

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 404**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09160421 .5**  
96 Fecha de presentación: **15.05.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2251432**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2010**

54 Título: **Estabilización de enzima en sensores electroquímicos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.11.2012**

73 Titular/es:  
**F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:  
**OCVIRK, GREGOR y**  
**GAESSLER-DIETSCHKE, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 390 404 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

Estabilización de enzima en sensores electroquímicos

5 La presente invención se refiere a una composición para la formación de un electrodo, a un sensor electroquímico que lo comprende, y a un procedimiento para la determinación de un analito utilizando el sensor electroquímico.

10 Los sistemas de medición para análisis bioquímico son componentes importantes de procedimientos analíticos clínicamente relevantes. Esto se refiere principalmente a la medición de analitos que pueden ser determinados directa o indirectamente con ayuda de enzimas. La determinación de la concentración de parámetros clínicamente útiles se lleva a cabo generalmente utilizando sistemas analíticos in vitro. No obstante, cuando se determinan analitos que muestran un cambio significativo de su concentración a lo largo del día, un análisis in vitro no es apropiado debido a la resolución temporal limitada y a las dificultades que se encuentran con el muestreo.

15 En este caso, los biosensores, es decir, sistemas de medición dotados de componentes biológicos, que permiten una medición repetida del analito de manera continua o discontinua, y que se pueden utilizar ex vivo, así como in vivo, se han mostrado especialmente adecuados para la medición de analitos. Los biosensores ex vivo se utilizan de manera típica en celdas de flujo pasante, mientras que los biosensores in vivo pueden ser implantados, por ejemplo, en tejidos grasos subcutáneos. A este respecto, se distingue entre implantes transcutáneos que son introducidos  
20 solamente en los tejidos durante un corto periodo de tiempo y que se encuentran en contacto directo con un dispositivo de medición situado sobre la piel, e implantes completos que son insertados quirúrgicamente en el tejido junto con un dispositivo de medición.

25 Los biosensores electroquímicos que comprenden una enzima como componente biológico contienen la enzima en o sobre el electrodo de trabajo, en cuyo caso, por ejemplo, el analito puede servir como sustrato para la enzima y se puede alterar fisicoquímicamente (por ejemplo, oxidándose) con ayuda de esta enzima. La medición eléctrica, utilizando una señal generada por el flujo de electrones liberado durante la conversión del analito sobre el electrodo de trabajo, se correlaciona con la concentración del analito medido, de manera tal que la señal de medición eléctrica puede ser utilizada para determinar la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

30 En la práctica, un electrodo de trabajo debe cumplir una serie de exigencias para que sea adecuado en sensores electroquímicos:

- 35 - El electrodo de trabajo debe tener una baja resistencia de contacto y, por lo tanto, debe ser altamente conductor.
- El electrodo de trabajo no debe comprender componentes que se conviertan electroquímicamente en el voltaje de polarización seleccionado. Esto se puede conseguir por la elección adecuada de componentes de unión y cargas.
- 40 - El área superficial electroquímicamente activa del electrodo de trabajo se tiene que mantener constante a lo largo de todo el periodo de funcionamiento. Para este objetivo, se tiene que evitar la reducción del área superficial debido a la adsorción de componentes del fluido circundante. Esto es afectado en general al aplicar uno o varios recubrimientos de polímero que son altamente biocompatibles.
- 45 - La reacción electroquímica del producto de conversión de la reacción enzimática se debe llevar a cabo a un sobrepotencial reducido a efectos de minimizar el voltaje de descomposición y, por lo tanto, posibilitar una conversión específica del parámetro. Para este objetivo, se debe disponer una transferencia rápida de electrones desde el grupo protésico de la enzima al electrodo derivado.
- El electrodo de trabajo debe comprender una cantidad suficiente de la enzima específica del analito teniendo actividad suficiente y constante para garantizar que la reacción enzimática superpuesta a la conversión electroquímica no está limitada por la actividad enzimática disponible, sino por la cantidad disponible de analito. En otras palabras, la sensibilidad tiene que ser mantenida a lo largo de todo el periodo de funcionamiento. La difusión de la enzima desde el electrodo de trabajo a los tejidos circundantes se tiene que evitar, también por la razón de una posible toxicidad de la enzima. Finalmente, se tiene que disponer para que la actividad enzimática no se reduzca por debajo de un límite predeterminado durante el almacenamiento.

55 Se conocen una serie de composiciones de electrodos para minimizar los sobrepotenciales. En lo que respecta a  $H_2O_2$ , se puede reducir el potencial de oxidación, por ejemplo, en 450mV utilizando fibras de carbono recubiertas con rodio y glucosa oxidasa, en comparación con fibras de carbono con recubrimiento de glucosa oxidasa sola [Wang y otros, Analytical Chemistry (1992), 64, 456-459]. Un procedimiento que es más simple de  
60 realizar se describe en el documento EP 0 603 154 A2, cuyo documento da a conocer un compuesto electrodo producido por mezcla completa de óxidos y/o hidróxidos de elementos del 4to periodo de la tabla periódica con grafito y un compuesto de unión, conduciendo a una reducción de sobrepotencial de la oxidación anódica de  $H_2O_2$  en  $> 200$  mV.

65 Además de óxidos de metales eléctricamente no conductores y/o semiconductores introducidos de modo general en compuestos de electrodos, se conocen electrocatalizadores eléctricamente conductores, tales como nanotubos de

5 carbono, los cuales, debido a sus pequeñas dimensiones, pueden ser dispuestos en las proximidades del centro protésico de la enzima, tienen una elevada conductividad eléctrica y posibilitan una transferencia eficiente de electrones, [Wang y otros, *Analyst* (2003), 128, 1382-1385; Wang y otros, *Analyst* (2004), 129, 1-2; Wang y otros, *Analytica Chimica Acta* (2005), 539, 209-213; Shobha Jeykumari y otros, *Biosensors and Bioelectronics* (2008), 23, 1404-1411]. Debido a su gran área superficial, pequeñas cantidades de nanotubos son suficientes para obtener una reducción del potencial de descomposición [US 2006/0021881 A1].

10 Se conocen diferentes medidas en esta técnica para conseguir una actividad enzimática constante. Una posibilidad para evitar difusión de la enzima de la superficie en el electrodo de trabajo hacia el entorno consiste en dotar al electrodo de trabajo de un recubrimiento adecuado, por ejemplo, una membrana de recubrimiento. No obstante, la utilización de estos recubrimientos en sensores electroquímicos se asocia a ciertos problemas, tales como la necesidad de depositar membranas libres de microorificios ("pinhole"). En segundo lugar, la membrana de recubrimiento debe ser depositada con un grosor de la capa altamente reproducible para sistemas limitados a transferencia en masa. Esta exigencia representa una extensa restricción de posibles recubrimientos, dado que la realización de capas muy delgadas que muestren una capacidad barrera suficientemente elevada a la transferencia en masa, es difícil de realizar.

20 Además, los sensores electroquímicos que son utilizados para determinar diferentes analitos, deben contener también usualmente diferentes membranas de recubrimiento a efectos de proporcionar diferentes tasas de transferencia en masa del sustrato y co-sustrato al electrodo. Al mismo tiempo, se debe asegurar que las membranas de recubrimiento son altamente biocompatibles para aplicaciones in vivo. Dado que, incluso los menores defectos de la membrana son suficientes para dar el resultado de transferencia de la enzima desde el electrodo al entorno, es necesaria una enorme cantidad de control de calidad, especialmente en el caso de biosensores in vivo, con el resultado de exigencias técnicas considerables y costes de producción incrementados.

25 De manera alternativa, la extensión de la transferencia de enzima se puede reducir inmovilizando la enzima en la matriz del electrodo del electrodo de trabajo, lo que ha conducido a una búsqueda intensa de procedimientos de inmovilización adecuados para enzimas en biosensores electroquímicos. En la práctica, la enzima puede ser, o bien acoplada a uno o varios componentes de pasta de forma químicamente covalente, o se puede insertar físicamente en un compuesto, de manera que la enzima queda unida por adsorción a uno o varios componentes de pasta y/o incorporada en los mismos.

30 En lo que respecta a la inmovilización de adsorción, Rege y otros, [*Nano Letters* (2003), 3, 829-832] dan a conocer un compuesto de electrodo que comprende nanotubos de carbón o de pared única (SWCNT) y/o grafito como cargas conductoras y PMMA como material de unión, de manera que se retiene físicamente la quimi tripsina. En este contexto, se ha descubierto que los compuestos que contienen SWCNT muestran una menor transferencia de enzima que los que contienen grafito, lo que parece ser debido a una mayor energía superficial de los SWCNT en comparación con el grafito.

40 Tang y otros, [*Analytical Biochemistry* (2004), 331, 89-97], han mostrado que utilizando un electrodo CNT, sobre el que se han depositado electroquímicamente partículas de Pt y que ha sido modificado por adsorción con glucosa oxidasa, la estabilidad a largo plazo de la glucosa oxidasa se puede aumentar significativamente en comparación con un electrodo de grafito convencional.

45 Tsai y otros, [*Langmuir* (2005), 21, 3653-3658] dan a conocer un sensor de glucosa estable que comprende un electrodo de carbono recubierto con un compuesto que contiene nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT), Nafion y glucosa oxidasa. El efecto inmovilizante de la matriz se atribuye a la interacción electrostática de MWCNT cargados negativamente y Nafion por una parte y, glucosa oxidasa cargada positivamente, por otra.

50 Guan y otros, [*Biosensors and Bioelectronics* (2005), 21, 508-512] realizan un sensor de glucosa al dispensar una suspensión que contiene MWCNT y una solución que contiene ferrocianuro y GOD- sobre un electrodo de carbono serigrafiado. Se observó una linealidad aumentada de la curva de respuesta y se atribuyó a una velocidad de transferencia de electrones incrementada de los MWCNT en comparación con la de un electrodo de carbono convencional.

55 Kurusu y otros, [*Analytical Letters* (2006), 39, 903-911], finalmente, dieron a conocer que la utilización de un electrodo, comprendiendo una mezcla de MWCNT, GOD y aceite mineral, conduce a una reducción significativa del voltaje de descomposición oxidante de  $H_2O_2$ .

60 No obstante, los procedimientos de inmovilización por adsorción adolecen de una serie de problemas. Una desventaja principal de la inmovilización física es la dependencia de la constante de unión en la composición del medio que rodea el electrodo, requiriendo una membrana barrera para impedir fugas de enzimas.

65 No obstante, en particular, el acoplamiento físico presenta muchas exigencias en cuanto a la reproductibilidad de la superficie efectiva del electrodo de trabajo y, por lo tanto, en la producción del mismo. Tal como se ha descrito en lo anterior, la inmovilización por adsorción requiere, o bien la aplicación de soluciones que contienen enzimas

y/o suspensiones sobre la superficie de un electrodo de trabajo prefabricado, o la introducción de soluciones que contienen enzimas y/o suspensiones en un compuesto de electrodo. La aplicación de dispensación de soluciones que contienen enzimas y/o suspensiones sobre la superficie de un electrodo de trabajo, no obstante, tiene la desventaja de que la adición de volúmenes pequeños de solución de enzima, por ejemplo, un volumen del orden de nanolitros, presenta elevadas exigencias en la precisión de un aparato de dosificación automatizado. Además, la distribución de la enzima sobre la superficie del electrodo de trabajo y la transferencia de la enzima a los poros del electrodo de trabajo depende de la topografía y la energía de la superficie del electrodo, que es difícil de reproducir.

Teniendo en cuenta lo anterior, la adición de enzimas a un compuesto de electrodo debe ser preferida. No obstante, la pérdida de la actividad efectiva de la enzima provocada por cizalladura, la influencia de disolventes y el impacto térmico no pueden ser evitados debido a la exigencia de una distribución homogénea de enzimas en compuestos principalmente hidrofóbicos. Además, las restricciones con respecto a conductividad general de la pasta y adherencia sobre el sustrato, tienen que ser tomadas en cuenta dado que se requieren características reológicas específicas para el depósito de la pasta del electrodo, mientras se tienen que facilitar una consistencia constante de la pasta después de la distribución homogénea de una enzima seca en el compuesto.

Como alternativa, la enzima puede ser introducida en el compuesto en una solución acuosa o en suspensión, a efectos de minimizar la desnaturalización. Esto, no obstante, comporta la necesidad de la eliminación subsiguiente de disolvente o agente de suspensión, de manera que el compuesto no se puede suponer que tenga características reológicas constantes a lo largo del periodo de producción.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las desventajas de la inmovilización por adsorción, existe una necesidad concreta de inmovilizar enzimas en biosensores electroquímicos por enlaces covalentes, como mínimo, a un componente de la matriz del electrodo.

El documento EP 0 247 850 A1 da a conocer biosensores para la detección amperométrica de un analito. Estos sensores contienen electrodos con enzimas inmovilizadas que están inmovilizadas o adsorbidas sobre la superficie de un soporte eléctricamente conductor en el que el soporte consiste en una capa porosa platinizada de partículas de carbono o grafito unidas a resina o contiene dicha capa. Con este objetivo, los electrodos realizados a base de grafito platinizado y un agente de unión polímero son preparados en primer lugar, y estos son llevados a continuación a establecer contacto con la enzima. En este caso, la enzima es inmovilizada por adsorción a la superficie del electrodo o por acoplamiento de la misma al agente de unión polimérico, utilizando reactivos adecuados.

Se describen también en el documento EP 0 603 154 A2 biosensores amperométricos con electrodos que comprenden una enzima inmovilizada o adsorbida sobre o en un material de electrodo poroso eléctricamente conductor. A efectos de producir los electrodos de la enzima, se elabora formando una pasta junto con grafito y un agente de unión polímero, un óxido u óxido hidratado de un metal de transición del 4<sup>ro</sup> periodo tal como, por ejemplo, dióxido de manganeso, que actúa como catalizador, y el material de electrodo poroso obtenido después de secar la pasta es llevado a establecer contacto con la enzima en una segunda etapa. La enzima puede ser inmovilizada sobre el material del electrodo poroso o dentro del mismo utilizando un reactivo de reticulación, tal como glutaraldeído.

Una desventaja principal de los biosensores electroquímicos descritos en los documentos EP 0 247 850 A1 y EP 0 603 154 A2 es que la enzima es inmovilizada en primer lugar sobre el electrodo que ha sido prefabricado sin enzima. Como consecuencia, existe el problema de que la enzima no puede ser acoplada a los componentes del electrodo, de manera controlada. Por lo tanto, cuando se utiliza glutaraldeído como reactivo de reticulación, la enzima no solamente se une de manera incontrolada a cualesquiera componentes reactivos del material del electrodo, sino que también se inter-reticula. Además, este procedimiento contamina el electrodo con los reactivos utilizados y, por lo tanto, el electrodo tiene que ser limpiado de manera completa, especialmente antes de su utilización en un biosensor in vivo, lo que incrementa la complejidad de la producción y, por lo tanto, los costes.

Cho y otros, [Biotechnology and Bioengineering (1977), 19, 769-775] describen la inmovilización de enzimas sobre carbonos activados por acoplamiento covalente. Más particularmente, la inmovilización de glucosa oxidasa a carbonos activados basados en petróleo por (a) adsorción de la enzima seguida de reticulación con glutaraldeído o (b) activación de la superficie del carbono con una diimida y subsiguiente reacción con la enzima. Por este medio, se pudo demostrar una desactivación considerablemente más lenta de la enzima en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con la enzima soluble.

Li y otros, [Analytical and Bioanalytical Chemistry (2005), 383, 918-922] dan a conocer un biosensor de glucosa que comprende un electrodo de carbono vítreo modificado como electrodo de trabajo. El electrodo de carbono vítreo modificado es preparado por recubrimiento de la superficie de un electrodo comercial con una dispersión de nanotubos de carbono de paredes múltiples funcionalizado (MWCNT) que tienen glucosa oxidasa oxidada unida de manera covalente al mismo en una solución tampón de PBS que contiene Nafion® y ácido ferroceno

monocarboxílico. El efecto catalítico de los nanotubos funcionalizados para la oxidación de la glucosa es objeto de especial atención.

5 El documento US 2007/0029195 A1 da a conocer la inmovilización de biomoléculas, tales como proteínas por acoplamiento covalente a una matriz polímera conductora reforzada por nanopartículas para mejorar la estabilidad mecánica, conductividad eléctrica, y para la inmovilización de biomoléculas. La matriz es un nanocompuesto que comprende nanopartículas de oro recubiertas con un polipirrol formado a partir de pirrol y ácido pirrolpropílico en el que, este último compuesto proporciona la unión covalente de las biomoléculas.

10 El documento US 2008/0014471 A1 da a conocer sensores electroquímicos que comprenden electrodos que utilizan grupos ("clusters") de nanotubos de carbono (CNT). De modo detallado, la inmovilización comporta la funcionalización de la superficie de los nanotubos, fijación covalente subsiguiente de una enzima, tal como glucosa oxidasa por medio de un reactivo de unión para conseguir un conjugado CNT-enzima, precipitación de enzimas libres con un agente de precipitación, y tratamiento final con un reactivo de reticulación para formar grupos de enzimas reticuladas unidas de manera covalente a los CNT con intermedio del conjugado CNT-enzima.

15 El documento US 2008/044911 A1 da a conocer un sensor de glucosa que comprende nanocables que tienen glucosa oxidasa unida de manera covalente a su superficie, cuyos nanocables funcionalizados son preparados mediante contacto de nanocables convencionales con un agente de reticulación, por ejemplo, un silano, y la enzima. La conversión de glucosa en una muestra a examinar por la glucosa oxidasa inmovilizada sobre la superficie de los nanocables tiene como resultado una carga en pH de la solución de prueba, de manera que este cambio de pH produce una señal en los nanocables, que se puede detectar por medios adecuados.

20 Es conocido en esta técnica, que el acoplamiento covalente de una enzima a un soporte (por ejemplo, MANAE-agarosa, glioxil agarosa activada, y glutaraldeído agarosa) conduce a la estabilización de la enzima, contra la descomposición térmica [Betancor y otros, Journal of Biotechnology (2006), 121, 284-289]. No obstante, además de la descomposición térmica, los biosensores que utilizan estas enzimas inmovilizadas presentan también el problema de la descomposición de la enzima provocada por disolventes orgánicos durante el almacenamiento del biosensor o provocada por agentes oxidantes, tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el periodo de funcionamiento.

25 En la práctica, los biosensores deben cumplir una serie de exigencias para permitir las mediciones exactas para medidas terapéuticas inmediatas o retrasadas en el tiempo. En particular, es de mayor importancia que el analito de interés pueda ser determinado, tanto con una especificidad y sensibilidad elevadas a efectos de posibilitar la determinación de cantidades bajas del parámetro clínicamente relevante.

30 Como consecuencia, la pérdida significativa de actividad enzimática observada en general en biosensores de tipo comercial, cuando se almacenan los mismos durante más de un mes, no es aceptable para objetivos diagnósticos y/o clínicos.

35 Por lo tanto, el objetivo de la invención ha sido el de dar a conocer una composición para formar un electrodo, en la que se eliminan, por lo menos parcialmente, las desventajas de la técnica anterior. En particular, la composición debe asegurar una inmovilización específica y duradera de la enzima, impedir, o por lo menos, reducir la pérdida de actividad enzimática cuando tiene lugar la producción de los compuestos del electrodo, almacenamiento durante un periodo de tiempo superior a un mes, así como función de biosensor y garantizando una elevada sensibilidad durante el periodo de funcionamiento.

40 Este objetivo se ha conseguido de acuerdo con la invención por medio de una composición para formar un electrodo, comprendiendo la composición un componente eléctricamente conductor que tiene una enzima específica del analito, fijada de manera covalente a la misma, de manera que la composición comprende, además, como mínimo, un componente eléctricamente no conductor o semiconductor que estabiliza la enzima específica del analito por conversión de sustancias químicas que provocan la descomposición de la enzima, de manera que dicho componente eléctricamente no conductor o semiconductor de estabilización de la enzima es seleccionado entre el grupo que consiste en un óxido de Mn, en particular MnO<sub>2</sub>, Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> o Mn<sub>5</sub>O<sub>8</sub>, CuO y ZnO.

45 De acuerdo con la invención, la composición comprende de manera forzosa un componente eléctricamente conductor que tenga una enzima específica del analito fijada de forma covalente a la misma. El término "componente eléctricamente conductor", tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere a cualquier material que contenga cargas eléctricas desplazables libremente y que tienen una resistividad de  $\rho < 10^4 \Omega \text{ cm}$ , permitiendo de esta manera el transporte de corriente eléctrica. El material eléctricamente conductor puede ser un conductor electrónico (conductor de primer orden) o un conductor iónico (conductor de segundo orden), siendo preferible un conductor electrónico.

50 Preferentemente, el componente eléctricamente conductor es un catalizador de la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto significa que el componente eléctricamente conductor no solamente transporta corriente eléctrica, sino que además es capaz de catalizar la descomposición de peróxido de hidrógeno que se encuentra presente o se ha formado en una muestra que establece contacto con el componente eléctricamente conductor. Dado que el peróxido de

hidrógeno provoca, en general, daños a la mayor parte de las enzimas utilizadas en la detección de analitos clínicamente relevantes, y además puede actuar como inhibidor del analito o de co-sustratos, tales como oxígeno, la descomposición del peróxido de hidrógeno en elementos de prueba bioquímicos es de crucial importancia. Con este objetivo, el componente eléctricamente conductor puede catalizar, por ejemplo, la conversión química de peróxido de hidrógeno en una sustancia químicamente menos activa o inerte, incluyendo la oxidación de peróxido de hidrógeno en agua.

En otra realización preferente de la presente invención, el componente eléctricamente conductor es seleccionado entre el grupo que consiste en carbono activado, negro de carbón, grafito, nanotubos carbonosos, paladio, platino, e hidróxidos de óxido de hierro tal como, por ejemplo, FeO(OH), siendo el grafito y los nanotubos carbonosos especialmente preferentes.

El término "nanotubos carbonosos" utilizado en esta descripción, se refiere a todos los tipos de nanotubos, es decir, tubos que tienen un diámetro interno promedio de  $<1\mu\text{m}$ , comprendiendo carbono como uno de sus componentes. En particular, los nanotubos carbonosos, en el sentido de la presente invención comprenden nanotubos de carbono (CNT) que pueden adoptar la forma, por ejemplo, de nanotubos de carbono de pared única (SWCNT), nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT), nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT). Dado que los nanotubos proporcionan de modo general una elevada superficie activa, se pueden modificar de manera extensa con sustancias adecuadas para que queden inmovilizadas en su superficie tal como, por ejemplo, enzimas utilizadas en la detección de un analito.

En otra realización, el compuesto según la invención puede comprender, como mínimo, un componente eléctricamente conductor adicional, además del componente eléctricamente conductor que tiene la enzima específica del analito unida de manera covalente al mismo. El componente adicional eléctricamente conductor, puede ser cualquier material capaz de transportar corriente eléctrica, y se selecciona preferentemente del grupo que consiste en carbón activado, negro de carbón, grafito, nanotubos carbonosos, paladio, platino e hidróxidos de óxido de hierro. En principio, este componente puede formar también, un conjugado con la enzima específica del analito por medio de enlaces covalentes, pero preferentemente no está fijado de forma covalente a la enzima específica del analito.

De acuerdo con la invención, el componente eléctricamente conductor tiene una enzima específica del analito unida de forma covalente al mismo. La enzima puede ser cualquier enzima específica para el analito a detectar, y que parezca adecuada a un técnico en la materia para conseguir el efecto deseado. La enzima inmovilizada sobre el componente eléctricamente conductor es preferentemente una oxidasa y, en particular, alcohol oxidasa (1.1.3.13), arilalcohol oxidasa (EC 1.1.3.7), catecol oxidasa (EC 1.1.3.14), colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6), colino oxidasa (1.1.3.17), galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9), glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), glicerol-3-fosfato oxidasa (EC 1.1.3.21), hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5), malato oxidasa (EC 1.1.3.3), piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10), piridoxina-4- oxidasa (EC 1.1.3.12) o tiamina oxidasa (EC 1.1.3.23). De manera más preferente, la enzima es glucosa oxidasa.

Preferentemente, la enzima específica del analito está unida selectivamente de forma covalente al componente eléctricamente conductor. La unión covalente de la enzima al componente eléctricamente conductor asegura la constancia de la función de un electrodo que comprende la composición de la invención a causa de que un desprendimiento de enzima puede ser excluido en las condiciones típicas de medición (concentración del electrolito fisiológico, pH fisiológico, temperatura del cuerpo. Por lo tanto, los sensores electroquímicos tales como electrodos, siguen operativos a lo largo de un prolongado periodo de tiempo, y virtualmente funcionan de manera libre de desviación.

Para unir de forma covalente la enzima específica del analito al componente eléctricamente conductor, la presente invención prevé en una realización preferente, que el componente eléctricamente conductor tenga una superficie que comprende grupos funcionales a los que está unida la enzima. La superficie puede mostrar, por ejemplo, funcionalidades hidroxilo, carboxilo, o amino. Alternativamente, la superficie puede ser funcionalizada por recubrimiento del componente eléctricamente conductor con un reactivo adecuado para formar grupos funcionales por medio de los cuales la enzima puede ser unida de forma covalente a la superficie del componente eléctricamente conductor.

Los reactivos de recubrimiento que son utilizados dentro del ámbito de la presente invención, son sustancias que, por una parte, presentan una unión covalente con el componente eléctricamente conductor y, por otra parte, contienen como mínimo un grupo funcional que sirve para unir de forma covalente la enzima. Esto significa que los reactivos de recubrimiento son, como mínimo, bifuncionales, es decir, comprenden como mínimo dos grupos funcionales que pueden ser iguales o distintos.

En una realización preferente, la enzima está unida directamente de forma covalente a la superficie del componente eléctricamente conductor, lo que significa que, como mínimo, se forma un enlace covalente entre un grupo funcional de la enzima y un grupo funcional sobre la superficie del componente eléctricamente conductor. La enzima puede ser acoplada a la superficie de cualquier manera, y puede comprender una activación previa de grupos funcionales sobre la superficie del componente eléctricamente conductor y/o de la enzima.

Los grupos funcionales pueden ser, por ejemplo, activados por reacción del componente eléctricamente conductor funcionalizado y/o la enzima con un reactivo de activación adecuado. Los reactivos de activación preferentes comprenden carbodiimidas, tal como, por ejemplo, dicitlohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida o 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDC), así como combinaciones de carbodiimidas y succinimidas. Un reactivo de activación especialmente apropiado para los objetivos de la presente invención comprende una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

Otros procedimientos adecuados para una unión covalente, en particular, unión selectivamente covalente de la enzima específica del analito al componente eléctricamente conductor, son conocidos por los técnicos en la materia y se describen, por ejemplo, en H. Weetall, *Methods of Enzymology* (1976), 33, 134-148.

De acuerdo con la invención, la composición comprende además un componente estabilizante de la enzima, no conductor eléctricamente o semiconductor. El término "componente no conductor eléctricamente" se utiliza en la presente solicitud haciendo referencia a cualquier material que tiene una resistividad de  $\rho > 10^9 \Omega \text{cm}$  y que es incapaz de transportar corriente eléctrica. Como contraste, el término "componente eléctricamente semiconductor", tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a cualquier material que tiene una resistividad de  $10^{-4} \leq \rho \leq 10^9 \Omega \text{cm}$ . El término "estabilización de la enzima" significa que el componente no conductor o semiconductor estabiliza la enzima específica del analito al convertir las sustancias químicas que provocan la descomposición de la enzima.

El componente eléctricamente no conductor o semiconductor estabilizador de la enzima es un catalizador de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que significa que un componente estabilizador de la enzima no conductor eléctricamente o semiconductor descompone el peróxido de hidrógeno, por ejemplo, por conversión química, a efectos de impedir daños en la enzima específica del analito utilizada en la composición, de acuerdo con la presente invención.

El componentes estabilizante de la enzima no conductor eléctricamente o semiconductor, es seleccionado entre el grupo que consiste en un óxido de Mn, CuO y ZnO, entre los que los preferentes  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{Mn}_3\text{O}_4$ , o  $\text{Mn}_5\text{O}_8$ .

En otra realización preferente, la composición según la invención comprende además la enzima específica del analito fijada de modo covalente al componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor. Esto significa que la enzima específica del analito utilizada en la composición de la invención puede no solamente estar fijada de modo covalente al componente eléctricamente conductor, sino que además puede estar fijado de forma covalente al componente estabilizante de la enzima no conductor eléctricamente o semiconductor por medio de enlaces covalentes formados entre la enzima y, por ejemplo, grupos funcionales en la superficie del componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor.

El componente estabilizante de la enzima conductor eléctricamente y/o no conductor eléctricamente o semiconductor puede ser dispuesto, de acuerdo con la invención, en forma de partículas, de manera que la dimensión de las partículas se puede variar dependiendo de las respectivas exigencias. En una realización preferente, la composición, según la presente invención, comprende el componente estabilizante de la enzima eléctricamente conductor y/o eléctricamente no conductor o semiconductor en forma de nanopartículas, es decir, partículas que tienen un diámetro promedio de  $< 1 \mu\text{m}$ . Dentro del alcance la presente invención, el 90% de las nanopartículas tienen usualmente un diámetro de 10 nm a 100 nm, siendo las que tienen un diámetro de 15 nm a 30 nm especialmente preferentes.

La capacidad de controlar la superficie efectiva del componente eléctricamente conductor y/o el componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor por medio del tamaño de las partículas es de crucial importancia, por ejemplo, con respecto a una funcionalización con sustancias químicas. Más particularmente, una mayor superficie efectiva puede aumentar la carga con la enzima y, por lo tanto, puede resultar en una mayor actividad de la enzima indicada en unidades por miligramo de componente cargado de la enzima. El componente eléctricamente conductor utilizado para los objetivos de la presente invención tiene usualmente una actividad de la enzima de unos 10 mU/mg a unos 5 U/mg, habiéndose demostrado particularmente ventajosos los que tienen una actividad de la enzima aproximadamente de 100 U/mg. El término "unidad" utilizado dentro del ámbito de la presente solicitud, representa la cantidad de la enzima requerida para convertir  $1 \mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en condiciones normales.

Además del componente eléctricamente conductor y del componente estabilizador de la enzima no eléctricamente conductor o semiconductor, la composición, según la invención, puede comprender otros componentes utilizados convencionalmente para formar un electrodo, tales como elementos de unión, cargas y similares. En lo que respecta a los elementos de unión, la composición comprende preferentemente, como mínimo, un elemento de unión seleccionado del grupo que comprende que consiste en hidrocarburos florados, tales como Teflón<sup>®</sup>, policarbonatos, poliisopreno, poliuretanos, resinas acrílicas, resinas de polivinilo y siliconas con poliuretanos, resinas acrílicas y resinas de polivinilo como más preferentes.

Para formar un electrodo, el componente eléctricamente conductor que tiene una enzima específica del analito fijada de forma covalente al mismo, el componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor y todos los demás componentes requeridos para formar una matriz de electrodo, son mezclados por completo y secados a continuación, de manera que el componente eléctricamente conductor y/o el componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor son dispersados preferentemente de forma homogénea en la composición.

Dependiendo de las exigencias específicas del electrodo a formar, los técnicos en la materia son capaces de determinar las cantidades de los diferentes componentes requeridos para proporcionar una composición, de acuerdo con la invención, sin dificultad alguna. En lo que respecta al componente eléctricamente conductor, no obstante, se ha demostrado ventajoso que la composición contenga el conjugado formado por el componente eléctricamente conductor y la enzima específica del analito en una cantidad de 0,5 a 10% en peso, basado en el peso en seco de la composición. Por otra parte, la composición contiene, preferentemente, el componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor en una cantidad de 5 a 50% en peso, basado en el peso seco de la composición.

La composición que se describe reduce significativamente la pérdida de actividad de la enzima específica del analito requerida para detectar un analito de interés por medio de un biosensor, tal como, por ejemplo, un sensor electroquímico que comprende un electrodo utilizando la composición, de acuerdo con la invención. En particular, en la composición, según la invención, la enzima tiene una actividad residual mínima de 90% después de almacenar la composición durante un mínimo de 4 semanas, preferentemente un mínimo de 12 semanas, y más preferentemente un mínimo de 28 semanas a una temperatura de 4°C, basándose en la actividad total de la enzima antes del almacenamiento, es decir, basándose en la actividad total de la enzima en la composición directamente después de su preparación.

Según otro aspecto, la presente invención se relaciona a un sensor electroquímico para determinar un analito, comprendiendo el sensor, como mínimo, un electrodo de trabajo y, como mínimo, un electrodo de referente, de manera que el electrodo de trabajo comprende la composición, según la invención.

Si bien el electrodo de trabajo del sensor electroquímico, según la invención, sirve para convertir el analito a determinar, el electrodo de referencia permite ajustar el potencial de polarización del electrodo de trabajo y puede consistir en cualquier material adecuado para los objetivos de la invención. Un electrodo de ión metal/metal, en particular un electrodo de plata/cloruro de plata, es utilizado preferentemente como electrodo de referencia. Además del, como mínimo, un electrodo de trabajo y el, como mínimo, un electrodo de referencia, el sensor electroquímico puede comprender también, como mínimo, un electrodo contador que adopta preferentemente la forma de un electrodo de un metal noble, en particular un electrodo de oro o un electrodo de grafito.

De acuerdo con la invención, el sensor electroquímico comprende, preferentemente, un recubrimiento biocompatible que recubre el, como mínimo, un electrodo de trabajo, el como mínimo un electrodo de referencia y, opcionalmente, el o los contraelectrodos. El recubrimiento biocompatible permite que el analito penetre dentro de la matriz del electrodo pero debería impedir que los componentes del electrodo escapen al medio circundante que contiene el analito de interés.

Teniendo en cuenta el hecho de que debido a la unión covalente de la enzima al componente eléctricamente conductor, la enzima no escapa del electrodo de trabajo o del sensor electroquímico, un recubrimiento biocompatible no es absolutamente necesario para muchas aplicaciones. De este modo, el sensor electroquímico, según la invención, puede ser utilizado también en aplicaciones *in vivo* cuando el recubrimiento biocompatible no es una barrera para las enzimas. En este caso, se puede seleccionar un recubrimiento biocompatible que proporciona una interacción óptima con el tejido y/o sangre o suero circundantes.

Se pueden generar de varias maneras, recubrimientos biocompatibles. Un procedimiento preferente consiste en utilizar membranas prefabricadas que son aplicadas al sensor electroquímico. La membrana puede ser inmovilizada sobre el sensor por varias técnicas, considerándose preferentes el encolado o la soldadura por láser, siendo el encolado o la soldadura por láser las que se consideran preferentes. De manera alternativa, el recubrimiento biocompatible puede ser generado *in situ* por aplicación de una solución de un polímero adecuado sobre el sensor electroquímico y secándolo a continuación. La aplicación del polímero sobre el biosensor se lleva a cabo preferentemente por pulverización, recubrimiento por inmersión o dispersión de una solución diluida del polímero en un disolvente orgánico con bajo punto de ebullición, pero no está limitado a estos procedimientos.

Los polímeros que son adecuados para estas finalidades comprenden, en particular, polímeros que tienen una estructura zwitteriónica y falsas superficies celulares tales como, por ejemplo, 2-metacriloliloxietil-fosforilclolina-co-n-butil-metacrilato (MPC-co-BMA). Los recubrimientos biocompatibles que se obtienen, usualmente tienen un espesor aproximado de 1  $\mu\text{m}$  a unos 100  $\mu\text{m}$ , preferentemente de unos 3  $\mu\text{m}$  hasta unos 25  $\mu\text{m}$ .

El sensor electroquímico, según la invención, está diseñado preferentemente para mediciones múltiples, es decir, el sensor posibilita una medición repetida del analito a determinar. Esto es particularmente deseable en

aplicaciones en las que una constante, es decir, un control continuo o discontinuo de la presencia y/o la cantidad de un analito debe tener lugar a lo largo de un tiempo más prolongado, por ejemplo, de un día o más, en particular una semana o más. En una realización particularmente preferente, el sensor electroquímico, según la invención es, por lo tanto, completa o parcialmente implantable y puede ser implantado, por ejemplo, en tejidos grasos o en vasos sanguíneos. De manera alternativa, la invención permite que el sensor electroquímico sea diseñado como celda de flujo pasante a través de la cual se hace pasar una muestra de fluido que contiene el analito.

El sensor electroquímico que se describe puede ser utilizado para determinar un analito en un medio fluido que se puede originar de cualquier fuente de procedencia. En una realización preferente, el sensor electroquímico es utilizado para determinar un analito en un fluido corporal que comprende, sin que ello sea limitativo, sangre entera, plasma, suero, fluido linfático, fluido de bilis, fluido cerebroespinal, fluido de tejidos extracelulares, orina, y también secreciones glandulares, tales como saliva o sudor, siendo considerados, particularmente preferentes la sangre completa, plasma, suero, y fluido de tejidos extracelulares. La cantidad de muestra requerida para llevar a cabo el análisis es habitualmente de 0,01  $\mu\text{l}$  a unos 100  $\mu\text{l}$ , preferentemente de unos 0,1  $\mu\text{l}$  a unos 2  $\mu\text{l}$ .

El analito a determinar cualitativamente y/o cuantitativamente puede ser cualquier sustancia biológica o química que pueda ser detectada por medio de una reacción redox. El analito es seleccionado preferentemente del grupo que consiste en ácido málico, alcohol, amoniaco, ácido ascórbico, colesterol, cisteína, glucosa, glutatión, glicerol, urea, 3-hidroxibutirato, ácido láctico, 5'-nucleotidasa, péptidos, piruvato, salicilato y triglicéridos. En una realización especialmente preferente, el analito a determinar por medio del sensor electroquímico, según la invención, es glucosa.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar un analito que comprende las siguientes etapas:

- (a) establecer contacto de una muestra que contiene el analito con un sensor electroquímico, según la invención, y
- (b) determinar la presencia y/o cantidad del analito.

A efectos de determinar el analito, el sensor electroquímico puede ser diseñado de cualquier manera que permita el contacto entre el sensor electroquímico y la muestra que contiene el analito. De este modo, el sensor puede ser diseñado como celda de flujo pasante a través de la que fluye el medio que contiene el analito. Por otra parte, el sensor puede ser diseñado también como sensor de difusión, en el que el contacto entre el sensor y el medio tiene lugar por difusión. Igualmente, el sensor electroquímico puede ser diseñado como dispositivo destinado a ser completa o parcialmente implantado en el cuerpo de un paciente, en cuyo caso es implantado en un vaso sanguíneo o en tejidos, y en particular en tejidos grasos subcutáneos.

Una señal medible es generada por el sensor dependiendo de la presencia y/o cantidad del analito. Estas señales, preferentemente una señal eléctrica tal como, por ejemplo, una corriente eléctrica, voltaje, resistencia, etc., que es evaluada o leída utilizando medios adecuados. El sensor electroquímico es preferentemente un sensor amperométrico.

Se desea explicar adicionalmente la invención mediante las siguientes figuras y ejemplos.

#### Descripción de las figuras

Figura 1: Señal de medición [nA] de un sensor electroquímico, según la invención, representado con respecto a tiempo [s] dependiendo de la concentración de glucosa [0, 2, 4, 6, 8, 12, 17, 23, 26, 20, 15, 10, 7, 5, 3, 0,8 mM], utilizando el sensor un electrodo de trabajo, que comprende un conjugado formado a partir de nanotubos de carbono y glucosa oxidasa, (CNT-GOD; 1,75% en peso) y  $\text{MnO}_2$  (20% en peso) como catalizador semiconductor de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Voltaje de polarización 350 mV.

Figura 2: Señal de medición [nA/mM] en un sensor electroquímico, según la presente invención, almacenado durante un periodo de 28 semanas a una temperatura de 4°C, utilizando el sensor un electrodo de trabajo que comprende un conjugado formado a partir de nanotubos de carbono y glucosa oxidasa (CNT-GOD; 2,4% en peso) y  $\text{MnO}_2$  (19,5% en peso) como catalizador semiconductor de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Figura 3: Actividad enzimática [mU/mg de conjugado liofilizado] de un conjugado formado a partir de nanotubos de carbono y glucosa oxidasa (CNT-GOD) en tampón MES (pH 7,4), en tampón MES en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (solución al 5%), y en tampón MES en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (solución al 5%) y 500 U/ml de catalasa.

Figura 4: Velocidad de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [mM/mg/h] provocada por diferentes materiales eléctricamente conductores y materiales eléctricamente no conductores o semiconductores. 4A:

Velocidad de descomposición de  $H_2O_2$  [mM/mg/h] provocada por diferentes carbonos disponibles comercialmente. 4B: Velocidad de descomposición de  $H_2O_2$  [mM/mg/h] provocada por diferentes óxidos metálicos disponibles comercialmente. 4C: Velocidad de descomposición de  $H_2O_2$  [mM/mg/h] provocada por dos óxidos de manganeso distintos.

5  
10  
15  
Figura 5: Señal de medición [nA] de diferentes sensores electroquímicos representados con respecto a concentraciones crecientes de glucosa [mg/dl]. Voltaje de polarización 350 mV. 5A: Señal de medición [nA] de 8 sensores electroquímicos utilizando un electrodo de trabajo que comprende un conjugado formado a partir de nanotubos de carbono y glucosa oxidasa (CNT-GOD; 2% en peso). 5B: Señal de medición [nA] de 8 sensores electroquímicos, según la presente invención, utilizando los sensores un electrodo de trabajo que comprenden un conjugado formado a partir de nanotubos de carbono y glucosa oxidasa, (CNT-GOD; 2% en peso) y  $MnO_2$  (20% en peso) como catalizador semiconductor de descomposición de  $H_2O_2$ .

Figura 6: Representación esquemática de un sensor electroquímico, según la presente invención.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un conjugado formado a partir de nanotubos de carbono y glucosa oxidasa (CNT-GOD)

20  
25  
30  
Para preparar un componente eléctricamente conductor que tiene una enzima fijada de forma covalente al mismo, se añadieron 2,5 g de nanotubos de carbono (CNT, Nanolab) a una solución de 480 mg de glucosa oxidasa (GOD, Roche), 9,6 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC, Sigma), y 7,2 g de N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma) en 480 ml de agua Millipore. Después de incubar la mezcla durante 6 horas a temperatura ambiente en un agitador de laboratorio, la mezcla se hizo pasar a través de un filtro de membrana, separando de esta manera el conjugado de la solución de reacción. El conjugado fue lavado con tampón PBS (3 x 120 ml), agua Millipore (1 x 120 ml), y se secó durante una noche en vacío, proporcionando 3,0 g de conjugado CNT-GOD.

Ejemplo 2: Determinación de la actividad enzimática del conjugado CNT-GOD

30  
35  
40  
Para determinar la actividad enzimática del conjugado de CNT-GOD preparado en el ejemplo 1, se suspendieron 5 mg del conjugado liofilizado en 1 ml de tampón MES y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. En paralelo, una solución Toyobo (GLO-201; 30 ml de tampón MES (79 mM); 6 ml de solución de glucosa (131 mM); 0,3 ml de solución de 4 aminoantipirina (0,2 mM); 0,3 ml de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (0,3 mM); 0,3 ml de solución de peroxidasa (aproximadamente 4 U/ml)) fue transferida por pipeteado a una cuveta y atemperada durante 10 minutos a 37°C. Después de añadir el conjugado a la solución atemperada Toyobo, se midió la absorción de la mezcla obtenida de este modo utilizando una longitud de onda de 555 nm. Por estos medios, se determinó que la actividad enzimática era el conjugado 870 mU/mg.

Ejemplo 3: Estabilidad de un sensor electroquímico utilizando un electrodo de trabajo que comprendía un conjugado CNT-GOD y un catalizador de descomposición de  $H_2O_2$

45  
50  
Para determinar la estabilidad de un sensor electroquímico, según la presente invención, se preparó un electrodo de trabajo comprendiendo una matriz de electrodo consistente en 78,25% en peso de una pasta de electrodo (Acheson), 1,75% en peso del conjugado CNT-GOD del ejemplo 1 y 20% en peso de  $MnO_2$  (Merck).

A continuación, el sensor electroquímico se puso en contacto con una solución que contenía glucosa en concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 17, 23, 26, 20, 15, 10, 7, 5, 3 y 0,8 mM, variando periódicamente a lo largo de un periodo de 5 días. Tal como se puede deducir de la figura 1, el sensor electroquímico no mostró pérdidas de sensibilidad a lo largo de todo el periodo, lo que resultó en la prevención de la fuga de la enzima provocada por unión covalente a los nanotubos de carbono, como descomposición de  $H_2O_2$  catalizada por  $MnO_2$ .

Ejemplo 4: Estabilidad a largo plazo de un sensor electroquímico utilizando un electrodo de trabajo que comprendía un conjugado CNT-GOD y un catalizador de descomposición de  $H_2O_2$

55  
60  
A efectos de determinar la estabilidad a largo plazo de un sensor electroquímico, según la presente invención, se preparó un electrodo de trabajo que comprendía una matriz de electrodo consistente en 78% en peso de una pasta de electrodo (Acheson), 2,4% en peso del conjugado CNT-GOD del ejemplo 1 y 29,5% en peso de  $MnO_2$  (Merck).

A continuación, el sensor electroquímico fue almacenado durante un periodo de 28 semanas a una temperatura de 4°C. Tal como es evidente de la figura 2, la señal de medición del sensor electroquímico permanece sin cambios entre la semana 4 y la semana 28, después de su preparación. La pérdida de sensibilidad entre la semana 0 y la semana 4 es atribuida a efectos de acondicionamiento de la matriz del electrodo.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad enzimática de una composición que comprende un conjugado CNT-GOD y un catalizador de descomposición de  $H_2O_2$

A efectos de determinar la actividad enzimática de una composición, según la presente invención, se suspendieron 10 mg de un conjugado liofilizado CNT-GOD en 1 ml de tampón MES (pH 7,4), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se utilizó un ensayo comercial de  $H_2O_2$  (Toyobo) para medir la actividad enzimática residual del conjugado CNT-GOD que se determinó que era aproximadamente 600 mU/mg de conjugado liofilizado (ver figura 2). En paralelo, se determinaron tanto la actividad enzimática residual del conjugado CNT-GOD en tampón MES en presencia de  $H_2O_2$  (solución a 5%) y la actividad enzimática residual de CNT-GOD en tampón MES en presencia de  $H_2O_2$  (solución al 5%) y 500 U/ml.

Tal como se puede apreciar en la figura 3, la actividad enzimática residual del conjugado CNT-GOD disminuyó a menos de 100 mU/mg del conjugado liofilizado cuando se encontraba presente  $H_2O_2$  en la muestra (CNT-GOD +  $H_2O_2$ ). Por otra parte, la adición de solución de  $H_2O_2$  y de la catalasa resultante de la descomposición por catalizador de  $H_2O_2$  resultó en una actividad enzimática residual de 650 mU/mg del conjugado liofilizado (CNT-GOD +  $H_2O_2$  + catalasa), indicando una reducción completa de desnaturalización de GOD por  $H_2O_2$ .

#### Ejemplo 6: Determinación de catalizadores de descomposición de $H_2O_2$

A efectos de determinar compuestos que actúan como catalizadores de descomposición de  $H_2O_2$  se han evaluado una serie de carbones y óxidos metálicos con respecto a su capacidad para capacidad de manera efectiva la descomposición de  $H_2O_2$ .

De manera detallada, se comprobaron cómo materiales de carbono eléctricamente conductores, Negro de Carbón de Acetileno (Strem Chemicals), Spheron 6400 (Cabot Corporation), Mogul E (Cabot Corporation), Negro de Carbón de Acetileno (Alfa Aesar), Mogul L (Cabot Corporation), Nanofibers (Electrovac), Vulcan Black XC-605 (Cabot Corporation), Black Pearls 2000 (Cabot Corporation; molido durante 60 min), Black Pearls 2000 (Cabot Corporation; molido durante 120 min) y nanotubos (Nanolab). En este contexto, se observaron como especialmente adecuados los nanotubos de carbono (Nanolab) y las Black Pearls 2000 (Cabot Corporation; molidas durante 120 min), proporcionando una tasa de descomposición de  $H_2O_2$  de 0,00126 y 0,00098 mM/mg catalizador/h, respectivamente (ver Figura 4A).

En lo que respecta a los óxidos metálicos, resulta claro de las figuras 4B y 4C que los diferentes compuestos utilizados en la prueba proporcionan tasas de descomposición muy diferentes. Mientras el efecto catalítico de  $Al_2O_3$  disponible comercialmente (Sigma-Aldrich, Product No. 229423),  $Al_2O_3$  (Aldrich, Product No. 551643) y  $FeO(OH)$  (Fluka, Product No. 71063) fue más bien pobre, el  $Ag_2O$  (Riedel-de Haën, Product No. 10228), y  $Mn_3O_4$  (Strem Chemicals, Product No. 93-2513) se demostraron muy efectivos como catalizadores de descomposición de  $H_2O_2$  (ver figura 4B).

Otro compuesto que catalizaba muy efectivamente la descomposición de  $H_2O_2$  es  $Mn_5O_8$  que fue obtenido por calentamiento del  $Mn_3O_4$  disponible comercialmente (Strem Chemicals, Product No. 93-2513) en 6 horas desde 25°C a 430°C, manteniendo esta temperatura durante 12 horas, y enfriando a continuación a 25°C. Tal como se puede deducir de la figura 4C, la tasa de descomposición de  $H_2O_2$  observada en presencia de  $Mn_5O_8$  obtenida por el procedimiento anterior, fue significativamente mejor que el efecto de catalizador del  $Mn_3O_4$ .

#### Ejemplo 7: Reducción del sobrepotencial en un sensor electroquímico utilizando un electrodo de trabajo que comprendía un conjugado de CNT-GOD y un catalizador de descomposición de $H_2O_2$

A efectos de determinar el efecto de un componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor sobre el sobrevoltaje observado en el electrodo de trabajo de los sensores electroquímicos, se prepararon ocho sensores electroquímicos utilizando un electrodo de trabajo que comprendía un 2% en peso del conjugado CNT-GOD del ejemplo 1 y ocho sensores electroquímicos que utilizaban un electrodo de trabajo comprendiendo 2% en peso del conjugado de CNT-GOD del ejemplo 1, y 20% en peso de  $MnO_2$  (Merck).

Tal resulta evidente de la figura 5A, la utilización de electrodos de trabajo que comprenden el conjugado CNT-GOD solo resultó en una baja sensibilidad de solución de glucosa  $0,01 \pm 0,03$  nA/mM cuando se aplicó un voltaje de polarización de 350 mV (relativo a un electrodo de referencia Ag/AgCl) y midiendo la corriente eléctrica de modo dependiente de la concentración de glucosa.

Como contraste, la utilización de electrodos de trabajo que comprendían el conjugado CNT-GOD en combinación con  $MnO_2$  resultó en una sensibilidad notablemente incrementada de la solución de glucosa  $0,54 \pm 0,11$  nA/mM bajo las mismas condiciones de reacción, indicando una reducción significativa de sobrevoltaje en el electrodo de trabajo (ver figura 5B).

REIVINDICACIONES

1. Composición para la formación de un electrodo, cuya composición comprende un componente eléctricamente conductor que tiene una enzima específica del analito unida de forma covalente al mismo,  
 5 caracterizada porque la composición comprende, además, como mínimo, un componente eléctricamente no conductor o semiconductor, que estabiliza la enzima específica del analito al convertir sustancias químicas que provocan la descomposición de la enzima, de manera que dicho componente estabilizador de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor es seleccionado entre el grupo que consiste en un óxido de Mn, en particular,  $MnO_2$ ,  $Mn_3O_4$  o  $Mn_5O_8$ , CuO y ZnO.  
 10
2. Composición, según la reivindicación 1, caracterizado porque el componente eléctricamente conductor es un catalizador de descomposición de  $H_2O_2$ .  
 15
3. Composición, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque el componente eléctricamente conductor es seleccionado del grupo que consiste en carbón activado, negro de carbón, grafito, nanotubos carbonosos, paladio, platino, e hidróxidos de óxido de hierro, en particular, seleccionados del grupo que consiste en grafito y nanotubos carbonosos.  
 20
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la enzima es una oxidasa, en particular una glucosa oxidasa.  
 25
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque comprende, además, la enzima específica del analito fijada de forma covalente al componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor.  
 30
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el componente eléctricamente conductor y/o el componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor está dispuesto en forma de nanopartículas.  
 35
7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque comprende además, como mínimo, un material de unión seleccionado entre el grupo que consiste en hidrocarburos fluorados, policarbonatos, poliisopreno, poliuretanos, resinas acrílicas, resinas de polivinilo y siliconas, en particular seleccionadas del grupo que consiste en poliuretanos, resinas acrílicas y resinas polivinílicas.  
 40
8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el componente eléctricamente conductor y/o el componente estabilizante de la enzima eléctricamente no conductor o semiconductor, es dispersado de manera homogénea en la composición.  
 45
9. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la enzima tiene una actividad residual de, como mínimo, 90%, después de almacenamiento de la composición durante un mínimo de 4 semanas, preferentemente un mínimo de 12 semanas, más preferentemente, como mínimo 28 semanas a una temperatura de 4°C, basada en la actividad total de la enzima antes del almacenamiento.  
 50
10. Sensor electroquímico para determinar un analito, cuyo sensor comprende, como mínimo, un electrodo de trabajo y, como mínimo, un electrodo de referencia, caracterizado porque el electrodo de trabajo comprende la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.  
 55
11. Sensor electroquímico, según la reivindicación 10, caracterizado porque comprende un recubrimiento biocompatible que recubre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia.  
 60
12. Sensor electroquímico, según la reivindicación 10 ó 11, para determinar un analito en un fluido corporal, en particular en sangre entera, plasma, suero o fluido de tejidos extracelulares.  
 65

13. Sensor electroquímico, según la reivindicación 10 ú 11, para determinar un analito seleccionado entre el grupo que consiste en ácido málico, alcohol, amoniaco, ácido ascórbico, colesterol, cisteína, glucosa, glutatión, glicerol, urea, 3-hidroxibutirato, ácido láctico, 5'-nucleotidasa, péptidos, piruvato, salicilato y triglicéridos, en particular glucosa.

5

14. Procedimiento para la determinación de un analito que comprende las siguientes etapas:

(a) establecer contacto de una muestra que contiene el analito con un sensor electroquímico, según la reivindicación 10 ú 11, y

10 (b) determinar la presencia y/o cantidad del analito.

Figura 1

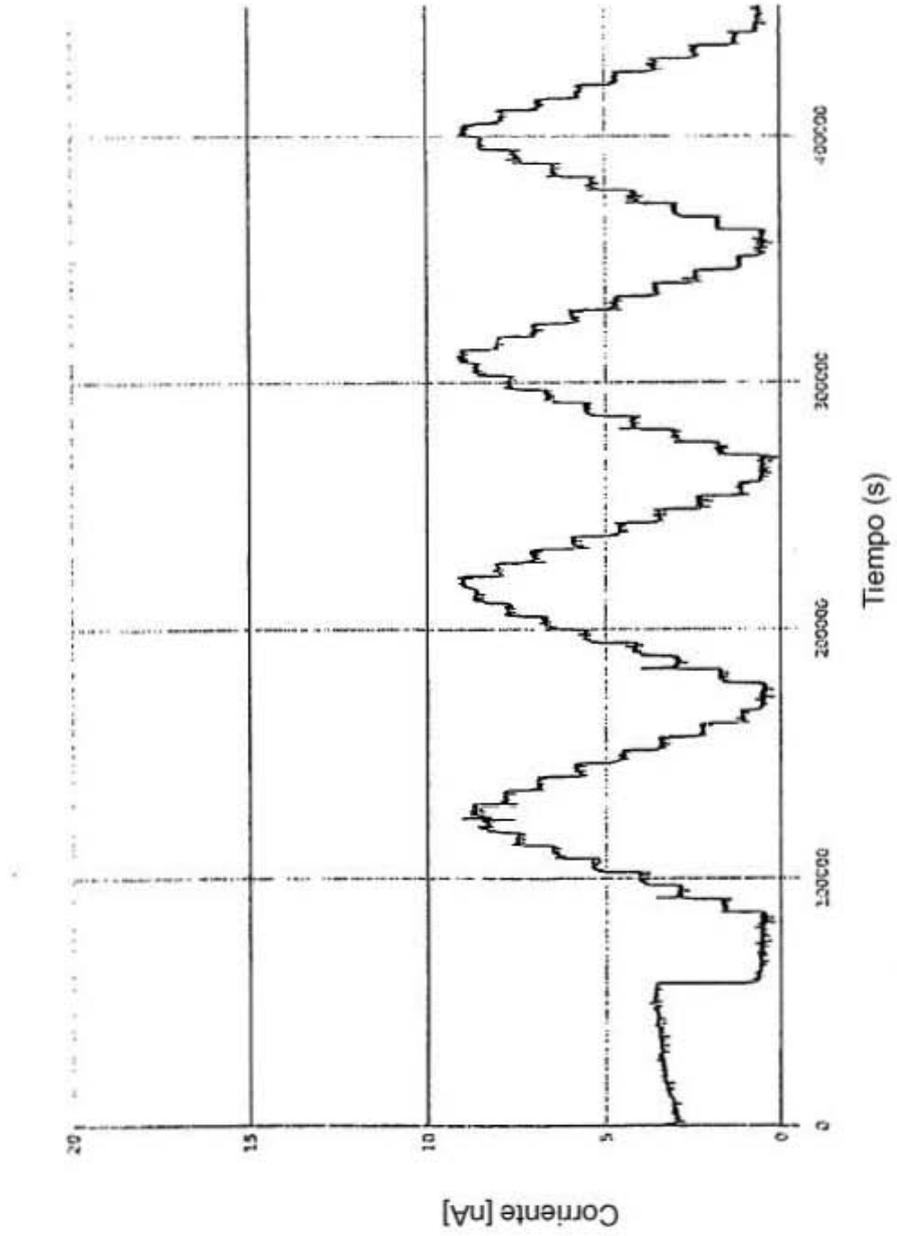


Figura 2

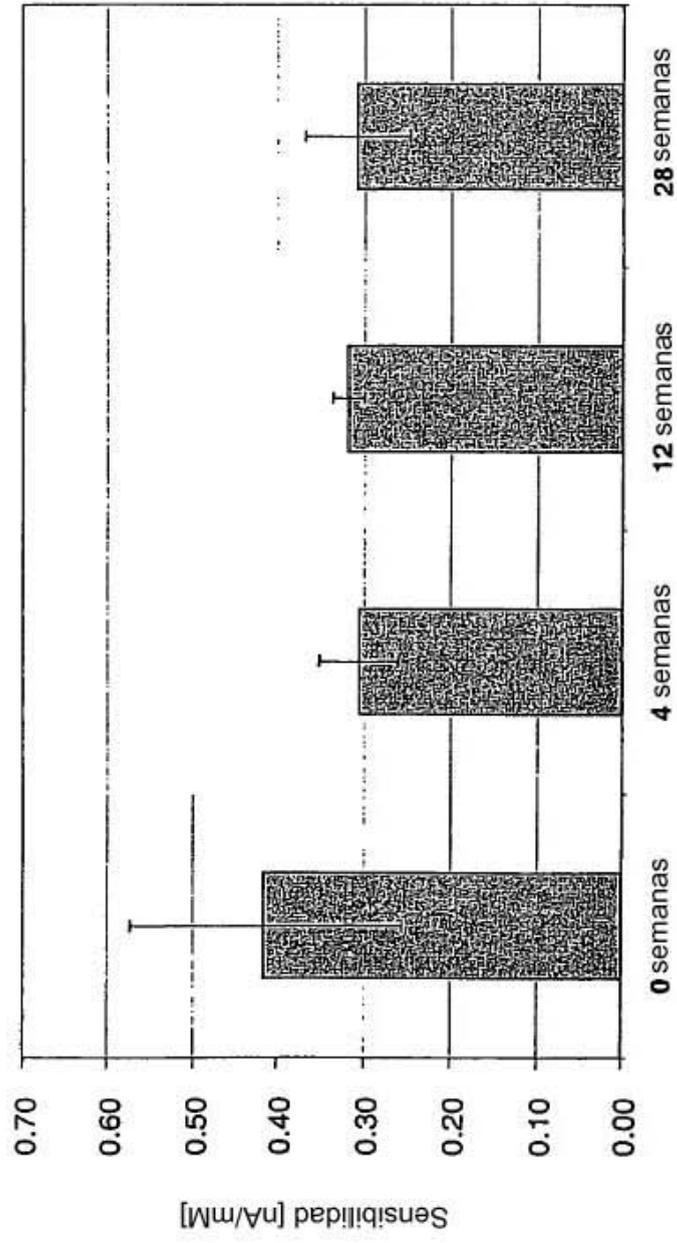
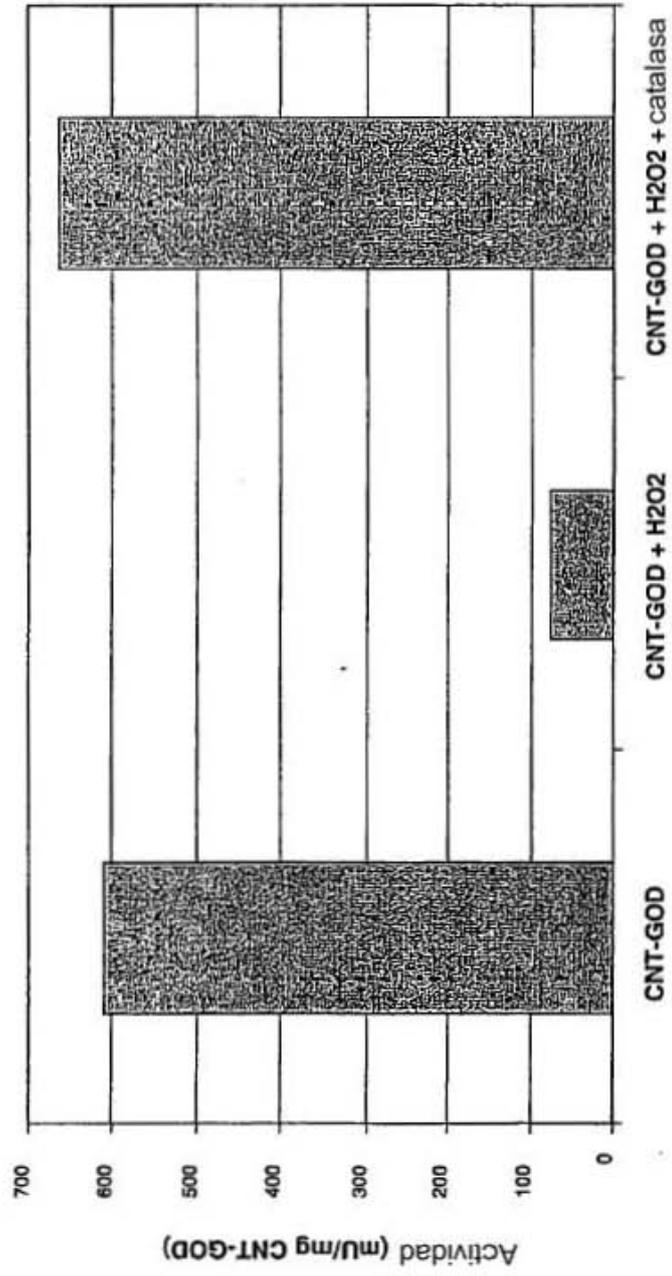


Figura 3



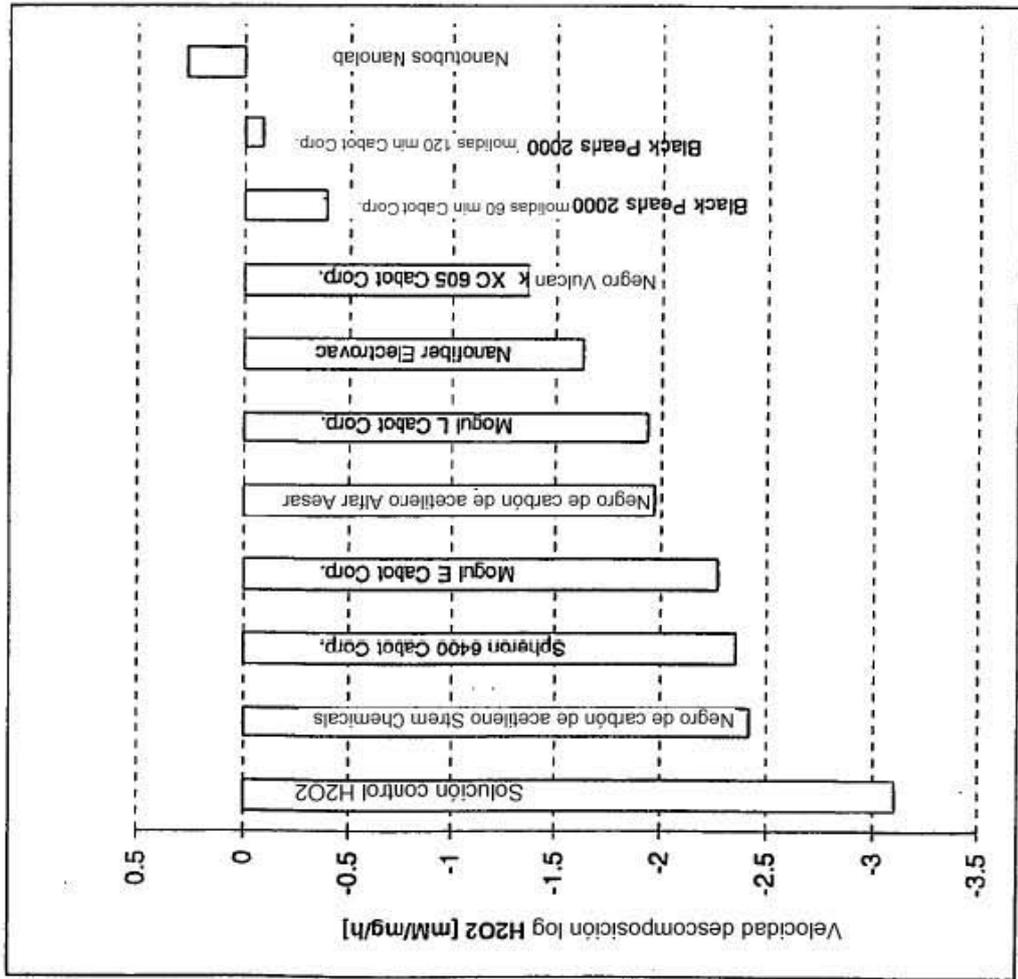


Figura 4A

Figura 4B

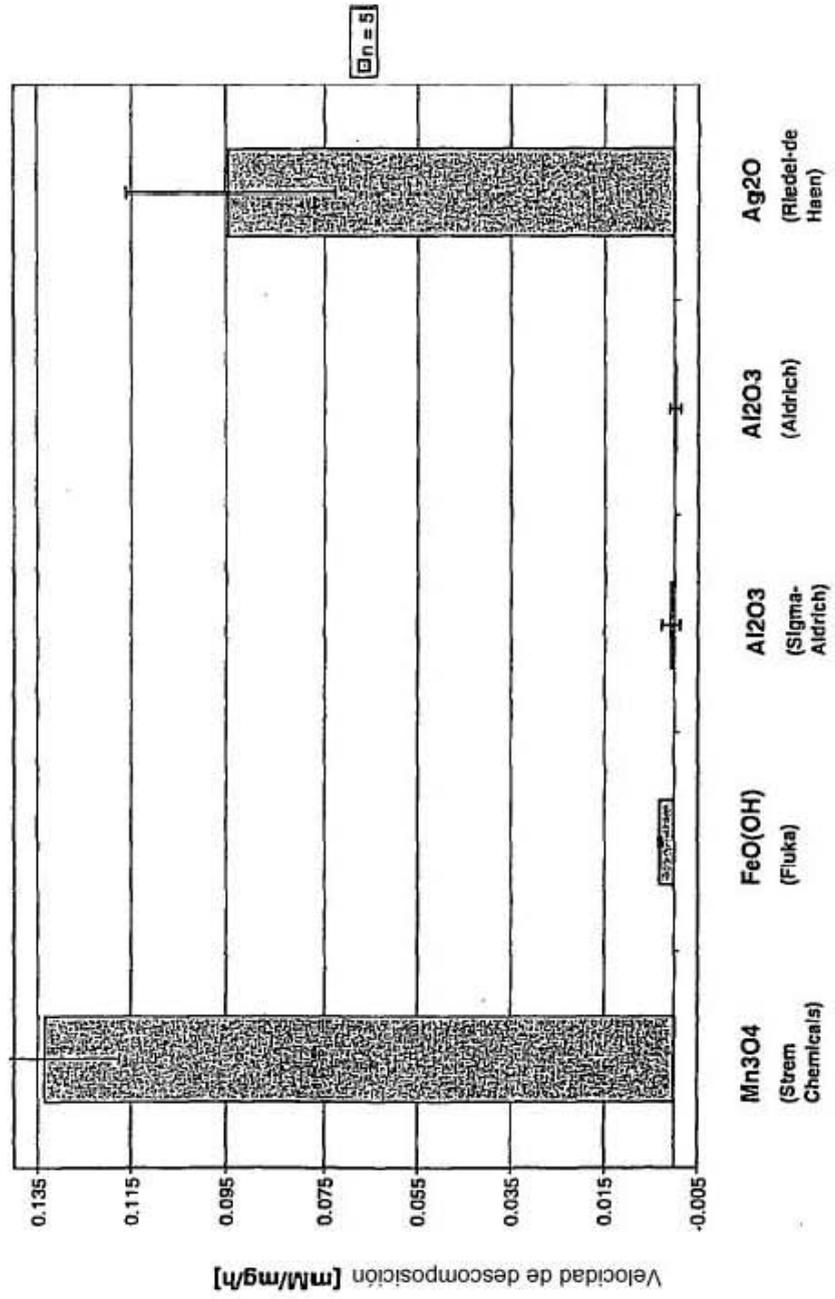


Figura 4C

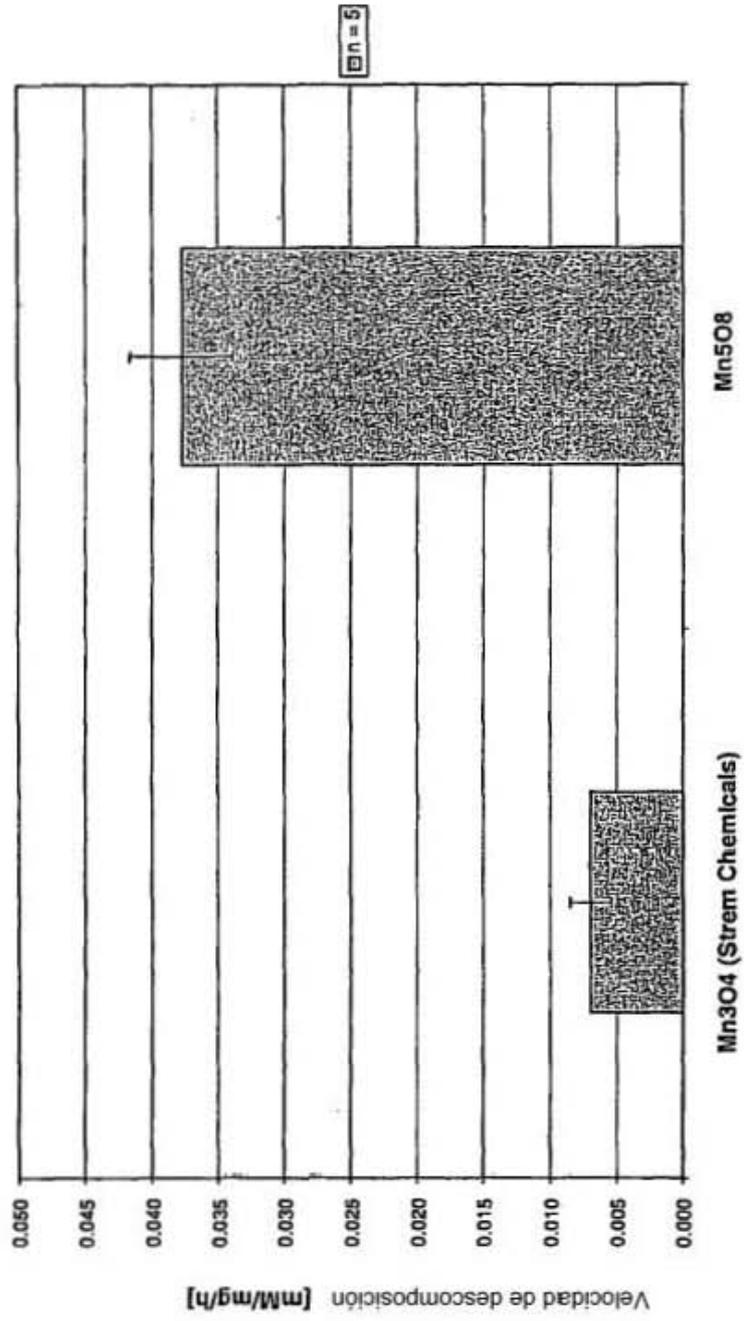


Figura 5A

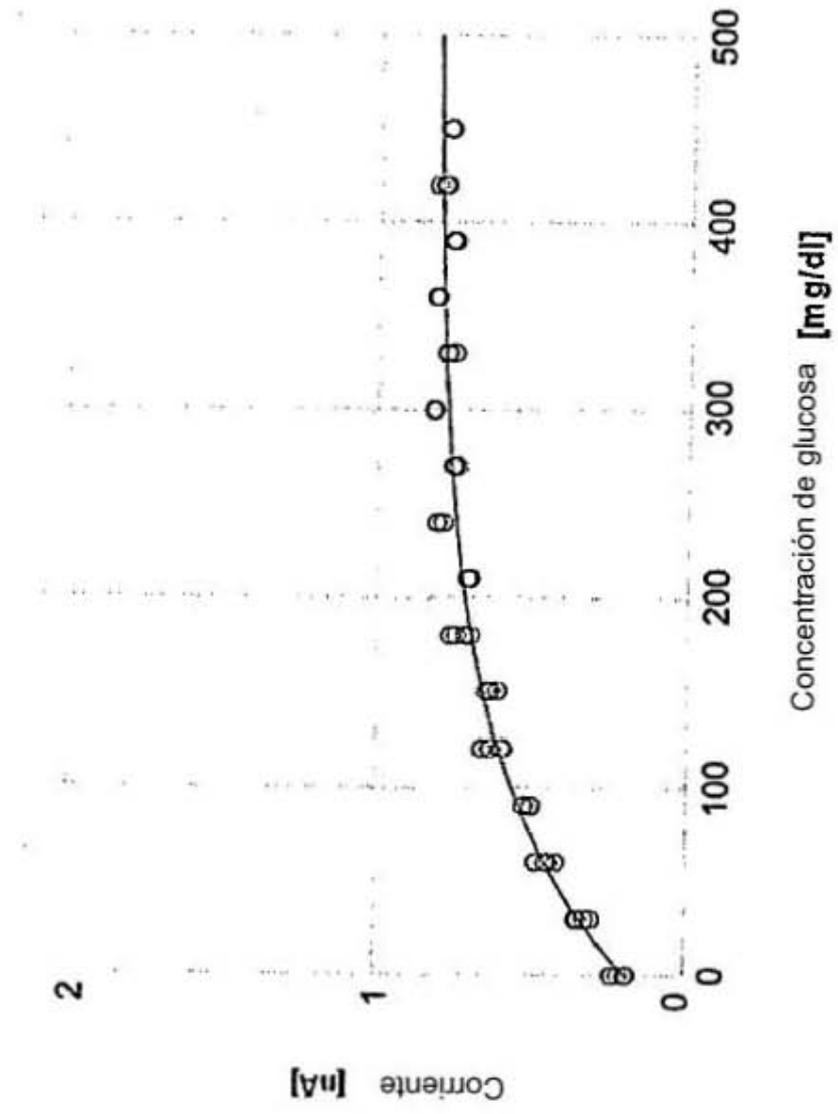


Figura 5B

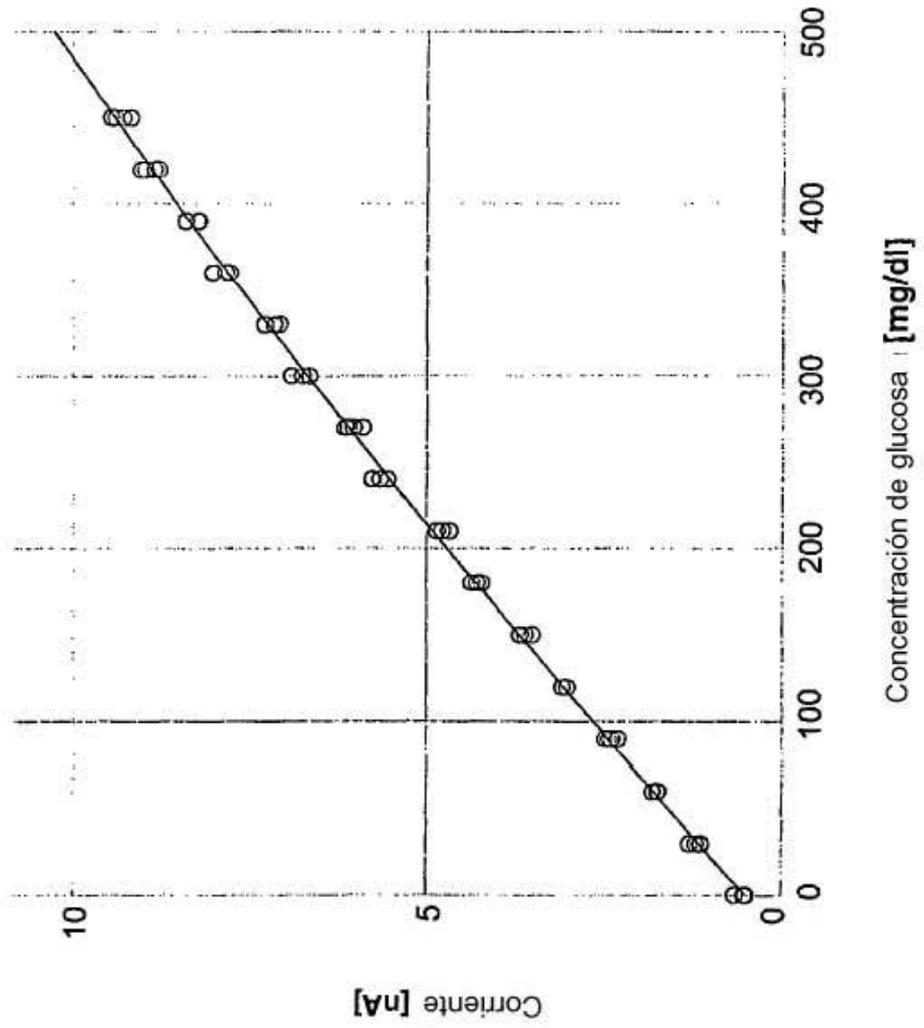
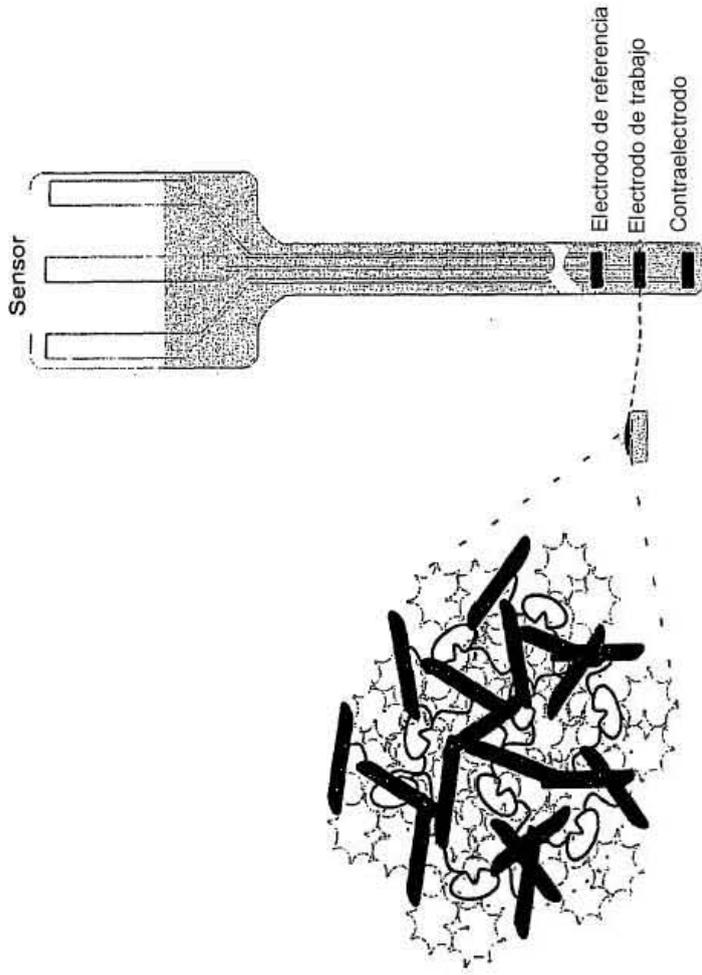


Figura 6



- Catalizador de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electricamente no conductor
- Catalizador descomposición H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electricamente conductor
- Enlazador entre enzima y catalizador de descomposición electricamente conductor
- enzima