho analito se oxida con la oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, con ello se reduce la coenzima de la nicotinamida y los electrones de la coenzima de nicotinamida reducida se transfieren a través del mediador al indicador óptico o al sistema de indicador óptico.

35 La oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida es una alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), glucosa-deshidro-genasa (EC 1.1.1.47) o glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49). La oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida es con preferencia la glucosa-deshidrogenasa.

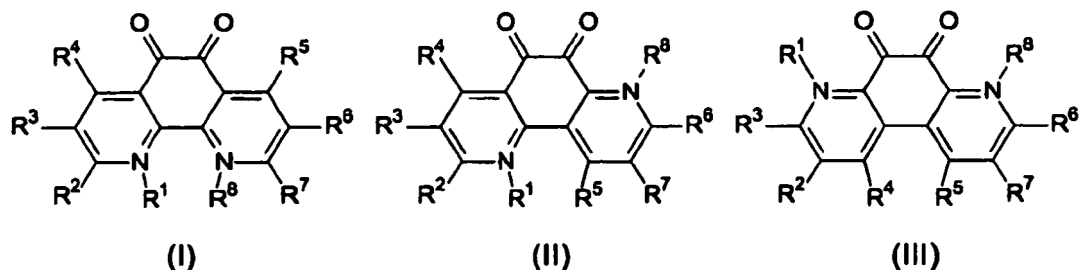
40 La presente invención prevé que la coenzima de la nicotinamida reducible sea cualquier molécula natural o sintética de bajo peso molecular, que como componente contenga la nicotinamida, sea reducible y tenga la capacidad de formar junto con una oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, que ya se ha descrito antes, un complejo enzima-coenzima. La coenzima de la nicotinamida reducible de la presente invención es con preferencia una coenzima de la nicotinamida de origen natural, en especial un dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD^+) o dinucleótido de nicotinamida-fosfato de adenina (NADP^+), que por reducción dan lugar a la NADH o la NADPH. De todos modos, si fuera apropiado para la finalidad buscada, pueden utilizarse opcionalmente los derivados de la NAD^+ o NADP^+ . Los derivados de la NAD^+ o NADP^+ , que pueden ser útiles en el marco de la presente invención, abarcan entre otros a los derivados CarbaNAD que se han descrito por ejemplo en WO 98/33936, WO 01/94370, DE 10 2006 035 020.0 y en dos publicaciones del año 1989 (Slama y col., Biochemistry 27, 183-193, 1989; Slama y col., Biochemistry 28, 7688-7694, 1989), a cuya publicación se remite.

50 El reactivo de detección, que se emplea en el marco del procedimiento de la invención, además de la oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida y de la coenzima de la nicotinamida reducible contiene también un mediador, que es una quinona. El mediador es capaz de transferir electrones de una coenzima de la nicotinamida reducida por reacciones redox a un indicador óptico o un sistema de indicador óptico. En el marco de esta transferencia de electrones, en un primer paso se reduce la quinona a una semiquinona o a una dihidroquinona, después tiene lugar la reoxidación de la forma reducida por acción del indicador óptico o del sistema de indicador óptico.

55 Según la invención se emplea como mediador una 1,10-fenantrolinaquinona, 1,7-fenantrolinaquinona, 4,7-fenantrolinaquinona o una sal N-alquilada o N,N'-dialquilada de las mismas. En el caso de las sales N-alquiladas o N,N'-dialquiladas de los compuestos anteriores, cualquier anión podrá actuar como contraión del mediador, siendo preferidos

como contraiones los halogenuros, el trifluormetanosulfonato u otros aniones que aumenten la solubilidad. En otra forma especialmente preferida de ejecución se emplea como contraión un halogenuro o un trifluormetanosulfonato.

El mediador es con preferencia una 1,10-fenantrolina-5,6-quinona de la fórmula general (I), una 1,7-fenantrolina-5,6-quinona de la fórmula general (II) o una 4,7-fenantrolina-5,6-quinona de la fórmula general (III),



5

en las que

de R² a R⁷ con independencia entre sí significan H, halógeno, OH, O(alquilo), OCO(alquilo), S(alquilo), NH₂, NH(alquilo), N(alquilo)₂, [N(alquilo)₃]⁺, CN, NO₂, COOH, SO₃H, o un resto alquilo lineal o ramificado, un resto cicloalquilo, un resto arilo o un resto heteroarilo, que pueden estar eventualmente sustituidos una o varias veces, y

10 R¹ y R⁸ con independencia entre sí significan un par de electrones libres, H o un resto alquilo lineal o ramificado, que puede estar eventualmente sustituido una o varias veces, o una sal del mismo.

Con preferencia, uno de los restos R¹ y R⁸ o los dos restos R¹ y R⁸ significan un resto alquilo lineal o ramificado, que puede estar eventualmente sustituido una o varias veces, y significan en especial un resto metilo, teniendo el contraión del mediador el significado definido antes.

15 El término "halógeno" abarca flúor, cloro, bromo e yodo.

El término "alquilo" indica un resto hidrocarburo lineal o ramificado que tiene 1-30 átomos de carbono y una valencia de enlace en uno cualquiera de los átomos de carbono del resto. Alquilo significa con preferencia resto de hidrocarburo de 1-12 átomos de carbono, con mayor preferencia de 1-6 átomos de carbono. Son especialmente preferidos los restos de hidrocarburo de 1-4 átomos de carbono, que comprenden al metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y tert-butilo.

20

El término "cicloalquilo" indica un resto de hidrocarburo cíclico de 3-20 átomos de carbono y una valencia de enlace en uno cualquiera de los átomos de carbono del anillo. Cicloalquilo significa con preferencia un resto de hidrocarburo cíclico de 3-12 átomos de carbono, con mayor preferencia de 3-8 átomos de carbono. Los restos de hidrocarburo cíclicos especialmente preferidos abarcan al ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

25

El término "arilo" indica un sistema de anillo aromático, de 3-20 átomos en el anillo, con mayor preferencia de 6-14 átomos en el anillo, que además de carbonos contiene exclusivamente hidrógeno y tiene una valencia de enlace en uno cualquiera de los átomos de carbono del anillo. Los ejemplos especialmente preferidos de arilo en el sentido en el sentido de la presente invención abarcan al benceno, naftaleno, antraceno y fenantreno.

El término "heteroarilo" indica un sistema de anillo aromático de 3-20 átomos en el anillo, con mayor preferencia de 5-14 átomos en el anillo, que además de carbono e hidrógeno contiene por lo menos un heteroátomo y tiene una valencia de enlace en uno cualquiera de los átomos de carbono o en uno cualquiera de los átomos de nitrógeno del anillo. Los ejemplos de heteroarilo de 5 átomos en el anillo abarcan al tienilo, tiazolilo, furanilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo y tiadiazolilo. Los heteroarilos de 6 átomos en el anillo abarcan por ejemplo al piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo y triazinilo. Los heteroarilos de 5 ó 6 átomos en el anillo contienen con preferencia 1-4 átomos de nitrógeno y/o 1-2 átomos de oxígeno y/o 1-2 átomos de azufre, que pueden aparecer en el sistema de anillo en todas las subcombinaciones, en el supuesto de que no superen el número de heteroátomos prefijado para el caso ni sumados superen la cifra máxima de cuatro heteroátomos.

35

La expresión "eventualmente sustituido una o varias veces" indica que el resto en cuestión está sin sustituir o sustituido una o varias veces, tomándose en consideración como sustituyentes en especial el halógeno, OH, O(alquilo), OCO(alquilo), S(alquilo), grupos amino primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios, CN, NO₂ y/o grupos ácido, por ejemplo COOH y SO₃H. Con preferencia especial, los sustituyentes son grupos que aumentan la solubilidad del mediador en la muestra a analizar, por ejemplo grupos amino cuaternario, COOH y SO₃H.

40

En la forma de ejecución más especialmente preferida se emplea como mediador para la ejecución del procedimiento de la invención la N-metil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona, N,N'-dimetil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona, N-metil-1,7-fenantrolinio-5,6-quinona, N,N'-dimetil-1,7-fenantrolinio-5,6-quinona, N-metil-4,7-fenantrolinio-5,6-quinona o N,N'-dimetil-4,7-fenantrolinio-5,6-quinona, teniendo el contraíón del mediador el significado definido anteriormente.

5 Como indicador óptico o como sistema de indicador óptico se emplea una sustancia que sea reducible y a raíz de la reducción experimente una alteración detectable en sus propiedades ópticas, por ejemplo el color, la fluorescencia, la remisión, la transmisión, la polarización y/o el índice de refracción. La determinación de la presencia y/o de la cantidad de analito en la muestra por detección óptica puede realizarse a simple vista y/o mediante un dispositivo de detección aplicando un procedimiento fotométrico que el experto considera apropiado, deberá darse preferencia a la
10 inspección a simple vista. Según la invención se emplea como indicador óptico un heteropoliácido, en especial el ácido molibdatofosfórico, que se reduce para dar lugar al correspondiente heteropoliázul.

En otra forma preferida de ejecución se realiza el procedimiento de la invención sobre un sustrato, que comprende una zona de aplicación en la que se deposita la muestra, una zona de reacción para que el analito reaccione con el reactivo de detección, una zona de detección para determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la
15 muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador, y eventualmente una zona de desechos. El sustrato puede estar formado por un solo material que tenga actividad capilar, o como alternativa puede estar compuesto por varios materiales que tengan actividad capilar, que pueden ser iguales o distintos. Estos materiales están en estrecho contacto entre sí, de modo que se forme un tramo de transporte del líquido, a lo largo del cual una muestra líquida avanzará desde la zona de aplicación, pasará por la zona de reacción y por la zona de detección y
20 eventualmente se recogerá en la zona de desechos. En una forma preferida de ejecución, el sustrato es un elemento de ensayo, por ejemplo una tira analítica o un biosensor.

Los elementos de ensayo, que pueden emplearse en el marco de la presente invención, se han descrito entre otros en los documentos U.S. 5,271,895, U.S. 6,207,000, U.S. 6,540,890, U.S. 6,755,949, U.S. 7,008,799, U.S. 7,025,836, U.S. 7,067,320, U.S. 2003/0031592 A1 y U.S. 2006/0003397 A1, a los que se remite como referencias.

25 La muestra a analizar se deposita con preferencia directamente sobre la zona de aplicación del sustrato, por ejemplo sumergiendo la zona de aplicación del sustrato en la muestra o bien depositando la muestra por goteo sobre la zona de aplicación del sustrato. Como alternativa existe la posibilidad de absorber en primer lugar la muestra en un elemento de transferencia seco o húmedo, desde aquí se transfiere después la muestra a la zona de aplicación del sustrato, si fuera necesario realizando una humidificación de este. Normalmente, el elemento de transferencia es un
30 dispositivo estéril, que puede estar formado por materiales naturales y/o sintéticos. Los elementos de transferencia apropiados se han descrito por ejemplo en los documentos DE 44 39 429 y DE 196 22 503, a los que se remite como referencias.

La zona de reacción abarca el reactivo de detección de la invención y sirve para realizar la reacción del analito. En el marco de esta reacción, el analito se oxida con la oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, al mismo tiempo tiene lugar la reducción de la coenzima de la nicotinamida. A continuación se transfieren los electrones de la coenzima de nicotinamida reducida a través del mediador al indicador óptico o al sistema de indicador óptico, que experimenta una alteración de sus propiedades ópticas. La alteración de las propiedades ópticas del indicador óptico o del sistema de indicador óptico se detecta en la zona de detección del elemento de ensayo.
35

En una forma especialmente preferida de ejecución, el procedimiento de la invención permite una determinación rápida de la presencia y/o de la cantidad del analito en la muestra a analizar. La expresión "determinación rápida", empleada en el marco de la presente solicitud, significa que la determinación de la presencia y/o de la cantidad del analito tiene lugar en un tiempo de 1 a 30 segundos después de poner en contacto la muestra a analizar con el reactivo de detección, considerándose como preferido un tiempo de 2 a 15 segundos.
40

Para poder conseguir estos tiempos de reacción tan cortos es preferido que el mediador se disuelva rápidamente en la muestra a analizar, es decir, por ejemplo en un período de tiempo de pocos segundos de poner en contacto la muestra con el reactivo de detección. Una disolución rápida del mediador puede conseguirse por ejemplo por introducción de sustituyentes apropiados en la molécula del mediador que aumenten la solubilidad, por encapsulado del mediador en micelas, por el reparto muy fino, casi amorfo del mediador en el elemento de ensayo y/o con sales, en este caso eligiendo oportunamente un contraíón adecuado.
45

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección óptica de un analito de una muestra, que comprende el reactivo de detección de la invención y un elemento de ensayo. El elemento de ensayo comprende una zona de aplicación sobre la que se deposita la muestra, una zona de reacción para que el analito reaccione con el reactivo de detección, una zona de detección para determinar de la presencia y/o de la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador, y eventualmente una zona de desechos; en lo referente a las posibles formas de ejecución del elemento de ensayo se remite a las formas de ejecución en el marco de la descripción del procedimiento de la invención.
50
55

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un elemento de ensayo para la detección óptica de un analito de una muestra. El elemento de ensayo consta de una zona de aplicación en la que se deposita la muestra, una

5 zona de reacción que contiene una oxidoreductasa dependiente de la nicotinamida, una coenzima de la nicotinamida reducible, un mediador, que es una quinona, y un indicador óptico reducible o un sistema de indicador óptico reducible, en la que el analito reacciona con el reactivo de detección, una zona de detección para determinar de la presencia y/o de la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador, y eventualmente una zona de desechos.

10 El elemento de ensayo de la invención puede utilizarse por ejemplo para la determinación de analitos elegidos entre el grupo formado por alcohol y glucosa. En el marco de la presente invención es preferido un elemento de ensayo, que sirve para la determinación de la glucosa en la sangre total, en el plasma o en el suero y que contiene un reactivo de detección que, como oxidoreductasa dependiente de la nicotinamida, contiene la glucosa-deshidrogenasa y, como coenzima de la nicotinamida, contiene la NAD(P)⁺.

La invención se ilustra con más detalle con la figura y ejemplo que siguen.

Figura

15 En la figura 1 se representa la remisión de un elemento de ensayo de la invención, que, como mediador, contiene la N-metil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona en función de la longitud de onda y después de poner en contacto una muestra que contiene 400 mg/dl de glucosa con 10 µl de EDTA-sangre total. Los espectros demuestran que la reacción es rápida y que queda prácticamente finalizada después de 12 s.

Los espectros se registran a intervalos de 3 s en un espectrómetro de remisión del tipo "TIDAS 16", equipado con un foco de luz CLH de wolframio-halógeno y un espectrómetro simultáneo de matriz de diodos MCS (ambos de la empresa Zeiss), que a su vez están conectados a conductores ópticos.

20 Ejemplo

Para la fabricación del elemento de ensayo de la invención, sobre una capa de soporte de poliéster de tipo cinta de 50 mm de anchura, que contiene dióxido de titanio, se coloca a una distancia de 18,6 mm (medidos con respecto al borde izquierdo de la cinta adhesiva) con respecto al borde izquierdo en primer lugar una cinta adhesiva por ambas caras, de 5 mm de anchura (sustrato de poliéster y adhesivo de caucho sintético). En esta cinta compuesta se troquelan dos orificios separados por una distancia de 6 mm, un orificio de posicionado y un orificio de inspección y medición, cuyos puntos centrales están situados sobre una recta que es perpendicular al eje longitudinal de la cinta del sustrato. El primer orificio, el orificio de posicionado, es redondo como un círculo y tiene un diámetro de 2,6 mm, la distancia entre el centro de este orificio y el borde izquierdo de la cinta sustrato es de 4 mm. El segundo orificio es también redondo y tiene un diámetro de 4 mm. La distancia del centro del segundo orificio al borde izquierdo de la cinta sustrato es de 21 mm. A continuación se arranca el papel protector de la cinta adhesiva por ambas caras.

Para fabricar la capa de detección formada por 2 capas de tipo película se introducen en un vaso de precipitados los componentes siguientes en forma de sustancias puras o en forma de soluciones patrón, en el orden siguiente y se mezclan por agitación.

35	agua	60,5 g
	goma xantano	0,34 g
	tampón fosfato 0,1 M de pH 6,5	20,0 g
	cloruro de tetraetilamonio	0,14 g
	N-octanoil-N-metil-glucamida	0,17 g
	N-metil-N-oleoil-taurato sódico	0,03 g
40	polivinilpirrolidona (PM = 25.000)	0,87 g
	Transpafill (aluminosilicato sódico)	5,45 g
	dispersión de poli(propionato de vinilo (al 50 % en peso en agua):	
	N-metil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona	4,88 g
	sulfonato de trifluormetilo	0,11 g
45	cloruro sódico	0,98 g
	NAD	0,99 g
	sal hexasódica del ácido 2,18-fosfomolibdico	0,64 g

	glucosa-deshidrogenasa	327 KU (1,35 g)
	hexacianoferrato(III) potásico	0,02 g
	1-hexanol	0,17 g
	1-metoxi-2-propanol	4,30 g
5	Se ajusta la mezcla total a pH 6,7 con NaOH y después se deposita con un peso por unidad de superficie de 89 g/m ² sobre una lámina de policarbonato de un grosor de 125 µm y se seca.	
	A continuación se introducen en un vaso de precipitados en el orden indicado los siguientes componentes en forma de sustancias puras o en forma de soluciones patrón y se mezclan por agitación.	
	agua	65,0 g
10	Gantrez (copolímero de ácido maleico y éter de metilo y vinilo)	1,36 g
	NaOH	0,30 g
	tampón fosfato 0,1 M de pH 6,5	4,41 g
	cloruro de tetraetilamonio	0,34 g
15	N-octanoil-N-metil-glucamida	0,34 g
	N-metil-N-oleoil-taurato sódico	0,03 g
	polivinilpirrolidona (PM = 25.000)	1,86 g
	dióxido de titanio E 171	14,37 g
	ácido silícico precipitado 320	1,96 g
20	dispersión de poli(propionato de vinilo) (50 % en peso en agua)	
	N-metil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona	5,77 g
	sulfonato de trifluormetilo	0,38 g
	sal hexasódica del ácido 2,18-fosfomolibdico	1,11 g
	hexacianoferrato(III) potásico	0,01 g
25	1-hexanol	0,16 g
	1-metoxi-2-propanol	4,26 g
	Se ajusta la mezcla total a aprox. pH 6,7 con NaOH y se deposita como segunda capa con un peso por unidad de superficie de 104 g/m ² sobre la lámina de policarbonato antes descrita, que tiene un recubrimiento simple.	
30	Una tira de 5 mm de anchura de la capa de detección fabricada de este modo se pega por la cara de la lámina con un posicionado exacto sobre la cinta adhesiva por ambas caras, troquelada, que se halla sobre la capa sustrato. Directamente adyacentes a la capa de detección se pegan sobre ambas caras las cintas adhesivas por ambas caras como distanciadores sobre la lámina sustrato, en el caso que nos ocupa, un distanciador tiene una anchura de 6 mm y el segundo distanciador tiene una anchura de 9 mm. A continuación se arranca la lámina protectora de las dos cintas adhesivas por ambas caras.	
35	Sobre esta cinta compuesta se coloca una tira de 20 mm de anchura de un no tejido expandido, por ejemplo el descrito en el documento EP 0 995 994 A2, que se incorpora como referencia a la presente solicitud, y se pega por compresión. A continuación se pegan dos cintas adhesivas por una cara sobre el no tejido expandido, que actúan como cubiertas, de modo que el distanciador quede completamente tapado y se disponga todavía por lo menos un ligero solapamiento con la zona reactiva. El producto en forma de cinta se corta en forma de elementos de ensayo de 6 mm de anchura, de modo que el orificio de medición se halle en el centro del elemento de ensayo.	
40		

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección óptica de un analito de una muestra, que consta de los pasos siguientes:

(a) poner en contacto la muestra con un reactivo de detección, formado por una oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, una coenzima de nicotinamida reducible, un mediador, que es una quinona y un indicador óptico reducible o un sistema de indicador óptico reducible; dicho analito se oxida con una oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida, se reduce la coenzima de nicotinamida y se transfieren los electrones de la coenzima de nicotinamida reducida a través del mediador al indicador óptico o al sistema de indicador óptico y

(b) determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador,

dicha oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida es una alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), una glucosa-deshidro-genasa (EC 1.1.1.47) o una glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), el indicador óptico es un heteropoliácido y el mediador es una 1,10-fenantrolinaquinona, una 1,7-fenantrolinaquinona, una 4,7-fenantrolinaquinona o una sal N-alkilada o N,N'-dialquilada de las mismas.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es un fluido corporal.

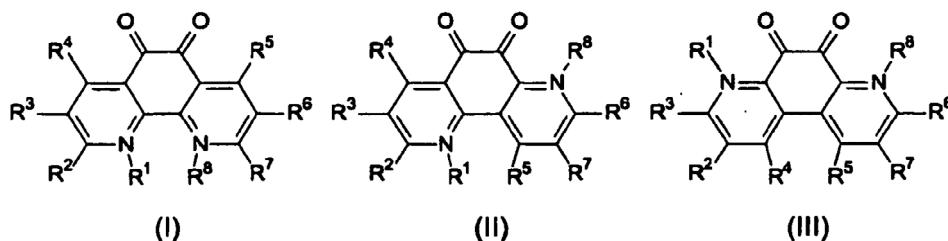
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el fluido corporal es la sangre total, el plasma o el suero.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 3, caracterizado porque el analito es alcohol o glucosa.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 4, caracterizado porque la oxidorreductasa dependiente de la nicotinamida es la glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47).

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 5, caracterizado porque la coenzima de la nicotinamida es la NAD(P)⁺.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 6, caracterizado porque el mediador es una 1,10-fenantrolina-5,6-quinona de la fórmula general (I), una 1,7-fenantrolina-5,6-quinona de la fórmula general (II) o una 4,7-fenantrolina-5,6-quinona de la fórmula general (III),



en las que

de R² a R⁷ con independencia entre sí significan H, halógeno, OH, O(alquilo), OCO(alquilo), S(alquilo), NH₂, NH(alquilo), N(alquilo)₂, [N(alquilo)₃]⁺, CN, NO₂, COOH, SO₃H, o un resto alquilo lineal o ramificado, un resto cicloalquilo, un resto arilo o un resto heteroarilo, que pueden estar eventualmente sustituidos una o varias veces, y

R¹ y R⁸ con independencia entre sí significan un par de electrones libres, H o un resto alquilo lineal o ramificado, que puede estar eventualmente sustituido una o varias veces, o una sal del mismo.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 7, caracterizado porque el mediador es la N-metil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona, N,N'-dimetil-1,10-fenantrolinio-5,6-quinona, N-metil-1,7-fenantrolinio-5,6-quinona, N,N'-dimetil-1,7-fenantrolinio-5,6-quinona, N-metil-4,7-fenantrolinio-5,6-quinona o N,N'-dimetil-4,7-fenantrolinio-5,6-quinona.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 8, caracterizado porque el indicador óptico es el ácido molibdatofosfórico.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 9, caracterizado porque se realiza sobre un sustrato, dicho sustrato consta de:

(a) una zona de aplicación en la que se deposita la muestra,

(b) una zona de reacción para que el analito reaccione con el reactivo de detección,

(c) una zona de detección para determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador y

(d) eventualmente una zona de desechos.

5 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la muestra se deposita directamente en la zona de aplicación.

12. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la muestra se recoge mediante un elemento de transferencia y después, eventualmente con humidificación, se deposita en la zona de aplicación.

10 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 10 a 12, caracterizado porque el sustrato es un elemento de ensayo.

14. Reactivo para la detección óptica de un analito de una muestra, que consta de:

(a) una oxidoreductasa dependiente de la nicotinamida,

(b) una coenzima de la nicotinamida reducible,

(c) un mediador, que es una quinona, y

15 (d) un indicador óptico reducible o un sistema de indicador óptico reducible,

dicha oxidoreductasa dependiente de la nicotinamida es la alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) o glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), el indicador óptico es un heteropoliácido y el mediador es una 1,10-fenantrolinaquinona, una 1,7-fenantrolinaquinona, una 4,7-fenantrolinaquinona, o una sal N-alkilada o una sal N,N'-dialquilada de las mismas.

20 15. Uso de un reactivo de detección según la reivindicación 14 en un elemento de ensayo.

16. Kit, formado por un reactivo de detección según la reivindicación 14 y un elemento de ensayo, para la detección óptica de un analito de una muestra, dicho elemento de ensayo consta de:

(a) una zona de aplicación en la que se deposita la muestra,

(b) una zona de reacción para que el analito reaccione con el reactivo de detección,

25 (c) una zona de detección para determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador y

(d) eventualmente una zona de desechos.

17. Elemento de ensayo para la determinación óptica de un analito de una muestra, que consta de:

(a) una zona de aplicación en la que se deposita la muestra,

30 (b) una zona de reacción que contiene un reactivo de detección, formado por una oxidoreductasa dependiente de la nicotinamida, una coenzima de nicotinamida reducible, que es una quinona, y un indicador óptico reducible o un sistema de indicador óptico reducible, para que el analito reaccione con el reactivo de detección,

(c) una zona de detección para determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra mediante la detección óptica del indicador o del sistema de indicador y

35 (d) eventualmente una zona de desechos,

dicha oxidoreductasa dependiente de la nicotinamida es la alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) o glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), el indicador óptico es un heteropoliácido y el mediador es una 1,10-fenantrolinaquinona, una 1,7-fenantrolinaquinona, una 4,7-fenantrolinaquinona, o una sal N-alkilada o una sal N,N'-dialquilada de las mismas.

Figura 1

