

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 170**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04809471 .8**

96 Fecha de presentación: **01.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1646637**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54 Título: **Sistema de biosensor de afinidad electroquímica y métodos de utilización**

30 Prioridad:

01.07.2003 US 484096 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

05.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

05.12.2012

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**DIEBOLD, ERIC R.;
GHOSHAL, MITALI;
DENG, DAVID Z. y
 TSAI, JANE SHIOW-CHUAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 392 170 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

Sistema de biosensor de afinidad electroquímica y métodos de utilización.

Antecedentes de la invención

5 La presente invención describe un sistema, y métodos para detectar analitos en fluidos y está relacionada con reactivos para detectar analitos en fluidos. Más específicamente, pero no exclusivamente, la presente invención está dirigida a reactivos para detectar y analizar analitos en muestras de fluido y describe métodos para ello, y sistemas de inmunoensayo electroquímico.

10 Los biosensores electroquímicos se han utilizado en el diagnóstico in vitro para determinar la presencia y concentración de ciertos analitos biológicamente significativos en muestras biológicas como sangre, orina, y saliva. La monitorización diabética de la glucosa en sangre ha sido una de las aplicaciones comerciales más comunes y exitosas de biosensores electroquímicos. Se han desarrollado otras aplicaciones de biosensores para diagnóstico e incluye lactato, colesterol, creatinina, gases en sangre, y electrolitos. Ambas técnicas de medición electroquímica AC y DC se utilizan incluyendo amperometría, potenciometría, coulometría, e impedancia. La mayoría de las tecnologías de los biosensores actuales recae sobre enzimas libres seleccionadas, como elemento de bio-reconocimiento de los analitos. Además, esta tecnología normalmente puede medir de forma ajustada una concentración relativamente alta de analitos en el rango mM. En consecuencia, la detección electroquímica puede conseguirse utilizando un macro electrodo sin la utilización de técnicas de amplificación.

20 Otros analitos de interés se encuentran en concentraciones mucho más bajas en comparación con la glucosa. Dichos analitos incluye: drogas de abuso, como, anfetamina, cocaína, fenciclidina (PCP), y tetrahidrocannabinol (THC); agentes terapéuticos, como, teofilina, digoxina, digitoxina, y metotrexato; contaminantes ambientales, como, PCB y atrazina; agentes de guerra biológica, como, ántrax, botulismo, y sarin; proteínas; y hormonas.

25 Varias técnicas de ensayo basadas en la afinidad que utilizan marcadores se han explorado para detectar estos analitos. Las técnicas basadas en la afinidad incluyen el uso de: marcajes enzimáticos, marcajes radioisotópicos, marcajes quimioluminiscente, marcajes fluorescentes, y marcajes rédox electroquímicos. No obstante, muchas de estas técnicas requieren mucho trabajo y muchos pasos que se realizan mejor en un laboratorio por un experto en la materia. El número y complejidad de pasos prohíben el uso rutinario de estas técnicas "en el campo". Muchas de estas pruebas utilizan variaciones en los ensayos competitivos de inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Los ejemplos incluyen ensayos de atrazina a partir de Strategic Diagnostics y EnviroLogix, Inc. ambos poseen muchos pasos manuales que incluye una incubación de 15 minutos y de 1 hora respectivamente. Pueden encontrarse otros ensayos basados en ELISA similares y otros formatos de inmunoensayo que pueden aplicarse a diversos grupos de ensayos en muchas industrias pero pocas son capaces de un ensayo cuantitativo in situ rápido. Uno de los formatos de inmunoensayo más comúnmente disponibles que se usan para las pruebas rápidas o dispositivos de punto de atención se conocen como ensayos de flujo lateral y utilizan inmunocromatografía. La mayoría de estos productos son los "ensayos de selección" que proporcionan un resultado cualitativo (positivo / negativo) indicado por la presencia o ausencia de una línea. Los resultados suelen ser de lectura visual y a menudo son difíciles de interpretar cuando están presentes líneas parciales o pequeñas. La mayoría de estos ensayos requieren un seguimiento con otro método como GC / MS o HPLC si el resultado es positivo. Hay una gran necesidad de proporcionar una tecnología para estas diferentes industrias para permitir una rápida detección basada en la afinidad. La rápida detección permite rápidos resultados fiables.

40 El uso de marcajes rédox electroquímicos, que también se denominan agentes de transferencia de electrones o marcajes de mediadores electroquímicos, han demostrado proporcionar resultados prácticos y fiables en ensayos electroquímicos basados en la afinidad. No obstante, el uso de técnicas de detección electroquímica para cuantificar los marcadores rédox y, en consecuencia, correlacionar la concentración de los marcadores rédox con la concentración del analito, no ha sido sin problemas. Las mediciones electroquímicas están sujetas a muchas influencias que afectan la sensibilidad y precisión de las mediciones, incluyendo las relacionadas con la selección apropiada del conjugado mediador a las variaciones en la estructura del electrodo en sí y / o los efectos de matriz derivada de la variabilidad de las muestras.

50 US 5.589.326 y WO 96/25514 describen complejos de osmio mononuclear que comprende dos ligandos bidentados y un enlace imidazol mediante sus átomos de nitrógeno del anillo con el osmio central. Estos complejos de osmio pueden utilizarse como mediadores rédox especialmente en los biosensores electroquímicos. Nakabayashi et al., Sensors and Actuators B 66 (2000): 128-130 examinó la evaluación de los complejos de Os (II) como mediadores accesibles para los biosensores. Los complejos de Os (II) mononuclear se sintetizaron y los potenciales rédox de los complejos de Os (III/II) pudieron disminuirse mediante el uso de 4,4'- dimetil-2,2'-bipiridina, imidazol e ion cloruro como ligandos. US 2003/0096997 describe complejos metálicos de transición mononucleares y su uso como mediadores rédox. Como átomo de metal se utiliza cobalto, hierro, rutenio, osmio, o vanadio. Dos ligandos bidentados y otros dos ligandos están unidos al metal central. Csöregl et al., Anal. Chem. 1994, 66, 3131-3138 describe una capa sensible a la glucosa hecha por entrecruzamiento de glucosa oxidasa con un polímero derivado de poli (vinilimidazol), mediante la formación de complejos mediante parte de los imidazoles con $[Os(bipiridina)_2Cl]^{+2}$.

Muchos inmunoensayos requieren un límite de detección mucho más bajo de lo que es actualmente posible con la detección electroquímica sobre un macroelectrodo convencional. Por lo tanto, las técnicas de amplificación de señales deben utilizarse para estos ensayos para mejorar significativamente el límite de detección electroquímico.

- 5 A la luz de los problemas descritos anteriormente, hay una necesidad continua de avances en el campo relevante, incluyendo sistemas mejorados, métodos, composiciones, y reactivos relacionados con la mejora de los análisis de detección de diversos analitos, incluyendo fármacos terapéuticos, drogas de abuso, estado de la enfermedad, analitos para las pruebas de alimentos, analitos de importancia ambiental, y agentes de guerra biológica. La presente invención representa dicho avance y proporciona una serie de beneficios y ventajas.

Resumen de la invención

- 10 En una forma, la presente Invención proporciona nuevas especies electroquímicas basadas en osmio que pueden utilizarse en los inmunoensayos. Las especies de osmio pueden acoplarse a un ligando de unión específico para detectar analitos de interés. Las especies de osmio pueden incluir 1, 2, o 4 centros de osmio que se acoplan a los ligandos de unión específico usando una variedad de grupos de unión. Los grupos de unión pueden seleccionarse para tipos específicos de analitos o para dar cabida a las diferentes propiedades presentadas por los analitos. Por
15 ejemplo, el grupo de unión se puede seleccionar para impartir diferentes grados de hidrofiliicidad (o por el contrario propiedades hidrofóbicas).

Las nuevas especies electroquímicas basadas en osmio pueden utilizarse para detectar y analizar una variedad de analitos de interés, por ejemplo, agentes de guerra biológica, agentes terapéuticos, contaminantes ambientales, proteínas, y hormonas.

- 20 Las especies electroquímicas basadas en osmio pueden utilizarse junto con diferentes sensores de prueba y equipos de diagnóstico. En una forma, las especies electroquímicas basadas en osmio se utilizan en un inmunoensayo homogéneo para detectar los analitos de interés. Las técnicas de ensayo descritas por la presente invención pueden utilizarse con diferentes sensores de prueba y medidores. Las técnicas de ensayo pueden utilizarse para analizar muestras que contengan una concentración especialmente baja del analito deseado. Las
25 técnicas de ensayo pueden utilizarse para proporcionar resultados fiables de ensayo dentro de un tiempo muy corto de prueba - preferiblemente menos de aproximadamente 10 segundos.

- En una forma, la presente Invención describe nuevos sensores de prueba que incluye matrices interdigitadas de electrodos. Las matrices de electrodo pueden incluir primeros y segundos electrodos de trabajo, así como un contador y electrodos de referencia. Se puede utilizar un bipotenciostato para controlar diferentes potenciales de
30 tensión entre las distintas combinaciones electrodos de trabajo y de referencia (o contador).

En otra forma, los equipos de diagnóstico aquí descritos pueden incluir dispositivos portátiles de prueba que pueden utilizarse fácilmente "en el campo". Los dispositivos de prueba portátiles pueden incluir los sensores de prueba, un medidor configurable portátil, y, opcionalmente, una cámara de recogida de muestras.

- 35 Otros objetos, características, aspectos, formas, ventajas, y beneficios se harán evidentes a partir de la descripción y los dibujos contenidos en este documento.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 es una representación en diagrama de un equipo diagnóstico.

Fig. 2 es una vista en perspectiva de un sensor de prueba con una matriz plana de electrodos útiles para detectar y analizar una serie de analitos de interés.

- 40 Fig. 3 es una vista en perspectiva de un sensor de prueba que posee una matriz plana de electrodos útiles para detectar y analizar una serie de analitos de interés con una pluralidad de puertos de muestras.

Fig. 4 es una vista explotada de un sensor de prueba útil para detectar y analizar una serie de analitos.

Fig. 5 es una vista en perspectiva del sensor de prueba de la Fig. 4.

Fig. 6 es un sensor de prueba configurado para el análisis de múltiples analitos que puede sumergirse en la muestra.

- 45 Fig. 7 es una vista en perspectiva de un sensor de prueba y un medidor configurado para el análisis de ensayos únicos que pueden dosificarse con sangre de un dedo tomada con una lanceta.

Fig. 8 muestra una vista en perspectiva de un sensor de prueba y un medidor configurado para un ensayo único que puede dosificarse con una pipeta.

- 50 Fig. 9 muestra una vista en perspectiva de un medidor y un sensor de prueba configurado para análisis de múltiples analitos que incluye el ensayo unido a una cámara de recogida de muestras.

- Fig. 10 es una vista en sección transversal de un par de electrodos que ilustra las condiciones del actual estado estacionario limitado por la difusión de un mediador reversible (M) que de forma alternativa se oxida y reduce en los dedos de electrodos interdigitados.
- 5 Fig. 11 es una vista de plano alargada de un grupo de electrodos interdigitados adecuados en una matriz planar (MEID) para medir los ciclos rédox de mediadores reversibles de acuerdo con la presente invención
- Fig. 12 es una vista en sección transversal parcial de una matriz vertical de electrodos interdigitados para la medición de mediador reversible de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 13 es una vista en planta ampliada de una matriz vertical de electrodos interdigitados de la Fig. 12.
- 10 Fig. 14 es una representación tridimensional de una corriente eléctrica vs. dimensiones de electrodo para una MEID planar normalizada para el área física del electrodo.
- Fig. 15 proporciona el listado de MEID y MVEID de la Tabla 3 preparados y evaluados
- Fig. 16 es una gráfica que ilustra la capacidad de aumentar la amplificación de corriente al disminuir la amplitud del hueco entre los electrodos es un MEID
- Fig. 17 es un diagrama que ilustra un ensayo de unión secuencial
- 15 Fig. 18 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un marcaje electroquímico de Os(bipiridil)histamina de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 19 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un osmio-anfetamina conjugado de acuerdo con la presente invención.
- 20 Fig. 20 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un conjugado osmio-teofilina de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 21 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un conjugado osmio-PCP de acuerdo con la presente invención
- Fig. 22 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un conjugado osmio-THC-2 de acuerdo con la presente invención.
- 25 Fig. 23 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un conjugado osmio-THC-1 de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 24 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un conjugado osmio-metotrexato de acuerdo con la presente invención.
- 30 Fig. 25 ilustra un esquema de síntesis para la Preparación de un enlazante trifluoroacetamido aromático protegido para utilizar de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 26 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un enlazante trifluoroacetamido aromático protegido di-osmio y trifluoroacetamido aromático mono osmio o marcaje electroquímico de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 27 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un marcaje electroquímico di-osmio con un enlazante aromático de acuerdo con la presente invención.
- 35 Fig. 28 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un conjugado di-osmio THC-1 de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 29 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un marcaje electroquímico di-osmio con un enlazante alifático de acuerdo con la presente invención.
- 40 Figs. 30 y 31 ilustran un esquema de síntesis para la preparación de un marcaje electroquímico de enlazante osmio-PEG de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 32 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un osmio PEG THC-2 conjugado de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 33 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un osmio PEG metotrexato conjugado de acuerdo con la presente invención.
- 45 Fig. 34 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un grupo enlazante de ácido tetra carboxílico de acuerdo con la presente invención.

- Fig. 35 ilustra un esquema de síntesis para la preparación del precursor protegido del marcaje electroquímico tetra-osmio trifluoroacetamido de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 36 ilustra un esquema de síntesis para la desprotección del enlazante de ácido tetra carboxílico de un marcaje electroquímico tetra-osmio de acuerdo con la presente invención.
- 5 Fig. 37 ilustra un esquema de síntesis para la preparación de un enlazante osmio (dimetil biimidazol)₂ histamina o marcaje electroquímico de acuerdo con la presente invención.
- Fig. 38 es un espectro VC de un marcaje electroquímico de conjugado osmio-teofilina.
- Fig. 39 es una representación que ilustra la respuesta del estado estacionario al marcaje electroquímico de osmio-teofilina.
- 10 Fig. 40 es una representación de la respuesta a dosis del marcaje electroquímico del conjugado osmio-teofilina.
- Fig. 41 es una representación de la inhibición de anticuerpo del marcaje electroquímico del conjugado osmio-teofilina.
- Fig. 42 es una representación de una respuesta de ensayo de teofilina en una matriz de suero.
- Fig. 43 es un espectro VC de un marcaje electroquímico del conjugado osmio-anfetamina.
- 15 Fig. 44 es un VC reciclado del marcaje electroquímico del conjugado osmio-anfetamina.
- Fig. 45 es una representación de la respuesta al conjugado del marcaje electroquímico de osmio-anfetamina.
- Fig. 46 es una curva de ensayo para anfetamina en PBST obtenido en la presencia del marcaje electroquímico de osmio-anfetamina.
- 20 Fig. 47 es un VC reciclado del marcaje de dicloruro de bis (2, 2'-bipiridil) imidazol cloro osmio (III) sobre un hueco 2 μ M de amplitud de la matriz de electrodo interdigitado que contiene 750 pares de electrodos interdigitados.
- Fig. 48 es una respuesta a dosis del conjugado osmio biotina sobre un electrodo de 2 μ M de MEID.
- Fig. 49 es una representación de una respuesta al estado estacionario registrada 0,5, 2, y 10 segundos tras la introducción de la muestra para un ensayo de biotina en un electrodo de 2 μ M de EID.
- 25 Fig. 50 es una representación de la corriente vs. tiempo de la respuesta al estado estacionario de las concentraciones representativas del ensayo de biotina de la Fig. 49.
- Fig. 51 es un espectro de VC del enlazante trifluoroacetamido aromático de mono-osmio protegido.
- Fig. 52 es un espectro de VC del marcaje electroquímico del enlazante di-osmio aromático.
- Fig. 53 es una gráfica que compara la respuesta de una curva de dosis de un enlazante di-osmio, un enlazante mono-osmio, y dicloruro de bis (2,2'-bipiridil) imidazol cloro osmio (III).
- 30 Fig. 54 es un espectro de VC del conjugado de di-osmio-THC-1.
- Fig. 55 es una gráfica de la respuesta del conjugado de osmio-PEG-THC-2.
- Fig. 56 es una representación de amplificación de enzima de la respuesta del conjugado del marcaje electroquímico de osmio-PEG-THC-2 con y sin hidroxipropilbetaciclodextrina.
- Fig. 57 es un espectro de VC del conjugado de osmio-PEG-metotrexato.
- 35 Fig. 58 es una gráfica de la respuesta a dosis del conjugado de osmio-PEG-metotrexato.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención proporciona una serie de técnicas y sistemas para el análisis de varios analitos. Las técnicas pueden emplear nuevos mediadores electroquímicos junto con parejas de unión específicas seleccionadas para los analitos de interés. El sistema puede incluir una serie de sensores de prueba que portan diferentes configuraciones de electrodo y químicos para detectar o analizar los analitos deseados. De forma adicional, pueden utilizarse una serie de medidores de prueba y plataformas configurables con los sensores de prueba para proporcionar una técnica de ensayo precisa, fiable, y fácil de utilizar.
- 40

Cuando se utiliza aquí, las siguientes definiciones definen el término establecido:

El término "estructura de electrodo" se refiere a una combinación de todas las áreas de electrodo activas que

pueden tener contacto con la muestra, los conjugados rédox reversibles, y/o el conjugado de osmio; las trazas de electrodo que conducen a las almohadillas de contacto; y las almohadillas de contacto que permiten el contacto eléctrico con un medidor u otro instrumento.

- 5 El término "área de electrodo activa" cuando se utiliza junto con un electrodo MEID incluye las regiones de electrodo en contacto con la muestra que incluye un electrodo de referencia y al menos un primer y un segundo electrodo de trabajo dimensionado para permitir el reciclaje difusional de los conjugados rédox reversible difusibles en la muestra cuando se aplica un potencial catódico y anódico dependiente de la especie rédox reversible predeterminada de los electrodos de trabajo.
- 10 En el caso de la amplificación enzimática el "área de electrodo activa" incluye las regiones de electrodo en contacto con la muestra que incluye un electrodo de referencia y al menos un primer electrodo de trabajo.
- El término "MEID" se refiere a una matriz de electrodo interdigitado a menudo descrito como un par de electrodos similar a un peine pero que puede incluir otras formas que llevan dos o más electrodos cercanos para permitir el reciclaje rédox entre los electrodos. Se incluye en esta definición los electrodos que pueden separarse espacialmente en diferentes planos también denominados matriz vertical de electrodos interdigitados (MVEID).
- 15 El término "electrodo de trabajo" tal como se utiliza en este documento se refiere a un electrodo en el que tienen lugar la medición de eventos (es decir, oxidación y/o reducción) y el flujo de corriente resultante puede medirse como indicador de la concentración de analito.
- El término "potencial anódico" se refiere al potencial más positivo aplicado al ánodo, y el "potencial catódico" se refiere al potencial menos positivo o negativo aplicado al cátodo (vs. un electrodo de referencia como Ag/AgCl)
- 20 Un "sensor de prueba" se refiere a una combinación de estructuras y reactivos que incluye todos los subcomponentes como plásticos, espaciadores, y adhesivos así como los componentes arquitectónicos específicos, como, capilares, zonas de medición, y estructuras de electrodo. Un sensor de prueba puede incluir las estructuras de componentes necesarias, y reactivos para un ensayo único o puede contener sus componentes, estructuras y reactivos necesarios para ensayos múltiples. El sensor de prueba descrito aquí puede también incluir una cámara de recogida de muestras y/o cámaras de mezclado además de la zona de medición.
- 25 El término "zona de medición" es la región del sensor de prueba en los conjugados rédox reversibles que está en contacto con el área de electrodo activa y capaz de examinarse durante el ensayo.
- Esta región del diseño del sensor de prueba configurable permanecerá virtualmente idéntica entre ensayos con la excepción de los reactivos específicos de ensayo y las dimensiones de la MEID. Los diseños de ensayo múltiple tendrán múltiples zonas de medición excepto en el caso de utilizar múltiples mediadores rédox con potenciales rédox variados tal como se describe en la Patente US N° 6.294.062.
- 30 Las "sustancias interferentes" incluyen cualquier especie que incluye el analito de interés que eleva o reduce la señal deseada del analito. Los interferentes pueden ser una parte inherentemente de la matriz de muestra como el ácido ascórbico y el ácido úrico que puede oxidarse en la sangre u orina. Las proteínas o moléculas hidrofóbicas como THC pueden interferir con las transferencia de electrones a los electrodos formando una capa de pasivación sobre la superficie del electrodo que reduce la respuesta esperada.
- 35 Un "bipotenciostato" es el motor de medición que permite separar y controlar independientemente el potencial de dos electrodos de trabajo "WE1" y "WE2" en la misma célula electroquímica junto con los electrodos de referencia y contador.
- 40 Un "marcaje electroquímico" tal como se utiliza aquí se refiere a una especie química capaz de la oxidación y reducción reversible en una muestra líquida. Los marcadores electroquímicos pueden incluir complejos de iones metálicos de transición, por ejemplo hierro (ferroceno y derivados de ferroceno), rutenio, y osmio. En realizaciones preferibles, el marcaje electroquímico para la presente invención se selecciona como una especie de osmio organometálico.
- 45 La "cámara de recogida de muestras" es el primer área en contactar con el espécimen que contiene el analito. Ejemplos incluye una zona de llenado capilar, cubeta, copa, u otra recipiente receptor de muestras para recibir el analito contenido en la muestra. La cámara de recogida de muestras tal como se utiliza aquí es una región que recoge un volumen de muestra suficiente para poner en marcha los ensayos deseados. La cámara de recogida de muestras puede inmediatamente pasar todo o una porción de la muestra a la zona de recepción de muestras o zona de medición y poner en marcha el ensayo, o puede mantener la muestra hasta que el dispositivo se dispara más tarde para pasar la muestra a las zonas apropiadas. Preferiblemente la recogida de muestras, la recepción de muestras, la zona o cámara de reacción, y la zona de medición son una y la misma zona o región.
- 50 La "zona o cámara de reacción" es el área en que la muestra puede interaccionar con los reactivos. Esto puede ser un reactivo de hidratación simple o una disolución de un reactivo único o un esquema secuencial de reacción con múltiples reactivos. La zona de recepción de muestras puede facilitar el mezclado y puede pasar la muestra a la
- 55

zona de medición. Preferiblemente la zona de recepción de muestras es una y la misma zona de medición.

El término "anticuerpo" se refiere a (a) cualquiera de las diferentes clases o subclases de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, derivada de cualquiera de los animales utilizados normalmente, por ejemplo, oveja, conejo, cabra o ratón; (b) anticuerpos monoclonales; (c) moléculas intactas o "fragmentos" de anticuerpos, monoclonales o policlonales, siendo los fragmentos aquellos que contienen la región de unión del anticuerpo, es decir, fragmentos; desprovistos de la porción Fc (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂) o los fragmentos denominados "media molécula" obtenida de la escisión reductiva de los puentes disulfuro que conectan los componentes de la cadena pesada en el anticuerpo intacto. Las preparaciones de dichos anticuerpos son bien conocidas en la materia.

En general, la presente invención está dirigida a la detección y análisis de una amplia variedad de analitos. Los analitos de interés pueden encontrarse en una variedad de fuentes, que incluye humanos, animales, plantas, alimentos, aguas residuales, y aguas subterráneas. Los analitos pueden ser de interés debido a que pueden ser fármacos terapéuticos o sustancias de abuso cuya concentración y actividad in vivo son de interés para el bienestar y tratamiento de un paciente. Otros analitos de interés incluye analitos de interés ambiental que incluye la monitorización de agua y alimentos en busca de pesticidas, herbicidas, u otros contaminantes.

La técnica de diagnóstico descrita aquí utiliza un inmunoensayo electroquímico para detectar y analizar los analitos. El inmunoensayo preferible utiliza un marcaje electroquímicamente detectable. Preferiblemente el marcaje se detecta al medir la corriente generada a medida que el marcaje sufre múltiples ciclos de oxidación reducción en los electrodos. Normalmente, la corriente generada por la oxidación/reducción del marcaje detectable es bastante pequeño y debe amplificarse para permitir un análisis preciso y repetible del analito deseado. La corriente puede amplificarse mediante el reciclaje difusional bajo condiciones del estado estacionario y/o reciclaje enzimático.

La detección y análisis de los analitos puede llevarse a cabo utilizando un equipo de pruebas que incluye varios componentes. Los componentes mínimos incluyen un medidor, un sensor de prueba, y la muestra. Preferiblemente, un medidor portátil configurado para trabajar con ensayos de sensor de prueba específicos puede simplificar el método de ensayo. Preferiblemente, el medidor es un bipotenciostato portátil diseñado para facilitar los cambios de configuración a varios sensores de prueba. Preferiblemente el medidor consiste de una PDA disponible comercialmente u otro dispositivo computerizado portátil y un módulo bipotenciostato que se enchufa al dispositivo. Con esta configuración, los cambios en los programas pueden utilizarse con una serie de ensayos de sensores de prueba para configurar el uso del mismo módulo para crear ensayos para diferentes matrices de productos y mercados. El análisis se lleva a cabo con un pequeño volumen de muestra de alrededor de 4 μ L a alrededor de 50 μ L por ensayo. Los volúmenes de recogida de muestras para el sensor de prueba variará dependiendo de lo que es práctico para la aplicación. La sangre recogida de un dedo pinchado con una lanceta a menudo será de un volumen inferior a 15 μ L pero un dispositivo de recogida de muestra de orina deberá manejar apropiadamente volúmenes mayores. En consecuencia, la configuración del sensor de prueba variará pero las estructuras subyacentes de electrodos y las zonas de medición permanecerán en general igual de un sensor de prueba a otro sensor de prueba excepto por los reactivos específicos de ensayo como el conjugado electroquímico y la pareja de afinidad de unión (anticuerpo).

El área de electrodo activa de la estructura de electrodo incluye al menos un primer electrodo de trabajo, un segundo electrodo de trabajo, un electrodo de referencia, y un electrodo de contaje. El primer y el segundo electrodos de trabajo están dimensionados para permitir el reciclaje difusional con conjugados rédox reversibles en la muestra cuando los potenciales predeterminados anódicos y catódicos se aplican de forma simultánea al electrodo de trabajo. Los electrodos dimensionados para permitir el reciclaje difusional están normalmente en forma de matrices como microdiscos, microagujeros, o microbandas. Preferiblemente, los electrodos están en forma de una disposición interdigitada de x microbandas de electrodos con un espacio de una micra o inferior. Cuando la distancia entre dos electrodos polarizados de forma diferente es muy cercana, las capas de difusión se superponen. Las especies rédox oxidadas en un electrodo difunden y se reducen mediante el electrodo vecino. Esto resulta en una señal de corriente amplificada debido a las especies que se oxida y reducen de forma repetitiva.

El sensor de prueba puede contener una cámara de recogida de muestras y una cámara receptora de muestras para recibir la muestra de líquidos. La cámara de recogida de muestras puede incluir, por ejemplo, una cámara de llenado capilar, cubeta, copa, u otro recipiente receptor de muestras para recibir la muestra que contiene el analito. Preferiblemente la cámara de recogida de muestras y la cámara receptora de muestras puede ser la misma cámara. Preferiblemente la cámara de recogida de muestras, la cámara receptora de muestras, y la zona de medición puede ser la misma cámara. Pueden diseñarse cámaras o zonas de recogida de muestras separadas para recoger de forma eficiente y adecuada el método preferible de recogida de muestras para un ensayo de sensor de prueba particular. Algunos métodos preferibles de recogida de muestras incluyen una cámara de capilaridad para empujar la sangre desde el dedo pinchado o un puerto de introducción de muestras por otros métodos que incluye introducir en una muestra o mediante una jeringa o pipeta. Preferiblemente el sensor de prueba podrá incluir una cámara de recogida de muestras más grande como una copa útil para la recogida de aguas subterráneas, aguas residuales, u orina. Los sensores de prueba con cámaras de recogida de muestras más grandes son deseables en varias industrias cuando es importante mantener muestras adicionales y/o sellar la muestra con un sello resistente a manipulaciones. Esto proporciona ventajas particulares para las muestras que pueden tener pruebas jurídicas o para muestras sospechosas de contener contaminantes biológicos peligrosos. Alternativamente, el sensor de prueba

puede contener solo la zona de medición que sirve también como recogida de muestras y zona de recepción de muestras. En todos los casos, la porción del sensor de prueba del inmunoensayo electroquímico requiere solo de una pequeña muestra suficiente para contactar y disolver con una cantidad predeterminada de conjugados redox reversibles y una pareja de unión específica.

5 Las estructuras de electrodo pueden soportar una o más paredes de cámara, en las que al menos una porción de la estructura de electrodo, el área de electrodo activa, está en contacto con la muestra de líquido. Las regiones de contacto de la estructura de electrodo permiten al medidor o módulo de medición aplicar los correspondientes potenciales catódicos y anódicos a los electrodos de trabajo para llevar a cabo el presente método. Los potenciales catódicos y anódicos se aplican con relación al electrodo de referencia normalmente un colorante de Ag/AgCl utilizando un bipotenciostato. La estructura de electrodo opcionalmente incluirá un electrodo contador para el control de corriente. El bipotenciostato se utiliza para aplicar un primer potencial catódico a un primer electrodo de trabajo y un primer potencial anódico a un segundo electrodo de trabajo; el primer potencial catódico y anódico corresponde a aquellos potenciales necesarios para establecer un flujo de corriente a través de la muestra debido al reciclaje difusional del primer conjugado redox reversible. Opcionalmente, el potencial sobre un electrodo de trabajo puede ajustarse a una primer potencial anódico dependiente de la especie difundible y el flujo de corriente se mide a medida que el potencial del otro electrodo de trabajo es barrido a través de un potencial que corresponde al potencial catódico dependiente de las especies difundibles predeterminadas (o vice versa).

20 Los potenciales catódicos y anódicos apropiados para cada especie redox reversible pueden determinarse fácilmente mediante la medición empírica como voltametría cíclica (VC). Esta técnica se utilizó para determinar los potenciales redox y la reversibilidad del mediador y los marcajes electroquímicos. Además, también se utilizó una VC de reciclaje para medir la capacidad de una MEID para reciclar una concentración conocida de conjugados redox reversibles y determinar la amplificación efectiva. Un VC de reciclaje se realiza mediante la fijación del primer potencial de electrodo de trabajo a un potencial de oxidación o reducción y después cribando el segundo electrodo de trabajo entre la oxidación y la reducción. La VC y una VC de reciclaje se realizan ambas utilizando un detector electroquímico CHI 832A de CH Instruments, Austin, Texas.

30 Los mediadores electroquímicos preferibles son conjugados redox reversibles seleccionados por varios atributos que incluye uno o más de los siguientes potenciales redox, cinética de mediación rápida, tasa de transferencia de electrones rápida en la superficie del electrodo, facilidad de conjugación del analito, estabilidad, solubilidad, toxicidad, e inhibición del reciclaje redox tras emparejar con la pareja de unión específica (anticuerpo). Los conjugados de complejo bipyridil osmio tal como se discute en la Patente EE.UU. Nº 6.352.824 y conjugados de complejo imidazol-osmio tal como se discute en la Patente EE.UU. Nº 6.262.264 son ambos ejemplos de mediadores con propiedades apropiadas. Los mediadores en las patentes anteriormente mencionadas generalmente encuentran las propiedades deseadas y pueden verse como un punto de partida en la selección de un mediador para el desarrollo del ensayo. Los conjugados de mediadores se preparan y evalúan de acuerdo a ensayos de diferentes analitos de interés que incluye anfetamina, teofilina, cocaína, PCP, morfina, THC, y metotrexato.

40 Aunque la clase anterior de los conjugados o marcadores electroquímicos funcionan bien con la mayoría de los ensayos deseados, ciertos conjugados electroquímicos no lo hacen. Como ejemplo, los siguientes conjugados de fármaco unidos a osmio histamina, osmio THC-2 (compuesto 17), osmio THC-1 (compuesto 19) y osmio metotrexato (compuesto 21), reúnen muchas de las características electroquímicas deseables pero todos ellos sufren en términos de solubilidad y reconocimiento de anticuerpos. El conjugado osmio metotrexato no es soluble en la matriz de PBST acuosa y es necesaria la adición de DMF. Una proporción de 30:70 DMF:PBST se utilizó para solubilizar el conjugado osmio metotrexato. La superación de estas dificultades específicas de ensayo, se propusieron y sintetizaron otras estructuras de conjugado adicionales. Un enlazante más largo, más flexible e hidrofílico, denominado en este documento enlazante-PEG, se compró como O-(N-Boc-2-aminoetil)-O-(N-diglicolil)-2-aminoetil hexaetilenglicol (compuesto 33) a Nova Biochem. La síntesis de un derivado de osmio-PEG-amina se muestra como compuesto 36 y deriva a partir de los esquemas de síntesis de las Figs. 30 y 31. Este compuesto se utilizó entonces para preparar marcadores electroquímicos para THC (compuesto 37) y metotrexato (compuesto 38) tal como se muestra en los esquemas de síntesis de las Fig. 32 y Fig. 33 respectivamente. Las dificultades con los ensayos THC y metotrexato se esperaban de alguna manera debido a su naturaleza hidrofóbica, límites de detección necesarios 50 bajos, y anticuerpos disponibles en comparación con otros ensayos desarrollados.

Además del enlazante-PEG hidrofílico, se preparó un segundo tipo de conjugado útil para mejorar de forma moderada la sensibilidad de detección. Se propusieron complejos de osmio con múltiples centros redox. Los esquemas de síntesis se preparan para 2 y 4 centros redox osmio por sitio de unión a analito. Se esperó que el coeficiente de difusión "D" disminuyera con estos nuevos conjugados debido al aumento en el peso molecular del conjugado. Pero si duplica o cuadruplica los sitios redox disponibles, existe un potencial para el aumento del reciclaje.

60 Los osmio-enlazantes-PEG para THC-1 y metotrexato lograron una solubilidad mejorada en comparación con los antígenos hidrofóbicos normales de osmio. Ambos pudieron disolverse en una matriz de PBST sin el uso de un disolvente orgánico que se utilizó anteriormente. También se sugiere que este enlazante también puede lograr una mejor accesibilidad al anticuerpo debido a la gran naturaleza flexible e hidrofílico del enlazante. Los conjugados osmio-PEG y los conjugados di-osmio se comportaron razonablemente bien en la caracterización electroquímica

incluyendo VC y la respuesta del conjugado a las curvas de dosis. Estos nuevos conjugados mediadores funcionan bien en muchos ensayos y ofrecen mejoras específicas para superar ciertas dificultades del ensayo asociadas con los mediadores a utilizar en la técnica, como conjugados mediadores de antígenos hidrofóbicos incluye, por ejemplo, antígenos de tetrahidrocanabinol y de metotrexato.

- 5 En soluciones acuosas, el rango utilizable de los potenciales del primer y segundo electrodo de trabajo pueden seleccionarse para estar a alrededor de 600 mV hasta -600 mV frente al electrodo de referencia Ag / AgCl para evitar la oxidación o reducción de agua. Los marcadores electroquímicos con potenciales rédox bajos son preferibles para evitar la interferencia de posibles interferentes oxidables como el ácido ascórbico y el ácido úrico. La patente de EE.UU. N ° 6.294.062 describe que los mediadores múltiples de diferentes potenciales rédox mezclados entre sí
- 10 pueden medirse de forma independiente el uno del otro sobre una MEID si las especies reversibles rédox se seleccionan para tener potenciales rédox que difieren en al menos 50 mV. Además, pueden medirse múltiples analitos con mediadores con potencial similar o diferente si las diferentes especies rédox reversibles están separadas o segregadas en las diferentes cámaras de medición. La medición de las corrientes del estado estacionario asociado con un reciclaje rédox del mediador no unido en una MEID es proporcional a la concentración
- 15 de analito. La corriente puede medirse en WE1, WE2, o ambas.

La presente Invención puede utilizarse para medir simultáneamente dos o más analitos en una sola muestra. Preferiblemente, el equipo incluye una serie de estructuras o conjuntos de electrodo, cada conjunto de electrodos están dispuestos dentro de una cámara de muestra separada. La muestra líquida se suministra a las distintas cámaras de muestra. Por ejemplo, un sensor de prueba puede incluir al menos una segunda cámara de muestras

20 que soporta un segundo conjunto de electrodos configurado como se ha descrito anteriormente para el primer grupo de electrodos. Además, las cámaras de muestras separadas pueden contener diferentes conjugados reversibles rédox.

El método de detección incluye detectar un analito en una muestra mediante la medición de la concentración de un marcaje electroquímico no unido que está correlacionado con la concentración del analito deseado en la muestra.

- 25 La tabla 1 muestra posibles rangos de detección para analitos en comparación con la monitorización de la glucosa en sangre. En consecuencia, las técnicas de diagnóstico serán altamente sensibles. Las técnicas de ensayo basadas en la afinidad pueden proporcionar la sensibilidad para detectar estos analitos.

Table 1 Rangos de concentración de analito			
Analito	Concentraciones normales	Valores procesables	Rango de prueba sugerido
Glucosa	2-6 mM	>6mM, <2.2 mM	1 - 33 mM
Teofilina	56 - 111 µM	>138 µM	10 - 222 µM
Anfetamina	220 - 230 nM	3,5 – 7,0 µM	1 - 10 µM (punto de corte 6,7 µM)
Morfina	180 - 700 nM	1,75 – 10,5 µM	1 - 20 µM (punto de corte 1 o 7 µM)
Cocaína	330 - 660 nM	>3,3 µM	0,5 - 10 µM (punto de corte 1,0 µM)
Metotrexato (agente quimioterapéutico)	Varía en el tiempo y en la cantidad de dosis	(Post dosis) >10 µM (24hr) >1 µM (48hr) >0,1µM (72hr)	Varía en rangos altos. Multiensayo para cubrir rangos específicos puede ser la mejor opción
Tetrahidrocannabino 1	No aplicable	160-640 nM	50 - 1000 nM (punto de corte 160 nM)
Oxicodona	48 -127 nM	> 320nM	50 -1000 nM
Digitoxina (glicósido cardíaco)	13-39nM	>39 nM	2,6 - 85 nM
Digoxina (glicósido cardíaco)	1 – 2,6 nM	>3nM	0.22 – 6,44 nM

Atrazina (herbicida)	< 15 nM	> 15 nM	0,5 - 25 nM
Nota: Concentración de punto de corte: La concentración específica del fármaco o del metabolito del fármaco en la muestra que se escoge como límite para distinguir un resultado de ensayo positivo de uno negativo. Los niveles de punto de corte están encargados por empleados del Gobierno Federal de los EE.UU. pero puede variar de un lugar de trabajo de pruebas y en países particulares			

5 Recientemente, ha habido avances significativos en la tecnología de afinidad biosensor electroquímico que se basa en la información obtenida a partir de un complejo entre el analito y una "pareja de unión específica". Dichas técnicas emplean normalmente un análogo de ligando marcado de un analito diana, en el que se selecciona un análogo de ligando de modo que se une de forma competitiva con el analito a la pareja de unión específica. El grado de unión del análogo de ligando marcado a la pareja de unión específica se puede medir y correlacionar con la presencia y / o concentración del analito en la muestra. Ejemplos de analitos y sus parejas de unión específicas se enumeran en la siguiente Tabla 2.

Analito	Pareja de unión específica
Antígeno (por ejemplo, un fármaco)	Anticuerpo
Anticuerpo	Antígeno
Hormona	Receptor de hormona
Receptor de hormona	Hormona
Polinucleótido	Cadena de polinucleótido complementaria
Avidina	Biotina
Biotina	Avidina
Proteína A	Inmunoglobulina
Inmunoglobulina	Proteína A
Lectinas	Carbohidratos específicos
Carbohidratos	Lectinas

10 En una forma de la presente Invención, el grupo de unión del marcaje electroquímico comprende un antígeno determinado, un epítipo, o un análogo de ligando, típicamente, a través de uno o más grupos enlazantes para formar un "conjugado reversible rédox" descrito anteriormente. El término "análogo de ligando", como se usa en la presente Invención incluye dentro de su significado una especie química capaz de formar complejos con la misma pareja de unión específica que el analito que se está midiendo y puede incluir el propio analito. Las especies de bajo peso molecular son las más deseables en vista de la técnica de detección electroquímica basada en la difusión utilizada en la realización del presente método. Por consiguiente, es deseable que el conjugado reversible rédox que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 50.000 Daltons, más preferiblemente menos de aproximadamente 10.000 Daltons. Más preferiblemente, el peso molecular del conjugado reversible rédox está entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5.000 Daltons.

15 Ejemplos de análogos de ligando para utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: las hormonas peptídicas (por ejemplo, hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), insulina y prolactina) u hormonas no peptídicas (por ejemplo, hormonas esteroides como cortisol, estradiol, progesterona y testosterona) las hormonas tiroideas como tiroxina (T4) y triyodotironina, proteínas (por ejemplo, gonadotropina coriónica humana (hCG), antígeno carcinoembrionario (CEA) y alfa-fetoproteína (AFP), fármacos (tanto los medicamentos para uso terapéutico, drogas de abuso y / o drogas reguladas), como anfetamina, azúcares, toxinas o vitaminas y agentes de guerra biológica. Ejemplos específicos de análogos de ligandos que pueden ser incluidos como ligando análogos de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

25 cocaína, anfetamina, morfina, barbitúricos, teofilina, fenilciclidina (PCP), tetrahidrocannabinol (THC), metotrexato, benzodiacepinas, fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, gentamicina, amikacina, vancomicina, tobramicina, procainamida, lidocaína, quinidina, ácido valproico, digoxina, digitoxina, antidepresivos tricíclicos (TCA), como:

30

buprenorfina, amitriptilina, desipramina, imipramina, nortriptilina, doxepina, inmunosupresores. Los agentes de guerra biológica que pueden ser incluidos en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: racina, ántrax (*Bacillus anthracis.*), viruela, el bótox, y la toxina botulínica.

5 La Fig. 1 es una ilustración en diagrama de un sistema o un equipo de diagnóstico 10 para detectar y/o analizar uno o más analitos en un fluido de muestra. El equipo 10 incluye un sensor de prueba 12, un módulo de medición 14, y un controlador portátil 16.

10 En el equipo diagnóstico del sensor de prueba ilustrado 12 incluye una estructura de electrodo 22. Los electrodos en la estructura de electrodo pueden estar en paralelo entre ellos y estar soportados en la misma pared de la cámara de detección o en oposición entre ellos con un electrodo soportado en una pared y otro electrodo soportado en una pared adyacente o una pared opuesta de la cámara de detección. Preferiblemente el grupo de electrodos incluye una matriz de electrodos como una matriz interdigitada (MID). Cada electrodo en la MEID incluye un grupo de "dedos" que interdigitan con los "dedos" del otro electrodo. Los electrodos individuales en las MID pueden estar en paralelo entre ellos u opuestos entre ellos. Preferiblemente la matriz de electrodos puede fabricarse como una matriz vertical de electrodos interdigitados descrita en más detalle más adelante.

15 Preferiblemente el sensor de prueba 12 proporciona un análisis secuencial de uno o más analitos en una solución de muestra. Preferiblemente, los reactivos suministrados en el sensor de prueba 12 se proporcionan en forma seca con el fluido en la muestra de prueba proporcionando el medio para llevar a cabo el análisis.

20 El sensor de prueba 12 puede proporcionarse como una tira flexible o una tira rígida descrita en más detalle más adelante. El sensor de prueba rígido puede fabricarse, por ejemplo, utilizando tecnología de circuitos integrados en un una oblea de silicio.

El sensor de prueba 12 incluye un primer extremo 26 y en el lado opuesto, un segundo extremo 28. Un puerto de muestras 30 se coloca sobre el sensor de prueba 12 adyacente al primer extremo 26. Preferiblemente, un puerto de muestra 30 puede colocarse a un lado del sensor de prueba 12.

25 El segundo extremo 28 incluye una serie de almohadillas de contacto. Además, el segundo extremo 28 puede incluir una "llave" física como una proyección, protuberancia o muesca 34 para requerir una orientación única del sensor de prueba 12 para la conexión o inserción del segundo extremo 28 en el módulo de medición 14. Preferiblemente, el segundo extremo 28 puede incluir una o más conexiones eléctricas para asegurar la correcta orientación y/o inserción del sensor de prueba en el módulo de medición 14. De forma adicional, una o más de las conexiones eléctricas y contactos pueden utilizarse para identificar el sensor de prueba específico ya sea por lote de producción para el análisis de control de calidad y/o identificación del tipo de sensor de prueba, para cuyos analito(s) ha sido configurado el sensor de prueba para analizar y/o el rango de concentración predicho para el analito.

El módulo de medición 14 incluye una conexión o receptáculo 36 para recibir el segundo extremo 28. El receptáculo 36 incluye el correspondiente "cierre" de la llave física, si está presente, y el correspondiente número de contactos eléctricos para unirse con los conectores eléctricos o magnéticos y contactos sobre el sensor de prueba 12.

35 Preferiblemente, el módulo de medición 14 incluye al menos un bipotenciostato. El bipotenciostato puede configurarse para aplicar y controlar de forma simultánea el voltaje de dos grupos diferentes de electrodos sobre el sensor de prueba 12. Preferiblemente el módulo de medición 14 puede incluir dos o más bipotenciostatos, cada bipotenciostato configurado para aplicar y controlar el voltaje de dos grupos diferentes de electrodos. En consecuencia, el módulo de medición puede incluir uno o más bipotenciostato(s) programables para controlar los potenciales sobre la estructura de electrodos en contacto con la muestra. Preferiblemente el bipotenciostato puede incluirse en un medidor de sobremesa o portátil 16 descrito más adelante.

De forma adicional, el módulo de medición 14 puede incluir hardware, programas, o firmware proporcionando instrucciones para hacer funcionar uno o más análisis y la identificación de uno o más analitos seleccionados en una muestra de prueba.

45 El módulo de medición 14 también incluye un conector 38 para acoplar operativamente un módulo de medición 14 con el controlador portátil 16. En el equipo de diagnóstico ilustrado, el módulo de medición 14 incluye un conector 38, que está configurado para ser recibido en el receptáculo 40 sobre el controlador portátil 16.

50 El controlador portátil 16 puede proporcionarse en una amplia variedad de dispositivos electrónicos portátiles. Preferiblemente el controlador portátil 16 se proporciona como uno de una amplia variedad de asistentes digitales portátiles (PDA), que están comercialmente disponibles. Preferiblemente, el controlador portátil 16 puede proporcionarse como ordenador portátil (preferiblemente dedicado) o CPU. El controlador portátil 16 incluye una pantalla 46 y puede incluir, pero no necesariamente, uno o más dispositivos de entrada 44, botones, interruptores, y similares. Además, como suele suceder con la amplia variedad de PDA disponibles en el mercado, la pantalla de entrada/salida 46 puede permitir la entrada a través de un puntero táctil 48.

55 Mientras se usa, cuando el módulo de medición 14 esta conectado de forma operativa con el controlador portátil 16, se descarga automáticamente un programa residente en el módulo de medición 14 en el controlador portátil 16. El

programa descargado comienza a funcionar en el controlador portátil 16, preguntando a los usuarios información específica y/o proporcionando instrucciones a los usuarios para poner en marcha pruebas específicas. Además, el programa puede incluir una o más instrucciones o la capacidad para determinar los valores de la corriente del estado estacionario, almacenando estos valores, calculando las concentraciones de analito, gestión de datos, control de calidad, calibración, identificación del sensor de prueba (lote de producción, rango de concentración de analito, y/o tipo de analito), y conectividad hacia un sistema de información centralizado del laboratorio.

Preferiblemente el controlador 16 comienza con una pantalla del sistema de monitorización de fármacos con fecha y hora. La siguiente pantalla pregunta al usuario entrar la identificación del operador. Así, si se desea, el controlador 16 puede configurarse para que solo usuarios determinados con un entrenamiento adecuado tengan acceso para poner en marcha un ensayo. La identificación del operador puede entrarse como números o un código alfanumérico. El siguiente comando o siguiente pantalla puede ser una pantalla del menú principal que permite la selección de un fármaco específico, ensayo control, o revisión de resultados, por ejemplo. Al seleccionar "ensayo de fármaco" pregunta al usuario entrar un nombre o identificación de paciente. La siguiente pantalla permite al usuario seleccionar los ensayos adecuados o condiciones. De forma adicional el controlador 16 (o módulo de medición 14) puede incluir un programa de reconocimiento o hardware para verificar e identificar el sensor de prueba específico que se usa o utilizará con el paciente o los ensayos seleccionados o condiciones de ensayo. Tras la selección de una prueba específica, el usuario se instruye para insertar el sensor de prueba o sensores de prueba en el módulo de medición 14. El controlador 16 puede bloquear una prueba si las pruebas seleccionadas y/o si el sensor de prueba insertado no es compatible o reconocido. Si el sensor de prueba es compatible o reconocido, entonces el controlador está preparado para suministrar la muestra al sensor de prueba. Una vez aplicada la muestra, comienza la prueba. El controlador puede avisar al usuario cuando la prueba finalice e informar de los resultados al final del periodo de ensayo. Preferiblemente, el controlador posee la capacidad de informar valores cuantitativos o cualitativos dependiendo de los requisitos deseados para un ensayo. Los resultados se guardan en el instrumento y un informe se puede imprimir a través del puerto IR 41 del instrumento directamente en una impresora preparada para recibir una señal IR. Los datos también pueden descargarse mediante un puerto IR, conexión por cable y/o con un "hotsync" manual del controlador situado en un en una cuna.

La Fig. 2 es una vista en perspectiva de un sensor de prueba 50. El sensor de prueba 50 está ilustrado para analizar una serie de diferentes analitos en un único fluido de muestra. El sensor de prueba 50 incluye un puerto de muestra o de dosis única 51 y una serie de canales 52 que conducen a una serie de cámaras de reactivos 53. Se disponen diferentes reactivos, tampones, análogos de ligando marcados, y similares en cada cámara de reactivos diferente 53a, 53b, 53c. Se entiende que pueden utilizarse dos o más cámaras de reactivos diferentes, que contiene cada una un reactivo diferente o grupos de reactivos, para diferentes métodos de ensayo, por ejemplo, técnica de unión secuencial o unión por desplazamiento. Un canal 54 conduce a la cámara del reactivo 53 hacia la zona de medición 55. De nuevo, un canal separado conduce desde cada cámara de reactivo a una cámara de detección diferente.

En el sensor de prueba ilustrado, los reactivos solubles, tampones, y/o análogos de ligando marcados están secados pero no inmovilizados en un sustrato o matriz. Una porción de la muestra de fluido está dibujada en el puerto de muestra 51 normalmente por acción capilar. El fluido de muestra progresa hacia el canal 52 a cada una de las cámaras de reactivo, en la que los analitos en la muestra se unen a una pareja de unión, una pareja de unión marcada en un análisis de unión directa o a la inversa el analito puede desplazar una pareja unida de un analito, un derivado del mismo, o análogo de ligando marcado. La muestra de fluido con el producto de reacción, de la cámara de reactivo, progresa hacia la cámara de detección, en la que el análogo de ligando marcado conjugado resultante puede detectarse electroquímicamente.

Preferiblemente, uno o más de los reactivos, tampones, y ligandos marcados pueden inmovilizarse en la cámara de reactivo de otra porción del circuito de fluido en el sensor de prueba; por ejemplo, en la detección cámara.

Fig. 3 es una vista en perspectiva de un sensor alternativo de prueba 60 configurado de forma similar al sensor de prueba 50, en consecuencia se utiliza el mismo número de referencia para estructuras similares. El sensor de prueba 60 difiere del sensor 50 por incluir puertos de dosificación separados 61 a, 61b, 61c, ... uno para cada una de las cámaras de reactivo separadas 63a, 63b, 63c. Preferiblemente pueden aplicarse diferentes muestras a los diferentes puertos 61a, 61b, 61c... y cada una de las diferentes muestras pueden analizarse utilizando los mismos reactivos y condiciones. Alternativamente, la misma muestra prueba puede introducirse en los diferentes puertos 61a, 61b, 61 c ... y las diferentes cámaras de reactivo 63a, 63b, y 63c pueden incluir diferentes reactivos para realizar diferentes análisis de la muestra bruta.

Fig. 4 Es una vista detallada de otro sensor de prueba 70 ; la Fig. 5 es una vista en perspectiva del sensor de prueba 70. El sensor de prueba 70, similar a los sensores de prueba 50 y 60, incluye una serie de cámaras de reactivo y estructura de electrodos. El sensor de prueba 70 incluye una serie de tiras de soporte 72, 74, 76, 78, y 80 laminadas una encima de la otra. En el sensor de prueba ilustrado cada soporte incluye un puerto de muestras, cámara de reacción, zona de medición y una estructura de electrodo. En una forma, cada tira de soporte 72, 74, 76, 78, y 80 incluye un puerto de muestra 82, 84, 86, 88, y 90, respectivamente, que permite introducir la muestra en un puerto de muestra único, por ejemplo, puerto 82. La muestra introducida fluirá y dosificará cada ensayo de sensor de prueba 70. Excepto para los puertos de muestra, cada tira de soporte 72, 74, 76, 78, y 80 está separada del sensor de prueba adyacente mediante una capa que es impermeable a la muestra y los reactivos. Además, cada una de las

cámaras de reacción del sensor puede incluir el mismo o diferentes reactivos.

Durante la utilización una muestra se introduce en un puerto como el puerto 82, en el que la muestra fluye hacia el resto de puertos de muestra. La muestra entonces fluye hacia la cámara de reacción y después hacia la zona de medición, en la que las especies resultantes se analizan. El sensor de prueba 70 puede insertarse en un medidor que está configurado para lograr un sensor de prueba laminado con almohadillas de electrodos espaciadas verticalmente separadas entre sí para proporcionar una pantalla de los resultados de las pruebas.

Fig. 6 ilustra un equipo de diagnóstico 100 que incluye un sensor de prueba 102 y un medidor 104. El sensor de prueba 102 se inserta en el medidor seguido de la inmersión en la muestra en la "línea de inmersión" 103. El sensor de prueba 102 puede ser cualquiera de los sensores de prueba descritos anteriormente.

Fig. 7 ilustra otro equipo de diagnóstico 110 configurado para el análisis de múltiples analitos que pueden dosificarse con una muestra única, como, sangre de un dedo. La muestra puede analizarse para la presencia y/o cantidad de muchos analitos diferentes.

Fig. 8 ilustra un equipo de diagnóstico 120 con un sensor de prueba 122 y un medidor 124 configurado para un ensayo único que puede dosificarse con una pipeta.

Fig. 9 ilustra un equipo de diagnóstico 130 que incluye un sensor de prueba 132 y un medidor 134 configurado para análisis de múltiples analitos. El sensor de prueba 132 está montado de manera fija en una pared de una cámara de recogida de muestras 136. El conector 133 realiza la conexión eléctrica a los contactos del sensor de prueba 132. En el equipo de diagnóstico ilustrado el sensor de prueba 132 está unido a la tapa 138 de una copa. Estos proporciona ventajas particulares que permiten la recogida de una muestra. La cámara de recogida puede sellarse entonces y almacenarse o conservarse si se desea. Además, la conexión del conector 133 abre un sello entre el puerto de aplicación de muestras y la cámara de recogida. La muestra puede analizarse inmediatamente tras la recogida o más tarde.

Preferiblemente, un sensor de prueba puede montarse en otra pared de la cámara de recogida 136. Preferiblemente el sensor de prueba 132 esta montado de forma desmontable en la cámara de recogida 136.

Fig. 10 es una vista parcial en sección transversal de una matriz de microelectrodos 160 que ilustra las condiciones de la corriente en estado estacionario. La matriz de microelectrodos parcial 160 incluye dos cátodos o electrodos de reducción 161 y 163 y un ánodo o electrodos de oxidación 162. El mediator, M, está alternativamente reducido en el electrodo cátodo 161 (o 163) y oxidado en el electrodo ánodo 162. El hueco entre el electrodo cátodo 161 y el electrodo ánodo 162 representado por la línea de referencia 166 puede seleccionarse para mantener una corriente en estado estacionario y, en consecuencia, permite la amplificación de señal tal como se ha discutido más en detalle posteriormente. Como se señaló anteriormente, la estructura de electrodo incluye un electrodo de referencia y al menos un primer y segundo electrodos de trabajo dimensionados para permitir el reciclaje difusional del conjugado rédox reversible en la muestra cuando un potencial predeterminado se aplica al electrodo de trabajo. Unas dimensiones más pequeñas de las amplitudes de los dedos W y los huecos Wg aumentan el reciclaje rédox, pero el aumento de la longitud y número de pares de electrodos es también deseable para una amplificación efectiva de corriente. El hueco representado por la línea de referencia 166 puede seleccionarse como se desea considerando el analito of interés y su concentración o predicción de la concentración en la muestra. Normalmente el hueco entre los electrodos adyacentes se selecciona para ser inferior de alrededor 25 μm , preferiblemente inferior de alrededor 10 μm , más preferiblemente inferior de alrededor 2 μm . En los casos en los que se necesita sensibilidades muy bajas, son deseables huecos inferiores a una micra.

Fig. 11 es una vista en plano de una matriz de electrodos interdigitados (MEID) 170. La MEID 170 está ilustrada como una estructura planar de electrodos adecuados para la medición de reciclaje rédox con un bipotenciostato. La MEID 170 incluye dos electrodos de trabajo 172 y 174 (dibujados) que definen seis pares de dedos de electrodos 176. También se incluye en la MEID 170 un electrodo de referencia 178 y un electrodo contador 180. El hueco entre los dos dedos adyacentes representados por 166 de la Fig. 10 y el número total de dedos puede seleccionarse de MEID 170 como se desee para un analito de aplicación particular. Preferiblemente, es deseable producir MEID con más pares de electrodos que los que se muestran en la MEID 170. Por ejemplo, para lograr la amplificación adecuada es más deseable tener al menos 25 pares de electrodos, más preferiblemente al menos 50 pares de electrodos o 750 pares de electrodos, y mejor aún más de 1000 pares de electrodos. La amplificación aumenta con la disminución de la amplitud y el hueco y aumentando la longitud y el número de pares de dedos. Cada una de las estructuras de electrodos en MEID 170 están dimensionadas para permitir el reciclaje difusional de un mediador rédox reversible difundible en la muestra cuando los electrodos 172 y 174 están a punto de potenciales predeterminados anódicos (oxidación) y catódicos (reducción).

Las matrices de microelectrodos pueden fabricarse utilizando una serie de tecnologías que incluye pero que no se limita a fotolitografía, litografía con haz de electrones, molienda mediante haz de iones, litografía por nanoimpresión, y técnicas de ablación láser descritas en WO 03/044511, que se incorpora por referencia. La matriz de electrodos interdigitados (MEID) puede depositarse en una serie de sustratos aislantes que no se limita a: vidrio, silicio, Upilex, Kapton, Kaladex, Melinex, o otros sustratos poliméricos.

Las mejoras en la construcción de medidores y el diseño de sistemas de biosensor se describen en las Patentes de EE.UU. N° 4.999.632; 5.243.516; 5.366.609; 5.120.420; 5.141.868; 5.192.415; 5.264.103; 5.352.351; 5.405.511; 5.437.999; 5.438.271; y 5.575.895.

5 El tamaño (o área de la superficie) y el número de pares de electrodo puede seleccionarse dependiendo del analito, su concentración, y el medio de la muestra entre otros factores. Además, la presente invención describe una construcción empírica para seleccionar el tamaño y / o número de pares de dedos de electrodo para un conjunto dado de condiciones. La construcción se describe más completamente más adelante.

10 Preferiblemente, los componentes de la matriz 170 puede dimensionarse para proporcionar una macromatriz de electrodos. Las dimensiones del electrodo y el hueco entre los electrodos para la macromatriz puede variar significativamente y puede limitarse solamente al tamaño del sensor de prueba y al volumen de muestra disponible.

Matriz vertical de electrodos interdigitados MVEID

15 La figura. 12 es una vista lateral de una matriz vertical de electrodos interdigitados (MVEID) 190. La figura. 13 es una vista en planta superior de la matriz 190. La matriz 190 incluye una base o sustrato aislante 192 sobre el que se deposita un material conductor eléctricamente como primera capa conductora 194 para proporcionar un primer electrodo 195. Una capa dieléctrica aislante 196 se deposita sobre la capa conductora 194 y el sustrato 192. Un segundo material conductor 193 se deposita en la parte superior de la capa dieléctrica 196. Una segunda capa dieléctrica (no mostrada) se deposita a continuación formando un patrón sobre el segundo material conductor 193 para definir una serie de dedos no conductores (no mostrados). El segundo material conductor expuesto se retira seguido por la eliminación de la capa dieléctrica expuesta. Esto deja al descubierto el segundo conjunto de dedos de electrodos 193 depositados en la parte superior del dedo no conductor 196 y que forma un patrón para definir una serie de dedos de electrodo 198.

20 El hueco de electrodos de una MVEID está definida por el espesor del aislante dieléctrico 196 que queda entre las capas conductoras, así pueden producirse huecos del tamaño de una micra o inferiores utilizando técnicas estándar que no son capaces de una resolución por debajo de la micra. Esto puede lograrse gracias al hueco del dedo de la MVEID o el tamaño no depende de estos límites de las técnicas de patrón pero sí que depende del espesor fino (o grueso) del aislante dieléctrico que se aplica.

25 Preferiblemente el hueco se selecciona para ser inferior a 1 μm . Preferiblemente la amplitud de hueco deseado se selecciona para ser entre 1 μm y 3 μm .

30 Las paredes laterales 202 y 204 y la placa superior o techo 206 pueden fabricarse sobre la matriz vertical de electrodos para definir una cámara de detección 208. El volumen total de la cámara de detección 208 puede seleccionarse como se desee y está solamente limitada al tamaño deseado del sensor de prueba y el número de cámaras de detección formadas sobre la tira.

35 La MVEID 190 proporciona ventajas adicionales sobre las proporcionadas por las MEID descritas anteriormente, incluyendo una mayor densidad de pares de electrodos por unidad de superficie de área. En consecuencia, pueden fabricarse cámaras más pequeñas que contienen el mismo número de pares de electrodos, teniendo cada electrodo la misma área de superficie que la MEID plana. Además, un sensor de prueba puede incluir un mayor número de MVEID como un sensor de prueba que incluye solamente MEID, de nuevo en el que el área de superficie de los dos sensores de prueba son los mismos y las cámaras contienen cada una el mismo número y tamaño de pares de electrodos. Esto puede proporcionar mejoras importantes en los sensores de pruebas, que están configurados para detectar/analizar de forma simultánea una serie de diferentes analitos.

40 En la Fig. 12 se ilustra una MVEID, la capa dieléctrica 196 está libre de agujeros en las regiones entre los dos electrodo de trabajos. Normalmente el diseño de la MVEID implica la fabricación de un metal-dieléctrico-metal sobre un sustrato rígido o flexible. La integridad de la capa dieléctrica es crítica para la función electroquímica del dispositivo. La rotura de la capa dieléctrica interna conducirá a un cortocircuito a un dispositivo no funcional. Los aislantes pueden depositarse mediante diferentes procesos que incluye la pulverización y recubrimiento por rotación. Una técnica de grabado en seco puede utilizarse para eliminar la capa aislante en las regiones deseadas por debajo de la primera capa conductora. El proceso de construir MVEID no está limitado por el procedimiento anteriormente mencionado que está incluido solo como ejemplo.

Constantes de celdas

50 La resistividad de la solución es una propiedad intrínseca de una solución determinada por las concentraciones combinadas y las movilidades de todos los iones disueltos en un sistema. Esta resistividad (ρ) en Ohm x cm de una muestra se verá influida por la matriz de muestras y los reactivos que mezclan la muestra incluyendo los marcajes electroquímicos, tampones, sales, y anticuerpos por nombrar algunos ejemplos.

55 Cuando se aplica un campo eléctrico entre dos electrodos en la celda, los iones se mueven hacia la doble capa en las interfaces de los electrodos con carga suficiente para oponerse y finalmente cancelar el campo aplicado. La carga de la doble capa se comporta como un condensador en serie con la resistencia de la solución. La resistencia

de la solución medida tendrá una resistencia en serie adicional constante debido al contacto con la resistencia intrínseca y la resistencia del material del electrodo. La resistencia de alta frecuencia se mide en una célula electroquímica que es proporcional a la resistividad intrínseca de la solución ρ y la constante de proporcionalidad se denomina "constante de celda". La resistencia de alta frecuencia se puede definir como un rango de frecuencias donde las propiedades reactivas (capacitivas) de la célula electroquímica pueden ignorarse con seguridad.

La constante de celda es un factor importante en la sensibilidad de la celda a los cambios en la resistividad de la solución, y varía ampliamente con la configuración del electrodo. La geometría de interés de esta invención es una matriz de electrodos interdigitados (MEID). Aquí, una serie de pares de ánodos y cátodos coplanar se intercalan o interdigitan alternativamente y de forma repetida para formar una matriz mayor de electrodos interdigitados. Para una matriz de electrodos interdigitados, la resistencia de alta frecuencia está relacionada con la resistividad de la solución mediante la Ecuación 1.

$$R = \frac{\rho}{mbG} \quad (1)$$

La constante de celda para una MEID está definida por lo tanto por la Ecuación 2, en la que m es el número de microbandas de pares de electrodos de la MEID, b es la longitud de las bandas en cm, y G es una función adimensional del ancho de la geometría del dedo de electrodo (W) y hueco (W_g). G puede aproximarse por la expresión definida por la Ecuación 3. La constante de celda es un parámetro útil de una configuración de electrodo que puede calcularse y medirse. La constante de celda de una célula electroquímica de una MEID dependes de su arquitectura, especialmente de la geometría del electrodo, aunque en algunos casos el límite superior de la celda (altura del capilar) puede también tener un papel. La estimación de la constante de celda para una MEID deriva de las ecuaciones y el trabajo de Aoki y otros, pero solo es una función del número de pares de electrodos de la MEID y de sus dimensiones. Por lo tanto, la constante de celda es un valor único que puede utilizarse para comparar varias geometrías de electrodo. Los electrodos con las mismas constantes de celda tendrán características similares en la aplicación de los electrodos descritos aquí.

$$\text{Const. Celda} = \frac{1}{mbG} \quad (2)$$

La G puede estimarse en un MEID a partir de la aproximación de la Ecuación 3 de Aoki.

$$G = \left[\frac{2}{\pi} \ln \left(2.55 \left(1 + \frac{W}{W_g} \right) \right) - 0.19 \left(\frac{W_g}{W + W_g} \right)^2 \right] \quad (3)$$

en la que W_g es la amplitud del hueco entre las bandas de electrodos de trabajo y contador adyacentes y W es la amplitud de cada microbanda de (dedo de electrodo). La aproximación del modelo asume que no hay efectos de borde de matriz, lo que significa que la célula electroquímica, que contienen la matriz y el electrolito, es suficientemente grande para no distorsionar el campo eléctrico en los bordes de la celda (es decir, la MEID debe tener suficientes dedos para prevenir la falta de un vecino para el primer y último dedo como para alterar significativamente la corriente). El modelo también asume que la microbanda de dedos de electrodos ánodo y cátodo tienen la misma amplitud. $W_g/(W+W_g)$ varía entre 0,1 y 0,9, G varía de alrededor de 2,5 a alrededor de 0,5. Cuando $W = W_g$, $W_g/(W+W_g) = 0,5$ y G es alrededor de 1.

Han aparecido muchos artículos en la literatura de Koichi Aoki y otros para entender mejor el modelo y predecir las respuestas en las matrices de electrodos interdigitados. Las siguientes publicaciones son una muestra de la cantidad de discusiones y cálculos matemáticos que se han publicado en la materia: "Theory of chronoamperometric curves at microband electrodes", J. Electroanal. Chem., 225 (1987) 19-32; "Derivation of an approximate equation for

5 chronoamperometric curves at microband electrodes and its experimental verification", J. Electroanal. Chem 230 (1987) 61-67; "Quantitative analysis of reversible diffusion-controlled currents of redox soluble species at interdigitated array electrodes under estado estacionario conditions", J. Electroanal. Chem., 256 (1988) 269-282; "Time-dependence of diffusion-controlled currents of a soluble redox couple at interdigitated microarray" J. Electroanal. Chem., (1989) 11-20; y "Approximate models of interdigitated array electrodes for evaluating steady-state currents", J. Electroanal. Chem 284 (1990) 35-42.

10 La ecuación 4 también deriva de la bibliografía anteriormente mencionada y se utiliza para evaluar las corrientes controladas por difusión reversible de los mediadores redox solubles sobre las MEID bajo condiciones de estado estacionario. Esta ecuación se utiliza para predecir la pendiente de las MEID y MVEID de la Fig. 15. En esta ecuación, m es el número de microbandas de pares de electrodos de MEID, b es la longitud de la banda en cm, n es el número de electrones implicados en la reacción redox, F es la constante de Faraday [9.65E+04C/equiv], c es la concentración bruta de la molécula redox, D la constante de difusión de la molécula redox [Para el mediador libre de osmio, 5E-06cm²/seg.], W es la amplitud de la microbanda de electrodos (ánodo o cátodo) en cm en la que W_a = W_c, y W_g es el hueco entre los correspondientes electrodos de ánodo y cátodo.

$$|I| = mbnFcD \left[\frac{2}{\pi} \ln \left(2.55 \left(1 + \frac{W}{W_g} \right) \right) - 0.19 \left(\frac{W_g}{W + W_g} \right)^2 \right] \quad (4)$$

15 Uno se dará cuenta que existe una relación entre esta ecuación para predecir la corriente en estado estacionario, G, y la constante de celda. La expresión de la corriente en estado estacionario puede reescribirse como $|I| = mbnFcDG$. La reorganización de la expresión conduce a la siguiente relación con la constante de celda (Ecuación 5 siguiente). Esto implica que la corriente DC en estado estacionario es inversamente proporcional a la constante de celda de la MEID. Las constantes de celda más pequeñas proporcionarán una corriente DC en estado estacionario proporcionalmente superior para una concentración determinada y coeficiente de difusión. Las constantes de celda más pequeñas también producen transiciones más rápidas a las condiciones de DC en estado estacionario.

$$Const. Celda = \frac{1}{mbG} = \frac{nFcD}{|I|} \quad (5)$$

25 La ecuación 4 para la corriente en estado estacionario puede normalizarse a una unidad de área al dividir la corriente predicha mediante el área de interdigitación de la MEID (Área=2(W+W_g)mb100). La ecuación 6 muestra la ecuación utilizada para calcular la pendiente predicha normalizada en la Fig. 15. La corriente se multiplica por 10⁹ para convertir a nA y el área se multiplica por 100 para convertir de cm² a mm².

$$\frac{I}{Area} = \frac{mbnFcDc10^9}{2(W+W_g)mb100} \left[\frac{2}{\pi} \ln \left(2.55 \left(1 + \frac{W}{W_g} \right) \right) - 0.19 \left(\frac{W_g}{W + W_g} \right)^2 \right] \quad (6)$$

30 La Fig. 15 proporciona la Tabla 3 que lista varias MEID y MVEID preparadas. Se analiza la geometría del electrodo para cada electrodo. Las ecuaciones 4 y 6 discutidas anteriormente se utilizan para modelar los electrodos específicos en términos de pendiente predicha normalizada y predicha. Además, los valores experimentales se muestran a partir de un VC de reciclaje y las curvas de respuesta a dosis de un bipotenciostato amperométrico realizadas con un bipotenciostato CHI 802A o CHI 832A de CHI Instruments, Austin, Texas. La Tabla 4 muestra la constante de celda para cuatro de estos electrodos, pero utilizando la Ecuación 2 la puede calcularse constante de celda para cada electrodo mostrado en la Fig. 15 incluyendo las MVEID.

35 Además de utilizar las ecuaciones para comparar los valores predichos vs. experimentales, las ecuaciones 2, 4, y 6 se utilizaron también como herramienta para diseñar electrodos de dimensiones adecuadas para poder lograr electrodos que alcancen la respuesta deseada en inmunoensayos específicos. Para poder utilizar las ecuaciones

como herramienta de diseño, se asumió que alrededor de 0,5-1 nA será el extremo inferior de sensibilidad de detección para un instrumento bipotenciostato de producción en masa. Un prototipo de módulo que cumple estos criterios se diseñó y se construyó para conectarse a un Visor PDA Handsprings. La MEID planar con un dedo de 2 μm de amplitud y un hueco de 750 pares por microbanda cada uno de 6 mm de longitud se lista en la Tabla 3 de la Fig. 15 se diseñó y construyó para mejorar las sensibilidades de detección a alrededor de 5 nM en el caso ideal (1000 nM /215 nA= 4.65 nM/nA). Este diseño de MEID de 2 μm logró una mejora significativa de la amplificación si se compara con electrodos con huecos de 10, 15, y 21 μm tal como se muestra en la Fig. 16. Si se asume una resolución de 1 nA y la pendiente medida de 152 nA/ μM , la sensibilidad será de alrededor de 7 nM.

Fig. 49 es una gráfica obtenida de un ensayo de biotina osmio preparado utilizando el dedo de 750 anteriormente mencionado, MEID 2 μm . El ensayo se configuró para la medición de analitos hasta alrededor de 1000 nM basado en la concentración de osmio biotina. El nivel más bajo analizado con este ensayo fue de 250 nM que se puede distinguir con facilidad. Si se extrapola la sensibilidad a una resolución de 1 nA se proporciona un ensayo con una sensibilidad de alrededor 20 nM.

La representación tri-dimensional que se muestra en la Fig. 14 muestra la corriente normalizada vs. las dimensiones de electrodo para una serie de MEID planar de W y W_g variado. La Fig. 14 muestra que aún MEID con espacios de μm , se pueden hacer mejoras significativas en las corrientes normalizadas al disminuir W y W_g

Fig. 16 es una gráfica que representa la corriente (en nA) medida sobre diferentes MEID utilizando el mediador libre de osmio (dicloruro de bis (2,2'-Bipiridil) Imidazol Cloro Osmio (III)). Las MEID se prepararon tal como se describe aquí y se incluye la estructura de electrodos con 50 pares de dedos cada uno con una amplitud (W) de alrededor de 21 μm y un hueco (W_g) de 10, 15, y 21 μm . Otra estructura de electrodo posee 750 pares de dedos cada uno con $W = W_g = 2\mu\text{m}$. Todos los electrodos poseen una longitud de dedo (b) de 6 mm. Esta representación ilustra la magnitud de la amplificación de MEID que se analiza sobre diferentes configuraciones de MEID. Una característica de las MEID de la presente invención es que pueden fabricarse grandes áreas de electrodo (36 mm²) y gran número de dedos (750 pares) y utilizarse para inmunoensayos electroquímicos. A partir de las gráficas y ecuaciones se observó que al disminuir W y W_g y aumentar el número de dedos, todo puede contribuir a aumentar la corriente medible sobre un MEID. La Fig. 16 también ilustra la corriente particularmente pequeña obtenida de un MEID cuando no existe un reciclaje redox.

La "Constante de celda" es un valor útil que puede calcularse y medirse en una configuración particular de electrodo. Las características de dos electrodos con las mismas constantes de celdas funcionará de forma similar en la aplicación de electrodos y puede utilizarse para comparar varias configuraciones de electrodos. Los electrodos de interés son electrodos con una constante de celda igual o inferior a aquellos utilizados para realizar los inmunoensayos electroquímicos homogéneos descritos aquí tal como se muestra en la Tabla 4. Preferiblemente la constante de celda d la MEID para los electrodos descritos aquí es inferior a alrededor de 0,03 cm⁻¹ para analitos en altas concentraciones como teofilina, aún más preferible será la estructura de electrodos con una constante de celda inferior a alrededor de 0,02 cm⁻¹, y lo más preferible inferior a alrededor de 0,002 cm⁻¹. Las MEID cuyas constantes de celda son inferiores a alrededor de 0,0025 cm⁻¹ proporcionan un buen reciclaje redox y amplificación con los conjugados de mediador electroquímico de osmio discutidos aquí para inmunoensayos electroquímicos homogéneos. La Tabla 4 a continuación lista las constantes de celda para los electrodos descritos aquí junto con las constantes de celda de algunas de las MEID típicas que se han descrito y estudiado para varias medidas electroquímicas. Es evidente a partir de la tabla que los electrodos que son preferibles poseen constantes de celda más pequeñas que aquellas comúnmente descritas en la literatura aunque no necesariamente huecos de electrodo y amplitudes más pequeñas. Aunque la mayoría de investigadores se decantan hacia MEID con amplitudes y huecos espaciados más estrechamente, tienen también a menudo la longitud del dedo reducido significativamente y así las células de electrodo son mucho más pequeñas en dimensiones generales. De este modo, las constantes de celdas más pequeñas deseables no se han construido.

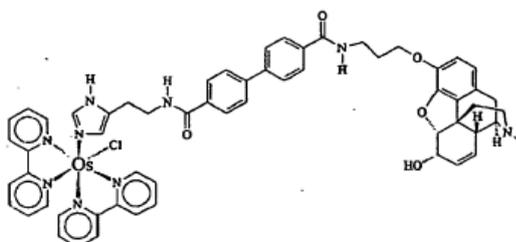
Las técnicas como la litografía por haz de electrones se utiliza cada vez con más frecuencia para producir MEID de pequeñas características. En este momento, esta técnica no es adecuada para sensores de gran volumen, desechables de bajo coste. Los electrodos preferibles se diseñan para lograr la señal de amplificación necesaria basada en la sensibilidad del inmunoensayo necesario. Los electrodos que son adecuados para carretes de procesamiento de alta velocidad como las técnicas de fotolitografía estándar y la ablación láser son las más preferibles para los sensores de inmunoensayo desechables. Los diseños que minimizan las constantes de celda, no necesariamente las características de electrodo más pequeñas, son los diseños de electrodo preferibles. Las características de electrodo pequeñas son deseables si las constantes de celda son también pequeñas que pueden lograrse al ajustar la longitud y/o número de dedos de MEID.

Tabla 4

Estructura de electrodos descritas en esta invención o citadas en la bibliografía.	m = pares de microbandas de electrodos	W = amplitud de electrodo (μm)	W _g = hueco de electrodo (μm)	b = longitud de banda (cm)	Constante de celda (cm^{-1})
Electrodos inmunosensores descritos por esta invención	750	2	2	0,6	0,0022
	150	5	5	0,3	0,0215
	50	21	10	0,6	0,0254
	50	21	15	0,6	0,0290
	50	21	21	0,6	0,0323
J. Electroanal. Chem., 256 (1988) 269-282	25	10	5	0,2	0,1546
	50	5	5	0,2	0,0970
	50	3	5	0,2	0,1132
	25	10	2	0,2	0,1152
	50	5	2	0,2	0,0718
	50	3	2	0,2	0,0850
Analytica Chimica Acta 305 (1995) 126-136	70	3	1	0,09	0,1074
	35	1,5	0,7	0,09	0,2399
	35	1,5	0,5	0,09	0,2148
	35	1,5	0,3	0,09	0,1828
	224	1	0,5	0,09	0,0383

Amplificación enzimática

5 Como alternativa a la amplificación de la MEID, los inmunoensayos electroquímicos homogéneos pueden también desarrollarse con amplificación enzimática. Para algunos antígenos, la amplificación enzimática fue el método preferible ya que el reciclaje redox del mediador preparado no recicla de forma adecuada con el conjugado. Un ejemplo fue con un conjugado osmio morfina mostrado más abajo.



10 Muchos ejemplos de ensayos enzimáticos se han desarrollado incluidos: cocaína, morfina, THC, y biotina. La premisa para la amplificación enzimática es que el marcaje de mediador electroquímico está reducido por la enzima y se oxida en la superficie de electrodo. Ya que las enzimas son muy eficientes, este método compite bien con las técnicas de amplificación de MEID y es aplicable a muchos ensayos. Existe, no obstante, varias desventajas con la amplificación enzimática que incluye la capacidad de amplificar fuentes de ruido como sustancias interferentes. La adición de enzima al dispositivo también requiere de reactivos adicionales para asegurar la estabilidad enzimática.

15 Además, uno debe también equilibrar el pH preferible de la enzima vs. anticuerpo. Las ventajas incluye una

estructura de electrodos más simple similar a la utilizada en los sensores de glucosa.

Esquemas de ensayo

5 Se describen varios esquemas de ensayo a continuación. Todos estos esquemas requieren que los reactivos estén secos en una o más regiones del sensor de prueba. Para que los ensayos puedan ser viables, es necesaria una rápida solubilidad de los reactivos con la adición de la muestra. Por esta razón, es altamente deseable que los
 10 marcajes electroquímicos, las parejas de unión, y otros reactivos de apoyo se solubilizan en la muestra matriz. Por esta razón, los conjugados de antígenos hidrofóbicos requerirán a menudo el uso de enlazantes hidrofílicos para mejorar la solubilidad del reactivo como el osmio-PEG-THC-2 (compuesto 37) y PEG-metotrexato (compuesto 38). Además, la naturaleza hidrofóbica del antígeno en sí en la muestra y en el conjugado es también una preocupación para las uniones inespecíficas y las interacciones hidrofóbicas que pueden conducir a una respuesta de conjugado reducida y el ensayo resulta debido a menos antígeno disponible para la unión. Los conjugados de los antígenos hidrofóbicos pueden también agregarse o formar micelas ya que son hidrofílicos en uno de sus extremos e hidrofóbicos en el otro. El ensuciamiento o contaminación de los electrodos que inhibe la electroquímica es también una preocupación. La utilización de hidroxipropil- β -ciclodextrina añadida a los reactivos ha demostrado mejorar enormemente los ensayos con estas preocupaciones permitiendo posiblemente que la porción hidrofóbica vaya dentro de la cavidad de la ciclodextrina. Se ha visto también que la utilización de hidroxipropil- β -ciclodextrina no parece inhibir los eventos de unión.

20 Pueden utilizarse muchos esquemas de ensayo. Los esquemas incluyen ambos métodos de inmunoensayo homogéneos y heterogéneos. El método preferible es el inmunoensayo homogéneo competitivo que permite la medición directa de conjugados mediadores no unidos sin la separación del conjugado mediador unido. Así el inmunoensayo puede llevarse a cabo en una mezcla de reacción. Los inmunoensayos heterogéneos, que no se discutirán en detalle, requieren la utilización de un paso de separación para separar los conjugados mediadores unidos del marcaje libre.

25 Los inmunoensayos homogéneos pueden adaptarse más fácilmente a un dispositivo "punto de atención" o "en el campo" descrito aquí. Se han utilizado dos tipos de ensayos de unión competitivos. El primer ensayo de unión competitivo es un ensayo de desplazamiento en el que el antígeno marcado con mediador está preunido al anticuerpo (u otra pareja de unión). Entonces con la adición de antígeno bajo condiciones de no equilibrio, el antígeno marcado con mediador está desplazado. El ensayo puede medir entonces la cantidad de marcaje con mediador no unido y correlacionarlo con la concentración de analito. El segundo ensayo de unión competitivo es uno en el que el antígeno se pone primero en contacto con exceso de anticuerpo (u otra pareja de unión) seguido de la adición del antígeno marcado con mediador que se une al anticuerpo restante (u otra pareja de unión). Igual que con el ensayo de desplazamiento, el ensayo puede medir la cantidad de marcaje con mediador no unido y correlacionarlo con la concentración de analito.

35 La actividad específica del antígeno marcado con mediador electroquímico está modulada de acuerdo con la concentración de analito en la muestra. La corriente resultante será una función de la cantidad de analito presente.

40 Fig. 17 ilustra un sensor de prueba de inmunoensayo electroquímico homogéneo competitivo que utiliza unión secuencial. La figura ilustra un sensor de prueba capilar en el que se localizan diferentes reactivos y la estructura de electrodo. Los reactivos (anticuerpo y conjugado) están secos en una matriz soluble en locaciones por encima de la zona de medición. La zona de medición también incluye el área de electrodo activa. La muestra que puede contener antígeno se aplica a un puerto de aplicación de muestra en un volumen suficiente para rellenar el capilar. A medida que la muestra llena el capilar y disuelve los reactivos, tienen lugar varios eventos de unión. Cuando la muestra y los reactivos alcanzan la zona de medición, el conjugado mediador no unido puede medirse. Pueden preverse diferentes variaciones del sistema básico. Preferiblemente, los reactivos se mezclan juntos y se secan en la zona de medición ya sea sobre la superficie del electrodo activa o sobre otra superficie de la zona de medición. En esta configuración, no son necesarias cámaras o regiones adicionales.

45 Los inmunoensayos electroquímicos homogéneos ilustrados están basados en la afinidad específica entre antígenos y anticuerpos. El antígeno de interés (por ejemplo fármaco, péptido, o biotina) está marcado con un mediador redox electroactivo para proporcionar el antígeno marcado con mediador reversible redox (conjugado mediador). La muestra a analizar se mezcla con un exceso predeterminado de anticuerpo al antígeno de interés. Si el antígeno está presente en la muestra, sucede la unión de antígeno y anticuerpo. La mezcla resultante de antígeno-anticuerpo unido y el exceso de anticuerpo no unido se combina entonces con el antígeno marcado con mediador reversible redox. El anticuerpo no unido se une al antígeno de los conjugados redox reversibles para formar un complejo de unión. La mezcla resultante contiene el conjugado redox reversible no unido, y el conjugado unido. El reciclaje redox del conjugado unido está inhibido por la unión de la pareja de unión de gran peso molecular. Una cantidad predeterminada del anticuerpo específico del antígeno de interés está combinada con la muestra, y posteriormente, se añade a una cantidad predeterminada del conjugado redox reversible. Al aplicar un potencial seleccionado para inducir al marcaje redox reversible no unido un reciclaje redox en los electrodos genera una corriente, que puede medirse y correlacionarse con la concentración de analito.

La ilustración anterior está basada en la afinidad específica entre antígenos y anticuerpos. Se entenderá que

cualquier analito de interés y su pareja de unión específica pueden utilizarse en lugar de la combinación antígeno/anticuerpo.

5 Es también posible combinar las cantidades predeterminadas de anticuerpo con el conjugado rédox reversible para formar los correspondientes complejos antes de combinar estos componentes con la muestra de líquido. En este último caso, el conjugado rédox reversible se verá desplazado de sus correspondientes anticuerpos mediante el correspondiente antígeno para proporcionar una concentración de los conjugados rédox reversible proporcional a la concentración de antígeno en la muestra de líquido.

10 Los reactivos, esto es, las cantidades predeterminadas de anticuerpo para el antígeno y las cantidades predeterminadas de los correspondientes conjugado rédox reversible puede, por ejemplo, depositarse en un recipiente para recibir un volumen predeterminado de la muestra de líquido. La muestra de líquido se añade al recipiente, y posteriormente, o a la vez, la muestra de líquido se pone en contacto con la estructura de electrodo.

15 Dos formatos de inmunoensayo homogéneos pueden ponerse a punto para los ensayos: desplazamiento y, unión secuencial. Ambos ensayos detectan electroquímicamente la cantidad de conjugado libre (no unido) al final de la secuencia de ensayo. La matriz de electrodos interdigitados (MEID) o enzimas se utilizan para amplificar la señal de corriente a través del reciclaje rédox del marcaje mediador. La corriente medida debido al reciclaje rédox es proporcional a la cantidad de conjugado libre (no unido) y aumenta con la concentración de analito. En el caso de amplificación de la MEID, se obtiene una respuesta de estado estacionario en cuestión de segundos tras aplicar la muestra y los potenciales rédox adecuados al primer y segundo electrodos de trabajo mediante un bipotenciostato.

20 El reciclaje con un bipotenciostato resultará en dos mediciones que son iguales en magnitud pero de signo opuesto. Esto proporciona ventajas distintivas en la determinación de si hay un efecto interferente debido a un reciclaje no interferente que causaría una desviación del valor esperado. Normalmente cuando están presentes los interferentes en bajas concentraciones pero suficientes y cuando no sean objeto de reciclaje rédox, los interferentes potenciales no están presentes en la corriente final en estado estacionario después de un corto período de tiempo. Los interferentes no reciclados en una concentración de 10 a 100 veces la concentración del analito deseado todavía pueden ser despreciables cuando se utilicen mediciones rédox de reciclado ya que el interferente no se recicla. Los interferentes a una concentración significativamente más alta, es decir como es posible con el ácido ascórbico en la orina, puede mostrar un gran aumento en la respuesta de oxidación y una pequeña disminución en la respuesta de reducción del resultado esperado. Se espera que mediante el uso tanto de la respuesta de oxidación y reducción, el analito de interés puede corregirse mediante cálculos matemáticos.

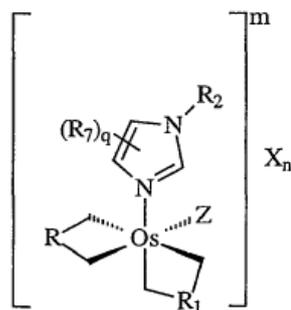
30 Las concentraciones de ácido ascórbico (Vitamina C) en las muestras biológicas pueden variar dramáticamente. En muestras de orina aleatorias, la concentración puede estar en un rango entre 60-400 μM . En plasma el rango es de 34-91 μM y en sangre completa 40-114 μM . El ácido ascórbico es un agente reductor fuerte, así se oxida fácilmente y puede ser una fuente de interferencia electroquímica con pruebas clínicas.

35 En un estudio, el efecto del ácido ascórbico se estudió en una MEID de 21 μm utilizando mediador libre de osmio a 1, 5, y 10 μM . El ácido ascórbico varió a 100, 200, y 400 μM . Las mediciones se realizaron utilizando un bipotenciostato CHI 832A con $\text{WE1}=250\text{ mV}$, $\text{WE2} = 0\text{ mV}$. La muestra de 100 μM mostró una pequeña desviación desde el control pero a 200 y 400 μM muestra seriamente las propiedades reductoras del ácido ascórbico. En comparación con el control, las muestras de 200 y 400 μM , las corrientes de oxidación aumentaron enormemente y las corrientes de reducción disminuyeron. Para la oxidación, se observó un aumento en la pendiente de la respuesta OSFM así como un aumento en el intercepto Y. Para la reducción se observó la tendencia opuesta, una disminución en la pendiente y una disminución en el intercepto Y. Se espera que el reciclaje rápido de MEID (electrodos con W y W_g más pequeños) tendrá menos interferencias a partir de interferentes de reciclaje no rédox.

Tratamiento de muestras

45 El método puede llevarse a cabo sobre muestras líquidas que comprenden fluidos biológicos como saliva, orina, o sangre, o la muestra de líquido puede provenir de fuentes ambientales. La muestra de líquidos puede analizarse tal cual o preprocesarse diluida con una solución tamponada, concentrada o procesada de otra manera para optimizar la detección del analito. Así, por ejemplo, las muestras de sangre pueden lisarse y/o desnaturalizarse de otra manera para solubilizar los componentes celulares. En otro ejemplo las muestras de orina pueden mezclarse con una cantidad predeterminada de ascorbato oxidasa. También puede añadirse hidroxipropil- β -ciclodextrina a las muestras que contienen un analito de naturaleza hidrofóbica para minimizar la unión inespecífica del analito a la superficie de los contenedores de recogida de muestras, reactivos, o zona de mediciones. El método puede realizarse utilizando variantes de técnicas de manejo de muestras.

55 La presente invención incluye al menos un marcaje electroquímico para cada analito a detectar y/o analizar. Ejemplos ilustrativos de un marcaje electroquímico de osmio para utilizar en esta invención son los complejos del compuesto 1:

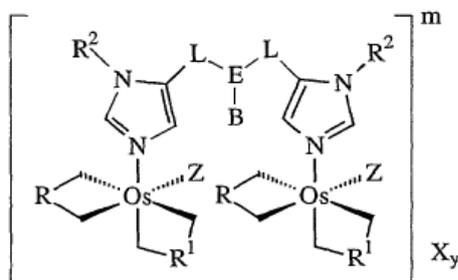


Compuesto 1

5 en el que R y R1 son los mismos o diferentes y cada uno puede seleccionarse entre: 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 1,10-fenantrolinilo, 4,7-disustituido-1,10-fenantrolinilo, o 5,6-disustituido-1,10-fenantrolinilo, en el que cada sustituyente es un grupo metilo, etilo, o fenilo, y en el que los grupos R y R1 están coordinados con Os a través de sus átomos de nitrógeno; q es 1 o 0; R7 es B-(L)k-Q(CH2)i; R2 es hidrógeno, metilo, o etilo cuando q es 1, y R2 es B-(L)k-Q(CH2)i - cuando q es 0; para el grupo B-(L)k-Q(CH2)i: Q es O, S, o NR4, en el que R4 es hidrógeno, metilo o etilo; --L--es un enlazante divalente; k es el número entero 1 o 0; i es un número entero 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y B un grupo que comprende un ligando capaz de unirse a una pareja de unión a analito específica; Z es cloro o bromo; m es +1 o +2; X es un contraión como un anión mono- o divalente, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro, fluoruro, tetrafluoroborato, perclorato, nitrato, sulfato, carbonato, o sulfito; y n se selecciona para proporcionar una sal neutra.

10

Un segundo ejemplo ilustrativo de un marcaje electroquímico de osmio para utilizar con la presente invención está representado por el Compuesto 2:

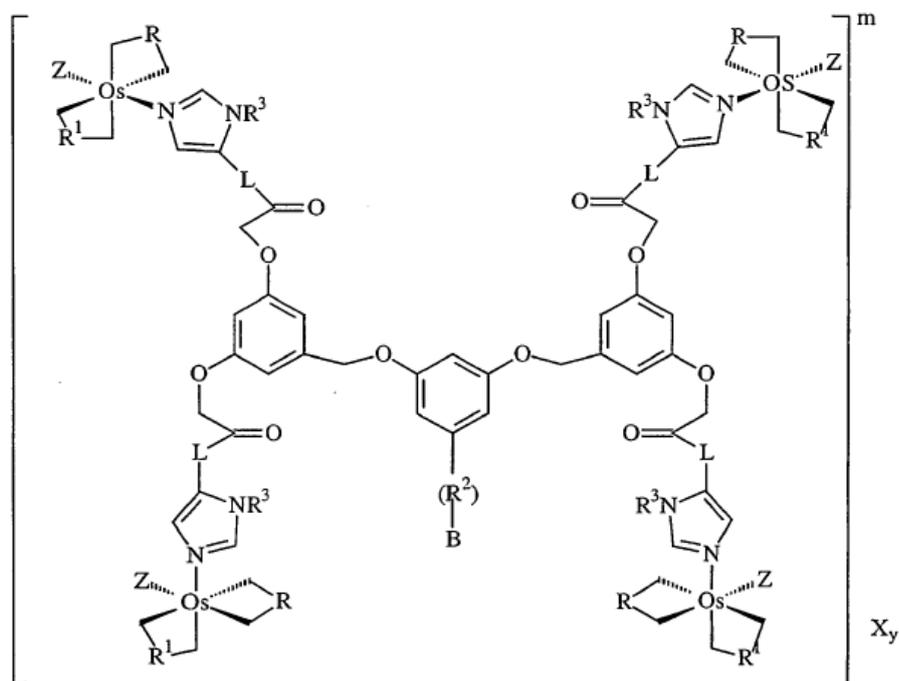


Compuesto 2

15 en el que R y R1 son los mismos o diferentes y cada uno puede seleccionarse entre: 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 1,10-fenantrolinilo, 4,7-disustituido-1,10-fenantrolinilo, 5,6-disustituido-1,10-fenantrolinilo, o N, N'-dimetil 2,2'-biimidazol, en el que cada sustituyente es un grupo metilo, etilo, o fenilo, y en el que los grupos R y R1 están coordinados con osmio a través de sus átomos de nitrógeno; R2 es hidrógeno, metilo, o etilo; --L--es un enlazante; E es un enlazante trivalente; B es un grupo que comprende un ligando capaz de unirse a una pareja de unión de analito específica; Z es cloro o bromo; X es un contraión; y y se selecciona para proporcionar una sal neutra; y m es de 2 a 4.

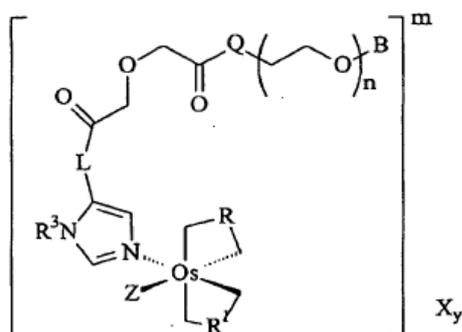
20

Un tercer ejemplo ilustrativo de un marcaje electroquímico de osmio para utilizar con la presente invención está representado por el Compuesto 3.



Compuesto 3

- 5 en el que, R y R1 son los mismos o diferentes y cada uno puede seleccionarse entre: 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 1,10-fenantrolinilo, 4,7-disustituido-1,10-fenantrolinilo, 5,6-disustituido-1,10-fenantrolinilo, o N, N'-dimetil 2, 2'-biimidazol, en el que cada sustituyente es un grupo metilo, etilo, o fenilo, y en el que los grupos R y R1 están coordinados con Os a través de sus átomos de nitrógeno, R2 es una cadena recta o ramificada, sustituida o sin sustituir, saturada o insaturada, de un grupo hidrocarbilo que posee de 1-10 átomos de carbono; -R3 es H, CH3 o C2H5; L es (CH2)_iQ en el que i es un número entero entre 1 y 10, y Q es O, S, o NR3; B es un grupo que comprende un ligando capaz de unirse a una pareja de unión de analito específica; X es un contraión; y se selecciona para proporcionar una sal neutra; y m es de 4 a 8.
- 10 Un cuarto ejemplo ilustrativo de un marcaje electroquímico de osmio está representado por el Compuesto 4 siguiente.



Compuesto 4

- 15 en el que, R y R1 son los mismos o diferentes y cada uno puede seleccionarse entre: 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 1,10-fenantrolinilo, 4,7-disustituido-1,10-fenantrolinilo, 5,6-disustituido-1,10-fenantrolinilo, o N, N'-dimetil 2-2'-biimidazol en el que cada sustituyente es un grupo metilo, etilo, o fenilo, y en el que los grupos R y R1 están coordinados con Os a través de sus átomos de nitrógeno; R3 es H, CH3 o C2H5; L es (CH2)_iQ, en el que i es un número entero de 1 a 10 y Q es O o NR3; B es un grupo que comprende un ligando capaz de unirse a una pareja de unión de analito específica; Z es cloro o bromo; X es un contraión; y se selecciona para proporcionar una sal neutra; y m es 1 o 2.
- 20

El precursor del compuesto 4 (en el que el sustituyente B está sustituido con A: -(CH2)_j-NR3, -(CH2)_j-SH, o un éster activado en el que j es un número entero entre 1 y 5) también está descrito por la presente invención.

Tal como se ha ilustrado anteriormente para los Compuestos 1, 2, y 3 los conjugado(s) de mediador de osmio cabe prever que comprende al menos dos y opcionalmente tres componentes. El conjugado de mediador de osmio puede incluir uno o más grupos osmio organometálicos, uno o más grupos de enlace, y un análogo de ligando. Las especies de osmio organometálicas en sí, ya sea como una sal libre o con un grupo neutral imidazol, es electroquímicamente detectable. El ligando diquelante en el centro de osmio, es decir, los ligandos bipyridilo y fenantrolinilo, pueden variar como se desee para proporcionar un conjugado que tiene las propiedades deseadas que incluye potencial rédox y solubilidad. Por ejemplo, para algunas muestras de fluido o analitos específicos será deseable emplear un conjugado de osmio que presente aumento de hidrofobicidad. Al variar los ligandos diquelantes de un ligando 2,2'-bipyridilo a un ligando 1,10-fenantrolinilo aumenta la hidrofobicidad del complejo de osmio; de forma similar, al añadir los sustituyentes alquilo al ligando diquelante también aumenta la hidrofobicidad del complejo de osmio.

El grupo enlazante L para utilizar en la presente invención puede seleccionarse dependiendo de una serie de factores que incluye el analito particular a analizar, su concentración, y el medio de la muestra. En realizaciones preferibles, los grupos enlazantes pueden seleccionarse en base al analito de interés particular, su concentración en el medio de la muestra, y el medio de la muestra en sí. Los grupos enlazantes de la presente invención pueden también ser grupos enlazantes divalentes. En una forma, el grupo enlazante de la presente invención puede seleccionarse para ser hidrofílico. Se ha determinado que la selección apropiada del grupo enlazante puede influir enormemente en la detección y análisis de analitos particulares. Por ejemplo, los analitos altamente hidrofílicos pueden influir en la movilidad del conjugado rédox reversible en el medio de la muestra en la cámara de reacción. Este, por contra, puede afectar a la amplificación de corriente mediante el reciclaje difusional bajo condiciones de estado estacionario y/o reciclaje enzimático.

Existen muchos tipos de química de conjugación que puede utilizarse para unir el mediador de osmio con un análogo de ligando. Las siguientes químicas de conjugación utilizadas para la preparación de los conjugados de mediador de osmio -péptido también se han utilizado comúnmente para preparar conjugados de proteína: 1) formación del enlace amida mediante éster reactivo con amina primaria; y 2) formación de enlace tioéter mediante maleimida con grupo sulfidrido; y formación de una unión urea o tiourea mediante reacción de un grupo amino de mediador de osmio con una funcionalidad isocianato o isotiocianato de los derivados del fármaco. El enlace amida es preferible sobre el enlace tioéter debido a que el enlace amida es generalmente más estable. Basado en la química de conjugación preferible, el ligando sobre el mediador de osmio puede funcionalizarse con un grupo amina primario o un grupo de ácido carboxílico. La mejor localización para estos grupos funcionales se cree que está en las posiciones C-4 o C-5 en el ligando imidazol del mediador de osmio; no obstante, la funcionalización a través del átomo de nitrógeno del anillo imidazol acomplejo con no-osmio también puede llevarse a cabo.

En algunos mediadores de osmio, el grupo amina sobre el ligando histamina puede unirse directamente al análogo de ligando, si existe un grupo reactivo adecuado o puede proporcionarse sobre el análogo de ligando. Por ejemplo, el grupo amino sobre un ligando de histamina del mediador de osmio reacciona fácilmente con un grupo carboxilo activado sobre metotrexato.

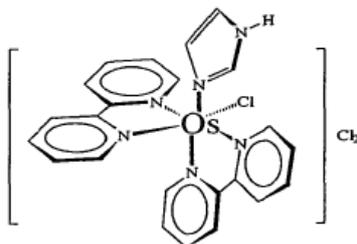
En una realización preferible de la presente invención, uno o más de los grupos enlazantes divalentes se seleccionan para presentar suficiente hidrofiliidad para aumentar la movilidad del conjugado rédox reciclado en un medio acuoso. Ejemplos de grupos enlazantes divalentes incluye: polietilenglicol PEG como monómero, dímero, oligómero o polímero de cadena corta.

En realizaciones alternativas, el enlazante en sí puede conectarse a uno o más grupos entrelazantes. Por ejemplo, en las especies ilustradas anteriormente para el Compuesto 1, 2, o 3 se une primero un grupo histadilo (derivado de histamina) al centro metálico osmio. La histamina en sí es un primer grupo o porción enlazante. Se entenderá que puede utilizarse una amplia variedad de grupos enlazantes con el complejo de osmio. Los complejos resultantes se consideran que están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Con el propósito de promover mejor el entendimiento y apreciación de la presente invención y sus ventajas, se proporcionan los siguientes ejemplos. Se debe entender, no obstante, que estos ejemplos son ilustrativos y no limitan de ninguna manera.

Ejemplos

El término "Mediador libre de osmio" o "Mediador libre" o "OSFM" se refiere a la utilización de dicloruro de bis (2,2'-bipyridil) imidazol cloro osmio (III), que se describe en la Patente EE.UU. N° 5.589.326. Este mediador se utiliza a menudo como modelo de mediador electroquímico para evaluar y comparar la amplificación rédox en varias MEID. La estructura de este mediador se muestra a continuación.



La notación "PBS" se refiere a una matriz de tampón fosfato salino que consta de tampón fosfato potásico 10 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, y cloruro de sodio 137 mM preparado de producto Sigma P4417 o una matriz de tampón salino similar.

- 5 La notación "PBST" se refiere a una matriz de tampón fosfato salino que consta de tampón fosfato potásico 10 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, y cloruro de sodio 137 mM, y Tween 20 entre 0,1% y 0,5%.

La referencia a un "Ag/AgCl externo" se refiere a un electrodo Ag/AgCl disponible comercialmente como el mini-electrodo de referencia RE 803 de Abtech Scientific Inc., Richmond, Virginia.

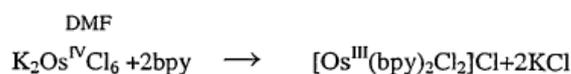
- 10 El término "Ag/AgCl externo" se refiere a una tinta Ag/AgCl aplicada a la región de contacto de la muestra de uno de los electrodos de la célula de electrodos. En la mayoría de casos esta es una tinta disponible comercialmente (producto E2414) de Ercon, Wareham, Massachusetts. El electrodo de referencia interno como el construido sobre nuestros electrodos posee un cambio de potencial en comparación con el electrodo de referencia externo Ag/AgCl de alrededor de 100 mV.

Preparación de marcadores electroquímicos de osmio

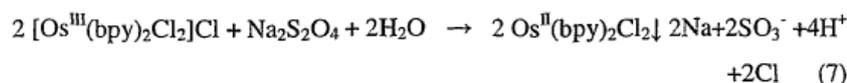
- 15 El dicloruro de bis (2,2'-bipiridil) imidazolil cloro osmio (III) (Mediador libre de osmio) ha demostrado ser un excelente mediador de electrones para muchas enzimas oxidoreductasa (Patente US N° 5.589.326). Presenta una cinética de mediación rápida (alrededor de 500 veces más rápido que el ferricianuro con glucosa oxidasa) y un potencial rédox relativamente bajo (+150 mV vs. Ag/AgCl). También presenta una tasa de transferencia de electrones muy rápida en las superficies de los electrodos. Es importante destacar que los ligandos orgánicos en el conjugado osmio se pueden funcionalizar de manera que puede enlazarse covalentemente a otras moléculas sin efectos perjudiciales sobre las propiedades rédox del centro de osmio. Estas propiedades únicas del conjugado de osmio lo convierten en un perfecto marcaje electroquímico para sensores de afinidad. Los mediadores fr osmio se pueden preparar de acuerdo con el procedimiento descrito en las Patentes Estadounidenses N° 6.294.062; 6.352.824; y 6.262.264.

- 25 Los mediadores de osmio con estos nuevos ligandos se sintetizaron usando el mismo procedimiento o similar utilizado para sintetizar el mediador libre de osmio. Su síntesis consta de dos pasos de proceso principales como se indica a continuación. Los detalles de estos pasos de procesamiento se describen a continuación

El primer paso del proceso implica la síntesis del intermediario de osmio, cis bis(2,2'-bipiridil) dicloro osmio(II), de la sal de osmio disponible comercialmente utilizando el siguiente esquema. El producto intermediario se aísla a través de la recristalización en un baño de hielo.



(6)



- 30 El segundo paso del proceso implica la reacción entre el intermediario de osmio y la histamina para producir los mediadores de osmio deseados. El producto deseado se precipita entonces de la solución mediante la adición de tetrafluoroborato de amonio.

- 35 Estos mediadores de osmio pueden también convertirse fácilmente en la forma oxidada, es decir, Os (III) utilizando tetrafluoroborato nitrosonio. No obstante, esto es innecesario ya que el osmio vuelve a la forma reducida en condiciones alcalinas durante las reacciones de conjugación y los ensayos de afinidad no requieren de la forma oxidada de Os (III) para la detección sobre el biosensor.

El grupo amino libre de histamina en el mediador de osmio (compuesto 5) se utilizó para acoplar al éster activado del derivado del fármaco en general para proporcionar conjugados fármaco-osmio. Los conjugados de osmio similares se han preparado para los péptidos HbA1c y HbA0 tal como se describe en la Patente EE.UU. Nº 6.262.264.

5 Fig. 18 ilustra un procedimiento mejorado para la síntesis del intermediario clave, mediador de bis(2,2'-bipiridil)-histamina cloro-osmio (compuesto 5). El procedimiento original implica la reacción de la histamina con cis-bis(2,2'-bipiridil) dicloroosmio (II) en etanol en condiciones de reflujo. No obstante, un rendimiento pobre del producto resultante deseado conduce a una ruta sintética alternativa utilizando un derivado de histamina protegido como material de partida. La utilización de grupos protectores en la química orgánica es bien conocida en la técnica ("protector groups in Organic Synthesis" de T.W. Green, John Wiley & Sons, 1981).

10 Así, el grupo amino primario de la histamina puede protegerse con un grupo protector adecuado, más preferiblemente utilizando un grupo protector terc-butoxicarbonilo (t-BOC) o grupo trifluoroacetamido. El diclorhidrato de histamina se hizo reaccionar con di-t-butildicarbonato en THF para proporcionar un derivado de histamina protegido de di-t-BOC. El grupo t-BOC del nitrógeno de imidazol se eliminó de forma selectiva mediante la reacción con trietilamina en metanol. La histamina mono protegida se acopló con $Os^{II}(bPy)_2Cl_2$ para proporcionar un complejo
15 histamina protegido (compuesto 4). El grupo t-BOC de la histamina protegida se desprotegió mediante reacción con ácido trifluoroacético para proporcionar osmio (bPy)₂(histamina)Cl (compuesto 5).

Se han preparado varios conjugados de fármaco osmio histamina. Un ejemplo representativo es la reacción de osmio (bPy)₂(histamina)Cl (compuesto 5) con un éster de anfetamina NHS (compuesto 8) tal como se muestra en la Fig. 19. El grupo trifluoroacetamido del complejo resultante de osmio-anfetamina se ha desprotegido mediante la
20 reacción con carbonato potásico 50mM para proporcionar un conjugado anfetamina osmio (compuesto 10).

El conjugado osmio teofilina (compuesto 13) se preparó tal como se ilustra en la Fig. 20. La teofilina amina (compuesto 11) se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado en WO 87/07955. La teofilina amina (compuesto 11) reaccionó con ácido tereftálico del éster de di-N-hidroxisuccinimida en presencia de trietilamina para proporcionar teofilina éster de N-hidroxisuccinimida (compuesto 12). Este éster activado se acopló con osmio (bipy)₂(histamina)Cl (compuesto 5) en presencia de trietilamina para proporcionar el conjugado osmio teofilina (compuesto 13).
25

El éster PCP NHS (compuesto 14) se utilizó para sintetizar el complejo PCP-Osmio (compuesto 15) que se muestra en la Fig. 21. El éster PCP NHS (Compuesto 14) se preparó de acuerdo con los procedimientos publicados en la patente EE.UU. Nº 5.939.332.

30 La síntesis de conjugado osmio THC-2 (compuesto 17) se describe en la Fig. 22. La síntesis del derivado THC-2 (compuesto 16) se describe en PE 0736529A1.

La síntesis del conjugado osmio THC-1 (compuesto 19), se describe en la Fig. 23. La síntesis del derivado THC-1 (compuesto 18) se describe en J. Org. Chem. 1986, 51, 5463-5465.

El esquema de síntesis del conjugado osmio metotrexato se muestra en la Fig. 24.

35 En una realización, la invención utiliza mediadores multi-osmio. Se descubrió que la utilización de mediadores multi-osmio mejora la sensibilidad de detección en los ensayos. Se diseñó la síntesis de conjugados fármaco osmio con múltiples centros rédox osmio. Se diseñaron enlazantes alifáticos y aromáticos multifuncionalizados para acoplarse al mediador de osmio amina con una funcionalidad protegida adicional diferente. Estos marcadores multi-osmio mono-protegidas se desprotegieron y pueden utilizarse para acoplarse a fármacos u otros analitos de interés. Como
40 ejemplo, se preparó un conjugado di-osmio THC-1 tal como se muestra en las Figs 25-28. Así, el 3, 5-dihidroxi bencil alcohol reaccionó con reactivo halo alquilante adecuadamente protegido, más preferiblemente bromo acetato de t-butilo en presencia de una base, más preferiblemente carbonato de potasio para proporcionar el producto disustituido del compuesto 22. La funcionalidad bencil alcohol del compuesto 22 se convirtió en un grupo mesilato seguido por la conversión a un grupo azido a través de una serie de reacciones de sustitución. El grupo azida del
45 compuesto 24 se convirtió en una funcionalidad amino mediante la hidrogenación seguida de la protección como un grupo trifluoroacetamido que proporciona el compuesto 26. Las funcionalidades de éster de t-butilo se eliminaron mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético para proporcionar el correspondiente compuesto diácido 27. Este se convirtió en cloruro de diácido y reaccionó con osmio histamina amina del compuesto 5 para proporcionar la monotrifluoroacetamida unida a di-osmio aromático deseada (compuesto 29). Se aisló también un producto monosustituido (compuesto 30) y se evaluó con el propósito de comparar en la medición de la sensibilidad de
50 detección en ensayo electroquímico. El grupo trifluoroacetamido del compuesto 29 puede eliminarse bajo condiciones ácidas, más preferiblemente carbonato potásico acuoso para proporcionar el mediador de diosmio 31 que puede acoplarse a un antígeno (es decir derivado de fármaco; véase Fig. 28) con el grupo activador apropiado.

De forma similar se preparó también un complejo di-osmio con un enlazante alifático. El enlazante alifático puede acoplarse a un antígeno activado de forma adecuada (por ejemplo un derivado de fármaco) tal como se muestra en la Fig. 30.
55

En otra realización de la invención un complejo de osmio con un enlazante hidrofílico se preparó tal como se

muestra en las Figs. 30-32. El mediador osmio histamina con enlazante hidrofílico se ha sugerido que supera las dificultades de desarrollo del ensayo vistas con los analitos hidrofóbicos como THC. Está disponible comercialmente un enlazante hidrofílico con funcionalidades adecuadas (compuesto 33). Este enlazante PEG posee una funcionalidad amino protegida y un ácido carboxílico libre. El grupo ácido del enlazante PEG puede convertirse en un éster activado, preferiblemente un éster de N-hidroxisuccinimida y puede acoplarse a un derivado osmio histamina amino (compuesto 5) en presencia de una base, preferiblemente trietilamina para proporcionar el compuesto 35. La funcionalidad t-BOC del compuesto 35 se eliminó bajo condiciones ácidas, preferiblemente utilizando ácido trifluoroacético. El grupo amino libre del enlazante PEG osmio (compuesto 36) puede reaccionar con un fármaco enlazado con un éster activado, como ejemplo, THC-2-NHS (compuesto 16) para proporcionar el conjugado osmio-PEG-THC (compuesto 37).

El enlazante osmio-PEG (compuesto 36) se acopló a metotrexato de acuerdo con el esquema mostrado en la Fig. 33.

Las Figs. 34-36 ilustran un esquema sintético para preparar un marcaje tetra osmio. El intermediario derivado de bromo, compuesto 23, puede reaccionar con 3,5-dihidroxibencil alcohol en presencia de una base para proporcionar el correspondiente producto disustituido (compuesto 50). El grupo bencil alcohol del compuesto 50 puede convertirse en la correspondiente amina, compuesto 52, de acuerdo con el procedimiento similar descrito anteriormente. El grupo amina puede protegerse utilizando un grupo protector adecuado, más preferiblemente un grupo trifluoroacetamido y grupos t-butil éster, que pueden eliminarse posteriormente bajo condiciones ácidas. Las funcionalidades resultantes de ácido tetra carboxílico del compuesto 53 pueden convertirse en el correspondiente cloruro de ácido y pueden acoplarse en la osmio histamina amina del compuesto 5 para proporcionar un marcaje aromático tetra-osmio con amina protegida con trifluoroacetamido. El grupo amino puede liberarse bajo condiciones básicas y el compuesto 56 resultante puede reaccionar con antígeno activado de forma adecuada (por ejemplo derivados de fármacos) para proporcionar el conjugado antígeno-tetra- osmio.

En otra realización de la invención, se describe la síntesis de un compuesto osmio dibiimidazol histamina. Este compuesto se desarrolló para tener un potencial rédox bajo para evitar interferentes potenciales de especies oxidables no deseables que pueden también estar en la muestra como el ácido ascórbico. La síntesis de dibiimidazol se muestra en la Fig. 37.

De este modo glioxal reacciona con amoniaco para proporcionar biimidazol (compuesto 45). El derivado dimetil del compuesto 45 puede reaccionar con p-tolueno sulfonato de metilo en presencia de una base, preferiblemente hidruro de sodio para proporcionar el compuesto 46. Este puede reaccionar con tricloruro de osmio en DMF a 180°C para proporcionar dicloruro de osmio di-biimidazol (compuesto 47). El acoplamiento del compuesto 47 y histamina t-BOC (compuesto 4) en presencia de una base, preferiblemente trietilamina proporciona el compuesto 48. El grupo t-BOC del compuesto 48 puede eliminarse bajo condiciones ácidas, preferiblemente utilizando el ácido trifluoroacético para proporcionar el compuesto 49. El grupo amino libre de osmio di-biimidazol histamina (compuesto 49) puede acoplarse al éster activado del derivado de fármaco para proporcionar conjugados fármaco-osmio dibiimidazol histamina.

El osmio di-biimidazol histamina (compuesto 49) presentó un potencial rédox bajo $E_{1/2} \sim 540$ mV vs Ag/AgCl. Los mediadores con potenciales bajos son también necesarios para las mediciones multi analito tal como se describe en la Patente EE.UU. Nº 6.294.062. En este caso son necesarios múltiples marcadores electroquímicos o mediadores cada uno con diferentes potenciales rédox espaciados para permitir dirigir cada marcaje electroquímico independientemente.

Ejemplo 1: Ensayos Electroquímicos de un conjugado osmio-teofilina

Se preparó un conjugado Os-teofilina tal como se ilustra en la Fig. 20. Este conjugado rédox reversible se evaluó con una serie de mediciones electroquímicas diseñadas para desarrollar una respuesta de ensayo a teofilina. Los microelectrodos MEID se fabricaron tal como se describe aquí utilizando técnicas fotolitográficas. Las MEID incluyen una estructura de electrodos de oro con 50 pares de dedos cada una con una amplitud (W) de alrededor de 21 μm y un hueco (W_g) de 10, 15, y 21 μm y una longitud (b) de 6 mm. Cada MEID también contiene dos regiones adicionales de electrodo de oro para utilizar como contador y electrodo de referencia. Las mediciones electroquímicas se realizaron utilizando un instrumento bipotenciostato CH modelo 802A o 832A. Las mediciones amperométricas del bipotenciostato se realizaron para la amplificación de la MEID y se utilizó una única técnica de potencial amperométrico para la amplificación enzimática. Cada medición requirió alrededor de 20 μL de muestra en el electrodo cuando se utilizó un electrodo externo de referencia o 5-10 μL con un electrodo interno de referencia de tinta de Ag/AgCl y un techo capilar sobre la estructura activa de electrodos.

La Fig. 38 muestra una VC del conjugado osmio-teofilina en un hueco de 10 μm (W_g), una MEID de 21 μm (W) con 50 pares de dedos. La VC muestra la oxidación simétrica y los picos de reducción y in $E_{1/2}$ de alrededor de 125 mV vs. Ag/AgCl. De estos potenciales anódicos y catódicos adecuados puede seleccionarse mediciones amperométricas y controladas con un bipotenciostato.

La Fig. 39 ilustra la respuesta oxidativa al estado estacionario del conjugado osmio-teofilina medido a diferentes

concentraciones en un hueco de 21 μm (W_g), MEID de 21 μm (W) con 50 pares de dedos. Un bipotenciostato se utilizó en los potenciales anódicos y catódicos adecuados aplicados a WE1 y WE2. Esta gráfica ilustra que incluso esta MEID de grandes dimensiones alcanza el estado estacionario en pocos segundos.

5 La Fig. 40 ilustra una respuesta de curva de dosis del conjugado osmio-teofilina en varias concentraciones en un hueco de 21 μm (W_g), MEID 21 μm (W) con 50 pares de dedos. Los potenciales de electrodo se controlaron con un bipotenciostato. De nuevo, puede observarse que la oxidación y reducción son aproximadamente las mismas en magnitud absoluta, lo cual indica que no hay otras especies que interfieran en la muestra con la medición de corriente en los electrodos.

10 Se observará que las curvas de respuesta a dosis muestran aquí un sesgo de multímetro. El término "sesgo de multímetro" se refiere a un sesgo en los datos recogidos que únicamente es resultado de los electrodos e instrumentos que también están conectados a un multímetro de impedancia alta, en este caso un Fluke 87 multímetro con una impedancia de entrada de 10 MOhm. Para las mediciones amperométricas que incluye las mediciones amperométricas controladas con bipotenciostato, el sesgo es una constante $I=V/R$ en la que V es el potencial aplicado en voltios para cada electrodo correspondiente y $R=10$ MOhm. Para el potencial aplicado de 0 mV vs. Ag/AgCl el sesgo será de 0 nA pero para el potencial aplicado de 200 mV el sesgo será de 20 nA.

15 La Fig. 41 es una representación que ilustra la inhibición de la respuesta del conjugado con aumento de las concentraciones de anticuerpo en solución. En el ejemplo, la concentración del conjugado osmio-teofilina se mantuvo a alrededor de 25 μM , mientras que la concentración del anticuerpo en solución aumentó. De la curva de inhibición, se determinó que para este ejemplo, el conjugado óptimo para la proporción de anticuerpo es de 2:1 ya que la pendiente de la curva de inhibición desciende significativamente cuando la concentración de anticuerpo aumenta. Este corresponde con la proporción estequiométrica de 1:1 ya que los anticuerpos son bivalentes. También deberá notarse que la respuesta también muestra un sesgo de multímetro.

20 La Fig. 42 es un ensayo teofilina llevado a cabo en calibradores de suero y muestra la corriente amplificada de la MEID obtenida para el conjugado osmio-teofilina. El ensayo se llevó a cabo con una concentración de conjugado osmio-teofilina de alrededor de 25 μM y una concentración de anticuerpo de alrededor de 12,5 μM mientras varía la concentración de teofilina. El ensayo posee un amplio rango de ensayo que se extiende desde debajo del rango terapéutico hasta la región tóxica.

Ejemplo 2: Ensayo electroquímico de un conjugado osmio-anfetamina

30 Se preparó un conjugado Os- anfetamina (10) tal como se ilustra en la Fig. 19. Este conjugado rédox reversible se evaluó con una serie de ensayos electroquímicos. La MEID se fabricó tal como se describe aquí utilizando técnicas fotolitográficas. Cada MEID contiene 50 pares de "dedos" cada una con una amplitud de alrededor de 21 μm y una amplitud de hueco entre dedos de 15 μm . Las mediciones electroquímicas se realizaron utilizando un instrumento bipotenciostato CH modelo 802A o 832A. Las mediciones amperométricas del bipotenciostato se realizaron para la amplificación de la MEID y se utilizó una única técnica de potencial amperométrico para la amplificación enzimática.

35 Cada medición requirió alrededor de 20 μL de muestra en el electrodo cuando se utilizó un electrodo externo de referencia o 5-10 μl con un electrodo interno de referencia de tinta de Ag/AgCl y un techo capilar sobre la estructura activa de electrodos.

40 La Fig. 43 muestra un voltamograma cíclico de 100 μM de conjugado Os-anfetamina preparado en una solución PBST. La figura muestra una VC con un grupo único de dedos y cuando ambos grupos de de dedos se acortan y se utilizan como electrodo de trabajo. La VC muestra oxidación simétrica y picos de reducción y un $E_{1/2}$ de alrededor de 125 mV vs. Ag/AgCl. A partir de esto pueden seleccionarse los potenciales anódicos y catódicos adecuados.

45 La Fig. 44 es una VC de reciclaje de conjugado osmio-anfetamina 100 μM sobre un MEID 15 μm utilizando un bipotenciostato para controlar los potenciales. WE1 se cribó entre -100 y 400 mV mientras que WE2 se mantuvo constante a -100 mV. La VC muestra el mediador que experimenta un reciclaje rédox. La VC muestra una respuesta de estado estacionario de alrededor 600 nA. o 6 nA/ μM . Una VC de reciclaje muestra que la corriente de oxidación y de reducción posee magnitudes opuestas y equivalentes. La corriente se amplifica debido al reciclaje. Para medir una VC de reciclaje el WE2 se fijó a un potencial de reducción de -100 mV y WE1 se cribó entre un potencial de reducción de -100mV y un potencial de oxidación de 400 mV. El reciclaje ocurre cuando un grupo de dedos está preparado para la oxidación y el otro para la reducción. En general, siempre y cuando la velocidad de barrido no sea demasiado rápida, la magnitud de la corriente no es proporcional a la velocidad de barrido. Esto difiere de una VC normal en la que la respuesta aumenta con la velocidad de barrido.

50 La Fig. 45 es una respuesta a dosis del conjugado osmio-anfetamina en una MEID con un hueco de 15 μm y una amplitud de 21 μm . El conjugado osmio-anfetamina se preparó en PBST a concentraciones entre 0 μM y 100 μM . Se utilizó un instrumento bipotenciostato CH para hacer las mediciones. La corriente observada en ambos electrodos de trabajo #1 y electrodo de trabajo #2 fue aproximadamente la misma en magnitud absoluta y pendiente (asumiendo una sustracción del sesgo de multímetro). La representación se generó utilizando una MEID de 15 μm con un electrodo de referencia interno Ag/AgCl y WE1= 300mV y WE2 = 0 mV

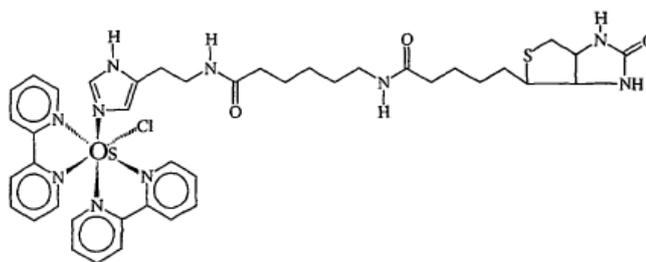
La inhibición del conjugado osmio-anfetamina se evaluó también utilizando un bipotenciostato en una MEID con un hueco de 15 μm y una amplitud de 21 μm . Los electrodos se prepararon en la que WE1 = 250 mV y WE2 = -150 mV vs. un electrodo de referencia interno. El conjugado Os-anfetamina se mezcló con concentraciones variadas de un anticuerpo monoclonal de anfetamina de Roche [<AMPH>M-2.17.22<] y se determinó una curva de inhibición de la proporción óptima de la proporción de conjugado vs anticuerpo en una proporción estequiométrica de 2:1. Esto corresponde a la proporción estequiométrica ya que el anticuerpo es bivalente. Esta proporción se utilizó entonces para demostrar un ensayo anfetamina utilizando la amplificación MEID.

La Fig. 46 muestra una representación de un ensayo anfetamina. Varias concentraciones de fármaco d,l-anfetamina se mezclaron con una concentración fija de anticuerpo seguida de una concentración fija de conjugado. La matriz de solución final contenía 20 μM de conjugado osmio anfetamina, anticuerpo 10 μM , y concentraciones de anfetamina entre 0 y 25 μM . Cada solución se mezcló e inmediatamente se transfirió a una MEID para medir la respuesta a corriente utilizando un bipotenciostato. Las respuestas a corrientes oxidativas y reductivas medidas se representan frente a la concentración de fármaco para producir la curva de respuesta a dosis del ensayo. La respuesta de corriente del conjugado aumenta a medida que se añade fármaco y se une anticuerpo que resulta en menos inhibición de conjugado. El ensayo de curva de respuesta a dosis cubre el rango necesario para las drogas de abuso de anfetamina del ensayo que posee una concentración de corte SAMHSA de 1000 ng/mL o 6,7 μM . La respuesta de anfetamina se evaluó utilizando un bipotenciostato en una MEID con un hueco de 15 μm y una amplitud de 21 μm . Los electrodos se prepararon WE1 = 250 mV y WE2 = -150 mV vs. un electrodo interno de referencia.

Ejemplo 3: Sistema de modelo osmio-biotina con MEID 2 μm

La matriz de electrodos interdigitados se fabricó a medida para Roche Diagnostics por Premitec, Inc., Raleigh, NC. Cada MEID contenía 750 pares de electrodos cada uno de 6mm de longitud con un hueco y amplitud de 2 μm . La región interdigitada para estos electrodos totalizó 36 mm². Esta gran dimensión se seleccionó en base a consideraciones prácticas para lograr límites de detección inferiores. Los instrumentos, especialmente un bipotenciostato de mano portátil, posee limitaciones como las corrientes mínimas que se pueden detectar. En ese momento, se asumió que 1 nA sería la corriente más baja que sería medida por un ensayo debido a consideraciones de ruido del dispositivo portátil. El uso de esta información a lo largo de las respuestas de corriente predichas, las dimensiones de los electrodos fueron determinadas para permitir una mejora considerable en la sensibilidad del inmunoensayo. Además estos electrodos también se fabricaron para comparar la sensibilidad calculada con la que observada actualmente para demostrar la mejora de amplificación como se predijo en la Ecuación 1.

Se preparó un conjugado osmio-biotina (compuesto 57 mostrado más adelante) de acuerdo con los procedimientos similares a los descritos en la Patente EE.UU. N° 6.262.264



Compuesto 57

Un tubo de microcentrífuga se cargó con 20 μL de biotina en las siguientes concentraciones: 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5, 7,5, y 10 μM . A cada una de estas soluciones se añadieron 20 μL de estreptavidina 1,25 μM y 40 μL de PBST. A cada solución, se añadió 20 μL de estreptavidina 5 μM , mezclada brevemente (-2s), y pipeteada entre el espacio capilar construido en un electrodo de MEID de 2 μm . Se inició inmediatamente una medición bipotencioestática que controla WE1 a 250 mV y WE2 a 0 mV vs. Ag/AgCl.

La Fig. 47 muestra el reciclaje del voltamograma cíclico (VC) en respuesta al estado estacionario obtenido con 25 μM de mediador libre de osmio (dicloruro de bis (2, 2'-bipiridil)imidazol cloro osmio (III)) en una MEID plana con 750 pares de dedos con W y Wg de 2 μm . El VC de reciclaje se realizó con WE1 siendo el generador de escaneado desde -100 mV a 400 mV y WE2 el colector mantenido a -100 mV. Esta respuesta muestra una excelente amplificación y la eficiencia con la respuesta al estado estacionario de alrededor 3800 nA o 152 nA/ μM .

La Fig. 48 muestra una curva de respuesta a dosis del conjugado osmio biotina 0-5 μM en una MEID planar con 750 pares de dedos con W y Wg de 2 μm . Las mediciones controladas WE1 = 250 mV y WE2 = 0 mV con un bipotenciostato CHI. La pendiente de las mediciones de oxidación y reducción son aproximadamente las mismas y opuestas indicando una buena eficiencia de reciclaje rédox. La pendiente de alrededor 126 nA/ μM con el osmio

biotina es una respuesta muy buena solo ligeramente inferior que 152 nA/ μ M calculado para el mediador libre de osmio de la VC de la Fig. 47.

- 5 Los datos se recogieron a intervalos de 0,5 seg durante 40 segundos. La respuesta de ensayo se evaluó en muchos puntos de tiempo y proporcionó resultados similares en todos los tiempos incluso a los 0,5 segundos de tiempo. La Fig. 49 muestra la respuesta del ensayo de biotina al momento = 0,5, 2, y 10 segundos. Los reactivos de ensayo se seleccionaron para un rango de ensayo de 0-1 μ M que se logró. Una representación típica que mostraba una corriente en estado estacionario vs. tiempo se muestra en la Fig. 50. Los datos muestran que la respuesta a estado estacionario se logra casi de forma instantánea desde el inicio de los potenciales aplicados. El estado estacionario se logra cuando las especies oxidadas y reducidas generadas en los correspondientes electrodos son iguales.
- 10 Estos resultados se recogen utilizando un electrodo de MEID de 2 μ M que se preparó en Premitec Inc, Raleigh, North Carolina y fue de oblea ID#0702HIDA1...14. Las concentraciones finales de ensayo fueron de 1 μ M del conjugado osmio biotina, estreptavidina 0,25 μ M y biotina de 0-2 μ M. Este ensayo se realizó utilizando un bipotenciostato CHI-802A de CH Instruments, Austin, Texas.
- 15 La Fig. 51 y la Fig. 54 muestran una VC normal que se realizó con ambos enlazantes protegidos trifluoroacetomido mono-osmio-aromático (compuesto 30) y el enlazante di-osmio-aromático (compuesto 31) respectivamente. La VC muestra que los mediadores sintetizados fueron compuestos rédox reversibles con un potencial razonablemente bajo $E_{1/2}$ de alrededor de 20-40 mV vs Ag/AgCl. Ambos se realizaron a una concentración de 200 μ M en una MEID planar con 50 pares de dedos con $W = 21 \mu\text{m}$ y $W_g = 15\mu\text{m}$.
- 20 La Fig. 53 muestra una comparación de respuestas a dosis para los enlazantes protegidos trifluoroacetomido mono-osmio-aromático (Compuestos 30 y 31), y mediador libre de osmio (dicloruro de bis (2, 2'-bipiridil)imidazol cloro osmio (III)) todos realizados en una MEID planar con 50 pares de dedos con $W = 21 \mu\text{m}$ y $W_g = 15\mu\text{m}$. El mediador libre de osmio y el enlazante protegido trifluoroacetomido mono-osmio-aromático proporcionaron una respuesta similar y el enlazante di-osmio-aromático proporcionó una respuesta ligeramente mejorada. La respuesta del compuesto di-osmio no fue 2X que uno se podía esperar inicialmente con el doble de número de lugares rédox.
- 25 Alguna justificación para una respuesta inferior puede ser el tamaño más grande (MW) del complejo diosmio enlentece la difusión entre electrodos y/o de media solo un sitio del complejo di-osmio se oxida y reduce (solo un centro osmio se oxida o reduce en cualquier momento). En cualquier caso en base a la VC y una curva de respuesta a dosis ligeramente mejorada, este nuevo conjugado prueba ser una alternativa viable a los mediadores con centros osmio únicos.
- 30 La Fig. 54 muestra la VC del conjugado di-osmio-THCl (compuesto 32) a una concentración de 200 μ M llevada a cabo en una MEID planar con 50 pares de dedos con $W = 21 \mu\text{m}$ y $W_g = 15 \mu\text{m}$. La reserva de conjugado se preparó en PBST a partir de 0,75 mg del compuesto sin utilizar un disolvente orgánico. La VC muestra que el mediador es reversible pero el pico reductivo parece ser ligeramente inferior que las corrientes de picos fr oxidación. La respuesta es alrededor del 50% inferior a la del enlazante di-osmio-aromático (compuesto 31). La disminución de respuesta parece indicar la naturaleza hidrofóbica de la molécula de THC.
- 35 La Fig. 55 es una curva de respuesta a dosis de osmio-PEG-THC-2 (compuesto 37) sobre una MEID planar con 50 pares de dedos con $W = 21 \mu\text{m}$ y $W_g = 15\mu\text{m}$. Las mediciones se controlaron con un bipotenciostato CHI WE1 = 250 mV y WE2 = 0 mV. La solución de reserva de conjugado se disolvió en PBST sin utilizar disolventes orgánicos. Se realizaron diluciones en serie entre 6,25 μ M y 500 μ M en PBST. Se aplicaron 10 μ L en el techo capilar cobre la célula de electrodo. Similar al conjugado di-osmio-THCl (compuesto 32) la respuesta reductiva (pendiente) es ligeramente inferior a la de la pendiente de oxidación. Ambas pendientes son alrededor de 10 veces más pequeñas que las vistas con el mediador libre de osmio. Los datos de ensayo muestran el resultado 5 segundos tras aplicar los potenciales. Los resultados son la media de 4 réplicas.
- 40 La Fig. 56 es una curva de respuesta a dosis de osmio-PEG-THC-2 (compuesto 37) con amplificación enzimática. La pendiente de la respuesta de la amplificación enzimática del conjugado mejora por encima de la amplificación por MEID. También se nota que con la adición de 5% hidroxipropil- β -ciclodextrina para superar posibles preocupaciones con la naturaleza hidrofóbica del THC, se observa un aumento significativo en la respuesta.
- 45 La Fig. 57 muestra la VC de osmio- PEG- metotrexato (compuesto 38) a una concentración de 150 μ M llevado a cabo en una MEID planar con 50 pares de dedos con $W = 21 \mu\text{m}$ y $W_g = 15 \mu\text{m}$. La reserva de conjugado se preparó en PBST a 150 μ M a partir de 0,49 mg del compuesto sin utilizar un disolvente orgánico. La VC muestra un pico rédox reversible simétrico. En comparación la VC de otros mediadores, uno debe tener en cuenta la mayor amplitud de dedo de 21 μ M y la baja concentración de conjugado utilizado para esta VC.
- 50 La Fig. 58 es una curva de respuesta a dosis de osmio-PEG-metotrexato (compuesto 38) sobre una MEID planar con 50 pares de dedos con $W = 21 \mu\text{m}$ y $W_g = 21 \mu\text{m}$. Las mediciones se controlaron con un bipotenciostato CHI WE1 = 0.25 mV y WE2 = 0 mV. Las diluciones se realizaron en PBST a partir de una reserva de 150 μ M para preparar (concentraciones de 25, 10, 5, 2,5 y 1,25 μ M). 20 μ L de las soluciones se aplicaron al electrodo a través del techo capilar sobre la célula de electrodo utilizando un electrodo de referencia externo Ag/AgCl. El volumen de 20 μ L
- 55

fue necesario para salvar el hueco entre la muestra en el capilar y el capilar externo y localizado justo fuera de la región capilar. La pendiente de la respuesta del conjugado para este mediador fue mayor que la respuesta de osmio-PEG-THC2. Los resultados son la media de 4 réplicas.

5 Se describen ejemplos adicionales en un artículo titulado " The Latest Development in Biosensor Immunoassay Technology for Drug Assays " que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

Síntesis de marcajes de mediador electroquímico:

10 Todos los disolventes eran de J.T. Baker. Los análisis por HPLC de fase reversa se realizaron en un sistema Agilent HP1100 CL/EM configurado con un detector de matriz de diodos y una bomba cuaternaria. Los análisis CL/EM se realizaron con una columna Vydac 218TP54 (300A, 5 μ ; C18, 4,6 mm x 250 mm) equipada con un equipo de guardia Phenomenex KJO-4282 con un cartucho AJO-4287 (C-180DS). La corriente cromatográfica portó la post-columna en el detector de EM. El MSD utilizado se utilizó en el modo de electropulverizador positivo "modo ES (+)".

15 Las fracciones HPLC se liofilizaron. El acetonitrilo se evaporó bajo presión reducida seguido de la congelación del residuo acuoso utilizando, por ejemplo, un baño de hielo /acetona, seguido de la liofilización utilizando un liofilizador. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparativa para proporcionar 10,2 mg (6,6X10⁻³ mmol, 20%) de derivado THC-osmio PEG (37), CL/EM M+H 1501.6.

20 La HPLC de fase reversa preparativa utilizó una columna de compresión radial Varian Dynamax con 1) R00083221C (Microsorb 60-8, C-18, 250 mm x 21,4 mm) con un módulo de guardia Varian Dynamax (Rainin) R00083221G (C-18, 8P) o 2) R00083241C (Microsorb 60-8, C-18, 250 mm x 41.4 mm) con un módulo de guardia Varian Dynamax (Rainin) R00083241G (C-18, 8P). El trabajo de HPLC se realizó utilizando un sistema de gradiente de agua-acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %.

25 El éster de anfetamina NHS (compuesto preparado tal como se describe en "Dual Analyte Immunoassay", PE 0574782A2. El éster de THC-1 NHS (compuesto 18) es un derivado corto enlazado preparado tal como se describe en " Reagents for the Determination of Drugs ", PE 0386644. El éster de THC-2 NHS (compuesto 16) es un derivado de cadena larga preparado tal como se describe en "Novel Cannabinol Derivatives and Improved Immunoassay", PE 0276732A2. La teofilina amina (compuesto 11) se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado en PCT WO 87/07955. El éster de teofilina NHS (compuesto 12) se preparó mediante la reacción de teofilina amina (compuesto 11) con éster di-N-hidroxisuccinimida del ácido tereftálico en presencia de trietilamina. El O-(N-Boc-2-aminoetil)-O-(N-diglicolil)-2-aminoetil hexaetileneglicol (compuesto 33) se compró a Nova Biochem a través de VWR.

Preparación de bis (2,2'-bipiridil) dicloro osmio:

30 A una mezcla de 4,18g (8,6 mmol) de hexacloroosmiato de potasio y 3,05g (19,5mmol) de 2,2'-dipiridilo se añadió 100 mL de dimetilformamida. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se filtró y el residuo se lavó con 5 mL de DMF. El filtrado se dejó agitar a temperatura ambiente y se añadió una solución de 4,76g (0,027mol) de ditionato de sodio en 430 mL de agua a la mezcla de reacción por goteo. La mezcla de reacción resultante se colocó en un baño de hielo para precipitar el producto deseado. Este sólido resultante se recogió y se lavó dos veces con 15 mL de agua seguido de dos veces con 15 mL de éter. El sólido marrón resultante se secó a 50°C al vacío (66,7 Pa (0,5 mm Hg)) para proporcionar 4,3g (7,4 mmol, 87 %) de producto deseado como un sólido marrón oscuro.

Preparación de 4-(2-terc-Butoxicarbonilamino-etil)-imidazol-1-carboxilato de terc-butilo:

40 Una mezcla de 3,68g (20 mmol) de diclorhidrato de histamina, 160 mL de acetonitrilo, 14 mL (0,10mol) de trietilamina, y 13,1g (0,060mol) de di-terc-butildicarbonato se dejó agitar a temperatura ambiente durante tres días. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se lavó con 150 mL de hexano. El residuo se lavó tres veces con 100 mL de éter. Todas las partes de éter se combinaron y se concentraron para proporcionar un polvo blanco (CL/EM M+NA 334,1).

Preparación de [2-(1H-Imidazol-4-il)-etil]-carbamato de terc-butilo:

45 A 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etil)-imidazol-1-carboxilato de terc-butilo, se añadieron 100 mL de metanol y 800 mL (5,73 mol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante cuatro días y se concentraron en aceite. Al residuo se le añadieron 40 mL de éter y 80 mL de hexano. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente resultando en la precipitación del producto, como un sólido blanco, que se recogió. El rendimiento fue de 1,7g (8,0 mmol, 40%) (CL/EM M+H 212,1).

50 Preparación de osmio dibipiridil t-Boc histamina (Compuesto 4):

A una mezcla de 300 mg (0,52 mmol) de bis (2,2'-bipiridil) dicloro osmio y 268 mg (1,26 mmol) de histamina t-Boc se añadió 54 mL de etanol seguido de 1,6 mL (11,4 mmol) de trietilamina. La mezcla se dejó agitar a 80°C durante cinco días y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa utilizando un gradiente con agua y acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético para proporcionar 250 mg (0,32 mmol, 61%) de osmio

dibipiridil t-Boc histamina (compuesto 4) como un polvo marrón (CL/EM M+H 749,1).

Preparación de bis(2,2'-bipiridil)-histamina-cloro-osmio

[Osmio(bPy)₂(histamina)Cl] (Compuesto 5):

5 A 50 mg (0,063 mmol) de osmio dibipiridil t-Boc Histamina (compuesto 4) se añadieron 2 mL de cloruro de metileno y 2 mL de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se concentró bajo presión reducida. Al residuo se le añadió 5 mL de cloruro de metileno y se concentró. Este procedimiento de adición de 5 mL de cloruro de metileno seguido de concentración se repitió durante cuatro veces más y el residuo total se secó para proporcionar 40 mg (0,058 mmol, 93 %) de (compuesto 5) como un polvo marrón, (CL/EM M+H 649).

10 Preparación de conjugado anfetamina-osmio histamina TFA protegido (Compuesto 9):

15 A 82 mg (0,104 mmol) de osmio dibipiridil t-Boc histamina (compuesto 4) se añadieron 1,5 mL de ácido trifluoroacético y 0,5 mL de 1, 2-dicloroetano. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se concentró. Al residuo resultante se añadió 5 mL de cloruro de metileno, que se concentró entonces. El proceso de adición anterior de 5 mL de 1, 2-cloruro de metileno y la concentración se repitió durante tres veces más y el residuo total se secó bajo presión reducida durante 2h. Al residuo se le añadieron 1 mL de DMF anhidro y 0,2 mL (1,43 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar mientras se añadía una solución de 50 mg (0,09 mmol) de éster de anfetamina NHS en 1mL de 1, 2 dicloroetano y 0,5 mL de DMF por goteo. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente 18 horas y se concentró entonces bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 68 mg (0,060 mmol, 67 %) de compuesto anfetamina-osmio trifluoroacetamida protegido (compuesto 9) como un sólido marrón oscuro, CL/EM M+H 1083,63.

Preparación de conjugado osmio anfetamina (Compuesto 10):

25 A 60 mg (0,053 mmol) de conjugado anfetamina-osmio histamina TFA protegido (compuesto 9) se añadieron 25 mL de carbonato de potasio 50 mM y 10 mL de metanol. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante tres días y después se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 13,6 mg (0,013 mmol, 25 %) del conjugado de osmio (compuesto 10), CL/EM M+H 987,2. El material de partida del conjugado de anfetamina osmio histamina TFA protegido (compuesto 9) (18,3 mg) también se recuperó.

Preparación de conjugado osmio THC-2 histamina (Compuesto 17):

30 A 54 mg (0,068 mmol) de osmio dibipiridil t-Boc histamina (compuesto 4) se añadieron 1,5 mL de ácido trifluoroacético y 0,5 mL de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 30 minutos y se concentró. Se añadió 5 mL de cloruro de metileno y la solución resultante se concentró. El procedimiento anterior de adición de cloruro de metileno y concentración se repitió tres veces más. Al residuo resultante, se añadió 1 mL de DMF anhidro seguido de 200 µL (1,43 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente y se añadió una solución de 30 mg (0,060 mmol) de derivado THC-2 NHS (compuesto 16) en 0,5 mL de DMF anhidro y 1 mL de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente 18 horas y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 33,3 mg (0,031 mmol) de conjugado osmio THC-2 histamina (compuesto 17) como un polvo marrón, CL/EM M+H 1034,2.

Conjugado osmio metotrexato (Compuesto 21):

40 A 57 mg (0,125 mmol) de metotrexato (Sigma) se añadió 1 mL de DMF anhidro seguido de 22 mg (0,15 mmol) de 4-nitrofenol y 27mg (0,13 mmol) de N,N'-díciclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 horas y el éster de metotrexato activado resultante (compuesto 20) se utilizó in situ en el siguiente paso sin aislar.

45 A 100 mg (0,14 mmol) de osmio dibipiridil t-Boc histamina (compuesto 4) se añadió 1 mL de ácido trifluoroacético. la mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentró bajo presión reducida. Al residuo se añadió 5 mL de cloruro de metileno y se concentró. La adición de 5 mL de cloruro de metileno y el proceso de concentración se repitió cuatro veces más. Al residuo se añadió 1 mL de DMF seguido de 200 µL (1,43 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y el éster activado de metotrexato preparado como antes (compuesto 20) se añadió por goteo. La reacción se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 52,5 mg (0,046 mmol, 32%) del conjugado metotrexato de osmio (compuesto 21) como un polvo marrón, CL/EM M+H 1086,2.

Preparación de conjugado teofilina osmio histamina (Compuesto 13):

Este se preparó mediante un método similar comenzando con éster de teofilina NHS (compuesto 12) tal como se

describe por ejemplo en la preparación de conjugado osmio THC-2 histamina (compuesto 17).

Preparación de conjugado PCP-osmio histamina (Compuesto 15):

Este se preparó mediante un método similar comenzando a partir de éster de PCP NHS (compuesto 14) tal como se describe por ejemplo en la preparación de conjugado de osmio THC-2 histamina (compuesto 17).

5 Preparación de conjugado THC-1 osmio histamina (Compuesto 19):

Este se preparó mediante un método similar comenzando a partir de éster de THC-1 NHS (compuesto 18) tal como se describe por ejemplo en la preparación de conjugado de osmio THC-2 histamina (compuesto 17). La solubilidad de este mediador en PBST fue pobre y requirió del uso de DMF.

Preparación de (3-terc-butoxicarbonilmetoxi-5-hidroximetil-fenoxi)-acetato de terc-butilo (Compuesto 22):

- 10 A 5 g (35 mmol) de 3,5-dihidroxibencil alcohol se añadieron 250 mL de DMF seco, 11,85 mL (80 mmol) de tbutilbromoacetato, 14,8 g (107 mmol) de carbonato de potasio anhidro, y 34,5 g (105 mmol) de carbonato de cesio seguido de 3 g de filtros moleculares de 4 Å. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a 80°C bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró, y el residuo se lavó con 200 mL de acetato de etilo. Todo el filtrado se combinó y se concentró hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en 150 mL de éter de dietilo, se lavó tres veces con 200 mL de agua y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en con gel de sílice utilizando éter de dietilo al 70 % en hexano para proporcionar 7,5 g (20 mmol, 57%) de (compuesto 22) como una goma incolora (CL/EM M+Na 391,1).

Preparación de (3-bromometil-5-terc-butoxicarbonilmetoxi-fenoxi)-acetato de terc-butilo (Compuesto 23):

- 20 A 1g (2,7 mmol) de (compuesto 22) se añadió 48 mL de cloruro de metileno y se enfrió a -40°C seguido de 640 µL (4,58 mmol) de trietilamina, 400 µL (5,16 mmol) de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a -40°C durante 3h. A la mezcla de reacción se añadieron 32 mL de THF recién destilado y 800 mg (9,21 mmol) de bromuro de litio. La mezcla de reacción se dejó agitar a 4°C durante 18 horas, y después se concentró hasta la sequedad. Este se disolvió en 50 mL de cloruro de metileno y 20 mL de agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con cuatro veces con 30 mL de cloruro de metileno. las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar 1,16 g (2,68 mmol, 99%) de (compuesto 23).

Preparación de (3-azidometil)-5-terc-butoxicarbonilmetoxi-fenoxi)-acetato de terc-butilo (Compuesto 24):

- 30 A 1,16g (2,68 mmol) del derivado de bromo (compuesto 23) se añadieron 30 mL de DMF anhidro y 1,79g (27,5 mmol) de azida sódica a 50°C bajo una atmósfera de argón durante 72 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, y el residuo se concentró hasta la sequedad. Al residuo se añadieron 50 mL de acetato de etilo y 25 mL de agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con 25 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron para proporcionar 1,04 g (2,64 mmol, 99%) del compuesto azido (compuesto 24) como un sólido blanco gomoso, CL/EM M+Na 416,1.

Preparación de (3-aminometil-5-terc-butoxicarbonilmetoxi-fenoxi)-acetato de terc-butilo (Compuesto 25):

- 35 A 2,9 g (7,3 mmol) de (compuesto 24) se añadieron 140 mL de etanol, 4,5 g (71,3 mmol) de formato de amonio y 1,39 g de 10% Pd-C. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se filtró a través de CELITE®. El residuo se lavó con 50 mL de etanol. El filtrado se concentró y se redisolvió en 150 mL de cloroformo. Este se lavó tres veces con 75 mL de agua DI, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para proporcionar 2,4 g (6,53 mmol, 89%) del derivado amino (compuesto 25) como un semisólido blanco apagado, LC/MS; M+ Na 390,1, 2M+1 735,3.

- 40 Preparación de {3-terc-butoxicarbonilmetoxi-5-[2,2,2-trifluoro-acetilamino)-metil]-fenoxi}-acetato de terc-butilo (Compuesto 26):

- 45 A 862 mg (2,34 mmol) de (compuesto 12) se añadieron 20 mL de THF recién destilado, 1 mL (7,17 mmol) de trietilamina y 426 µL (3,57 mmol) de trifluoroacetato de etilo. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Esta se concentró hasta la sequedad y se disolvió en 50 mL de cloroformo. La capa orgánica se lavó tres veces con 50 mL de agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizado para proporcionar 604 mg (1,3 mmol, 56%) de producto trifluoroacetilo protegido (compuesto 26) como un sólido gomoso blanco CL/EM M+NA 486.

Preparación de ácido {3-carboximetoxi-5-[(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-metil]-fenoxi}-acético [enlazante aromático trifluoroacetamido protegido] (Compuesto 27):

- 50 A 500 mg (1,07 mmol) de (compuesto 26) se añadieron 20 mL de cloruro de metileno y 20 mL de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 72 horas y se concentró. Al residuo se añadió 30 mL de cloruro de metileno y se concentró. El proceso anterior de adición de 30 mL de cloruro de metileno y de concentración se repitió tres veces más para proporcionar 376 mg (1,07mmol, 99%) del derivado

diácido (compuesto 27) como un sólido blanco, CL/EM M+NA 374.

Preparación de cloruro de {3-clorocarbonilmetoxi-5-[(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-metil]-fenoxi}-acetilo (Compuesto 28):

- 5 A 51,2 mg (0,145 mmol) de (compuesto 27) se añadieron 3 mL de cloruro de metileno y 205 μ L (2,33 mmol) de cloruro de oxalilo y 10 mL de DMF anhidro. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. Al residuo se le añadió 5 mL de cloruro de metileno y se concentró. El proceso anterior de adición de 5 mL cloruro de metileno y concentración se repitió tres veces más para proporcionar el cloruro de diácido (compuesto 28). Este se utilizó en el siguiente paso sin más purificación.

Preparación de enlazante aromático protegido di-osmio dibipiridil histamina trifluoroacetamido (Compuesto 29):

- 10 Osmio dibipiridil t-Boc histamina (compuesto 4), 320 mg (0,407 mmol) se disolvió en 8 mL de cloruro de metileno y 8 mL de ácido trifluoroacético. Tras la agitación la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 20 minutos, se eliminaron los disolventes. Se añadió entonces cloruro de metileno y después se eliminó al vacío. La adición y eliminación de cloruro de metileno se repitió tres veces más. Entonces el sólido resultante se disolvió en 3 mL de cloruro de metileno y se dejó agitar a temperatura ambiente. Una solución de todo el (compuesto 28) (preparado anteriormente) en 3 mL de cloruro de metileno se añadió a la mezcla de reacción seguido de la adición de 2 mL (14,3 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante tres días. Entonces la mezcla se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 55,9 mg (0,033 mmol, 23%) del complejo diosmio aromático trifluoroacetamido protegido (compuesto 29) (CL/EM M+H 1614,3) y 71,8 mg (0,070 mmol, 48%) del complejo mono-osmio aromático trifluoroacetamido protegido. (compuesto 30) (CL/EM M+H 983,2) con 69,2 mg recuperados de osmio(bPy)₂(histamina)Cl (compuesto 5).
- 15
- 20

Preparación de enlazante aromático di-osmio dibipiridil histamina [enlazante Di-osmio aromático] (Compuesto 31):

- 25 A 53,6 mg (0,031 mmol) de complejo di-osmio aromático trifluoroacetamido protegido (compuesto 29) se añadieron 25 mL de carbonato de potasio 50 mM y 10 mL de metanol. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante tres días y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 24 mg (0,015 mmol, 47 %) de enlazante aromático di-osmio dibipiridil histamina (compuesto 31) como un polvo marrón, CL/EM M+H 1519,2.

Preparación de conjugado di-osmio dibipiridil histamina THC-1 [conjugado di-osmio THC-1] (Compuesto 32):

- 30 A 11 mg ($6,9 \times 10^{-3}$ mmol) de enlazante aromático di-osmio dibipiridil histamina (compuesto 31) se añadieron 1,96 mL de DMF, 196 μ L (1,40 mmol) de trietilamina y 7,86 mg (0,0178 mmol) de derivado éster THC-1-NHS (compuesto 18). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 18 horas y se concentró. CL/EM indicó la formación del producto deseado, (CL/EM M+H 1846,4). La reacción anterior se repitió al mezclar 8 mg ($5,03 \times 10^{-3}$ mmol) de enlazante aromático di-osmio dibipiridil histamina (compuesto 31), 1,43 mL DMF, 143 μ L (1,01 mmol) de trietilamina y 5,72 mg (0,012 mmol) de THC-1-NHS (compuesto 18). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. Ambos productos de reacción se mezclaron y purificaron mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 8,7 mg ($4,5 \times 10^{-3}$ mmol, 11%) de conjugado di-osmio THC-1 (compuesto 32) como un polvo marrón, (LC/MS, M+H 1846,4).
- 35

Preparación de enlazante osmio-PEG t-Boc protegido (Compuesto 35):

- 40 A 120 mg (0,20 mmol) de O-(N-Boc-2-aminoetil)-O-(N-diglicolil)-2-aminoetil hexaetilenglicol (compuesto 33), (Nova Biochem) se añadieron 2 mL de cloruro de metileno, 128 mg (0,67 mmol) de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, 72 mg (0,62 mmol) de N-hidroxisuccinimida. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. El éster PEG NHS resultante activado (compuesto 34) se utilizó in situ en el siguiente paso sin aislarse.

- 45 A 120 mg (0,15 mmol) de osmio dibipiridil t-Boc histamina (compuesto 4) se añadió 2,5 mL de ácido trifluoroacético y la mezcla resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró y se añadió 15 mL de cloruro de metileno y se concentró hasta la sequedad. Se añadió al residuo 1,5 mL de DMF seguido de 500 μ L (mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente y se añadió por goteo la solución de éster PEG NHS activado (compuesto 34) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 93 mg (0,074 mmol, 36%) de enlazante PEG osmio t-Boc protegido (compuesto 35) como un polvo marrón, CL/EM M+H 1216,4.
- 50

Preparación de enlazante PEG osmio (Compuesto 36):

- 55 A 90 mg (0,071 mmol) de enlazante PEG osmio t-Boc protegido (compuesto 35) se añadió 2 mL de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 40 minutos y se concentró para proporcionar 81 mg (0,070 mmol, 99%) de enlazante PEG osmio (compuesto 36) como una goma

espesa marrón oscuro, CL/EM M+H 1116,2.

Preparación de conjugado osmio PEG THC-2 (Compuesto 37):

5 A 39 mg (0,033 mmol) de enlazante PEG osmio (compuesto 36) se añadieron 1 mL de DMF y 200 μ L (1,43 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y se añadió por goteo una solución de 16 mg (0,032 mmol) de éster THC-2 NHS (compuesto 16) en 1 mL de cloruro de metileno a la mezcla de reacción. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 10,2 mg ($6,6 \times 10^{-3}$ mmol, 20%) de conjugado osmio PEG THC-2 (compuesto 37), CL/EM M+H 1501,6.

Conjugado osmio PEG metotrexato (Compuesto 38):

10 A 19 mg (0,041 mmol) de metotrexato (Sigma) se añadió 0,4 mL de DMF anhidro seguido de 8 mg (0,06 mmol) de 4-nitrofenol y 9 mg (0,043 mmol) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 horas y el éster resultante activado (compuesto 20) se utilizó in situ en el siguiente paso sin aislar.

15 A 22,9 mg (0,019 mmol) de enlazante PEG osmio (compuesto 36) se añadió 500 μ L de DMF seguido de 100 μ L (0,71 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente y se añadió por goteo la solución de éster de metotrexato activado preparado anteriormente (compuesto 20). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 7,8 mg ($4,9 \times 10^{-3}$ mmol, 25%) de conjugado osmio PEG metotrexato (compuesto 38), CL/EM M+H 1554,5.

20 Preparación de clorhidrato de 4-amino-heptanodioato de dietilo (Compuesto 39):

25 A 2 g (8,6 mmol) de dietil 4-oxopimelato se añadió 20 mL de metanol, seguido de 6,7 g (86 mmol) de acetato de amonio, 713 mg (8,6 mmol) de acetato de sodio, y 5 mL de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró. Se añadió al residuo 150 mL de acetato de etilo y 100 mL de solución saturada acuosa de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con 100 mL adicionales de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron dos veces con 100 mL de bicarbonato de sodio saturado, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron para proporcionar un aceite. Al aceite se añadieron 5 mL de HCl 2M en dietiléter. Un precipitado sólido blanco se filtró para proporcionar 1,2 g (4,48 mmol, 52%) del producto amino como una sal de clorhidrato (compuesto 39).

Preparación de 4-terc butoxicarbonilamino-heptanodioato de dietilo (Compuesto 40):

30 A 500 mg (1,86 mmol) del producto amino (compuesto 39) se añadió 15 mL de cloruro de metileno seguido de 1,2 mL (8,5 mmol) de trietilamina. A la mezcla de reacción se añadió 646 mg (2,95 mmol) de di-t-butildicarbonato seguido de 25 mg (1,12 mmol) de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró bajo presión reducida. Al residuo se añadió 150 mL de cloroformo y se lavó dos veces con 100 mL de agua. La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró para proporcionar un aceite.

35 Este se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando hexano:acetato de etilo 8:2 para proporcionar 396 mg (1,19 mmol, 64%) del producto 4-terc butoxicarbonilamino- heptanodioato de dietilo (compuesto 40).

Preparación de ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-heptanodioico (Compuesto 41):

40 Se disolvió 4-terc butoxicarbonilamino- heptanodioato de dietilo (compuesto 40), 380 mg (1,14 mmol), en THF que contenía 3 mL de metanol. A la mezcla de reacción se añadió una solución de 481 mg (11,5 mmol) de hidróxido de litio hidratado en 6 mL de agua y la mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Esta se concentró bajo presión reducida. Se añadieron cinco mL de agua y el pH de la solución se ajustó a pH-5 utilizando H_3PO_4 conc.. La mezcla de reacción se extrajo 3 veces con 75 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron para proporcionar 310 mg (1,12 mmol) del

45 (compuesto 41) como un polvo blanco [LR-MSER (-) (M-H 274,2)].

Preparación de 4-terc-butoxicarbonilamino-heptanedioato de bis-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo) (Compuesto 42):

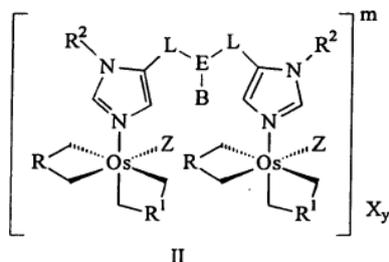
50 A 44 mg (0,15 mmol) de ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-haptanodioico (compuesto 41) se añadieron 5 mL de cloruro de metileno, 76 mg (0,39 mmol) de clorhidrato de 1,3-dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimida y 46 mg (0,39 mmol) de N-hidroxisuccinimida. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió 15 mL de cloruro de metileno. La capa orgánica se lavó dos veces con 15 mL de agua, dos veces con 15 mL de bicarbonato de sodio saturado y una vez con 15 mL de agua. La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 39 mg (0,08 mmol, 52%) del producto 4-terc-butoxicarbonilamino-heptanedioato de bis-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo) (compuesto 42) como un sólido blanco.

Preparación de enlazante alifático di-osmio t-Boc protegido (Compuesto 43):

- 5 A 20 mg (0,040 mmol) de 4-terc-butoxicarbonilamino- heptanedioato de bis-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo) (compuesto 42) se añadió 44 mg (0,064 mmol) de osmio(bPy)₂(histamina)Cl (compuesto 5), seguido de 2 mL de cloruro de metileno y 0,5 mL de DMF. A la mezcla de reacción se añadió 200 µL (1,43 mmol) de trietilamina y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas necesarias para completar la reacción. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar el enlazante alifático di-osmio t-Boc protegido (compuesto 43).
- Preparación de enlazante alifático di-osmio (Compuesto 44):
- 10 A 10 mg de enlazante alifático di-osmio t-Boc protegido (compuesto 43) se añadió 1 ml de ácido trifluoroacético y se dejó en agitación a temperatura ambiente entre 1-2 horas. Este se concentró bajo presión reducida para proporcionar enlazante alifático di-osmio (compuesto 44).
- Preparación de biimidazol (Compuesto 45):
- 15 A 25 ml de glioxal (40 % de peso en agua) se añadió 25 mL de agua. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se burbujó amoníaco gas lentamente a través de la mezcla durante 7 horas. La mezcla de reacción se filtró para proporcionar 710 mg de bidiimidazol (compuesto 45) como un polvo gris coloreado. Este se utilizó en el siguiente paso sin más purificación, CL/EM M+H 135,0.
- Preparación de dimetil biimidazol (Compuesto 46):
- 20 A 60 mg (0,44 mmol) de biimidazol se añadió 1 mL de DMF anhidro. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió 27 mg (0,67mmol) de NaH (60% en aceite). La mezcla de reacción se dejó agitar a 0°C durante 1 hora. Se añadió 140 µL (0,92 mmol) de metil p-tolueno sulfonato y la mezcla de reacción se dejó agitar 1h adicional a 0°C y después dos días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice utilizando acetato de etilo 50% en metanol para proporcionar 60 mg (0,36 mmol, 83%) de dimetil biimidazol (compuesto 46), CL/EM M+H 163,1.
- Preparación de dicloruro de osmio di biimidazol (Compuesto 47):
- 25 A 150 mg (0,50 mmol) de OsCl₃ se añadió 112 mg (0,69 mmol) de dimetilbiimidazol (compuesto 46) seguido de 280 mg (6,6 mmol) de cloruro de litio y 10 mL de DMF anhidro. La mezcla de reacción resultante se dejó a reflujo bajo atmósfera de argón durante 3,5h y se concentró. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparative para proporcionar 95 mg (0,15 mmol, 30 %) de dicloruro de osmio di biimidazol (compuesto 47) como un polvo marrón oscuro, CL/EM M+H 586,0.
- Preparación de osmio dibiimidazol hist-t-Boc (Compuesto 48):
- 30 A 50 mg (0,080 mmol) de dicloruro de osmio dibiimidazol (compuesto 47) se añadió 71 mg (0,33 mmol) de [2-(1H-Imidazol-4-il)-etil]-carbamato de terc-butilo (compuesto 3), seguido de 300 µL (2,14 mmol) de trietilamina y 10 mL de etanol. La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase reversa para proporcionar 13 mg (0,016 mmol, 20%) de osmio di-biimidazol hist-t-Boc (compuesto 48) como un polvo marrón oscuro CL/EM M+H 761,2.
- 35 Preparación de enlazante osmio (dimetil biimidazol)₂ histamina (Compuesto 49):
- 40 A 4 mg (5,02 x 10⁻³ mmol) de osmio dibiimidazol hist-t-Boc (compuesto 48) se añadieron 750µL de cloruro de metileno y 750µL de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se concentró bajo presión reducida. Se añadió 5 mL de cloruro de metileno al residuo y se concentró. La adición de cloruro de metileno y el proceso de concentración se repitió tres veces más y el residuo se secó para proporcionar 3 mg (4,3 x 10⁻³ mmol, 88%) de enlazante osmio (dimetil biimidazol)₂ histamina (compuesto 49), CL/EM M+H 661,1.
- 45 El enlazante osmio (dimetil biimidazol)₂ histamina se preparó como ejemplo de un mediador que tendrá un potencial rédox bajo. Los potenciales rédox bajos son de interés para los ensayos electroquímicos para evitar la interferencia de compuestos que oxidan fácilmente a potenciales más altos. Los mediadores bajos son también necesarios para los métodos de mediadores mezclados en los que el potencial rédox de cada mediador necesita separarse por un mínimo de 50-100 mV para permitir la medición independiente de cada mediador con un bipotenciostato tal como se discute en la patente EE.UU. Nº 6.294.062. Se realizó una VC con material no purificado de este mediador al disolver 1 mg del mediador en 1 ml de PBST para una concentración de alrededor de 1,4 mM. La VC indicó que el potencial E_{1/2} para este mediador fue significativamente inferior que los otros mediadores preparados. El potencial
- 50 E_{1/2} fue de alrededor de -520 mV vs. Ag/AgCl.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula II:



5 en el que R y R1 son los mismos o diferentes y cada uno puede seleccionarse entre: 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 1,10-fenantrolinilo, 4,7-disustituido-1,10-fenantrolinilo, 5,6-disustituido-1,10-fenantrolinilo, o N, N'-dimetil 2,2'-biimidazol, en el que cada sustituyente es un grupo metilo, etilo, o fenilo, y en el que los grupos R y R1 están coordinados con osmio a través de sus átomos de nitrógeno; R2 es hidrógeno, metilo, o etilo; --L--es un enlazante; E es un enlazante trivalente; B es un grupo que comprende un ligando capaz de unirse a una pareja de unión de analito específica; Z es cloro o bromo; X es un contraión; y y se selecciona para proporcionar una sal neutra; y m es de 2 a 4.

10 2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R y R1 son los mismos y se seleccionan entre 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, o 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo sustituido con un grupo metilo, etilo o fenilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 en el que L comprende $-(CH_2)_nQ-$, Q es O, NR3 o S en el que R3 es H, CH3 o C2H5, y n es un número entero entre 1 y 10.

15 4. El compuesto de la reivindicación 1 en el que L es $-(CH_2)_nN-$ y n es un número entero entre 1 y 10.

5. El compuesto de la reivindicación 1 en el que E comprende un grupo aromático tridentado.

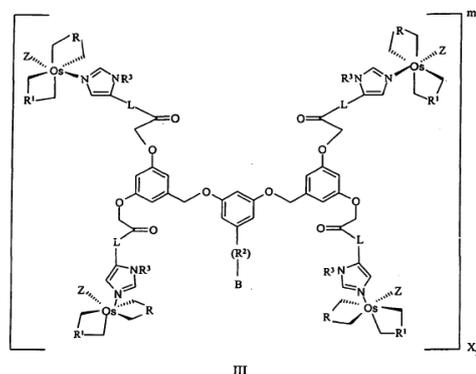
6. El compuesto de la reivindicación 1 en el que E comprende un grupo alifático tridentado con uno o más sustituyentes de oxígeno.

20 7. El compuesto de la reivindicación 1 en el que B comprende un epítipo reconocible por un anticuerpo capaz de unirse de forma específica a un analito.

8. El compuesto de la reivindicación 1 en el que B comprende un epítipo capaz de unirse a un analito seleccionado entre el grupo que consiste en: un agente de guerra biológica, una sustancia de abuso, un agente terapéutico, un contaminante ambiental, una proteína o una hormona.

25 9. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X se selecciona entre el grupo de : cloruro, bromuro, yoduro, fluoruro, tetrafluoroborato, perclorato, nitrato, sulfato, carbonato, y sulfito.

10. Un compuesto de fórmula III:



35 en el que, R y R1 son los mismos o diferentes y cada uno puede seleccionarse entre: 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-

- 2,2'-bipiridilo, 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridilo, 1,10-fenantrolinilo, 4,7-disustituido-1,10-fenantrolinilo, 5,6-disustituido-1,10-fenantrolinilo, o N, N'-dimetil 2, 2'-biimidazol, en el que cada sustituyente es un grupo metilo, etilo, o fenilo, y en el que los grupos R y R1 están coordinados con Os a través de sus átomos de nitrógeno, R2 es una cadena recta o ramificada, sustituida o sin sustituir, saturada o insaturada, grupo hidrocarbilo con 1-10 átomos de carbono; -R3 es H, CH3 o C2H5; L es (CH2)_iQ en el que i es un número entero entre 1 y 10, y Q es O, S, o NR₃; B es un grupo que comprende un ligando capaz de unirse a una pareja de unión de analito específica; X es un contraión; y se selecciona para proporcionar una sal neutra; y m es de 4 a 8.
- 5 11. El compuesto de la reivindicación 10 en el que R y R1 son los mismos y se seleccionan entre 2,2'-bipiridilo, 4,4'-disustituido-2,2'-bipiridilo, o 5-5'-disustituido-2,2'-bipiridil sustituido con un metilo, un etilo o un grupo fenilo.
- 10 12. El compuesto de la reivindicación 10 en el que L es -(CH₂)_nNR₃ y n es un número entero entre 1 y 10.
13. El compuesto de la reivindicación 10 en el que el sustituyente R2 es un grupo alifático saturado que tiene entre 1 y 10 carbonos.
14. El compuesto de la reivindicación 10 en el que B comprende un epítipo reconocible por un anticuerpo capaz de unirse de forma específica a un analito.
- 15 15. El compuesto de la reivindicación 10 en el que B comprende un epítipo capaz de unirse a un analito seleccionado del grupo que consiste en: un agente de guerra biológica, una sustancia de abuso, un agente terapéutico, un contaminante ambiental, una proteína o una hormona.
16. El compuesto de la reivindicación 10 en el que L es -(CH₂)_nS y n es un número entero entre 1 y 10.
- 20 17. El compuesto de la reivindicación 10 en el que X se selecciona de entre el grupo de: cloruro, bromuro, yoduro, fluoruro, tetrafluoroborato, perclorato, nitrato, sulfato, carbonato, y sulfito.

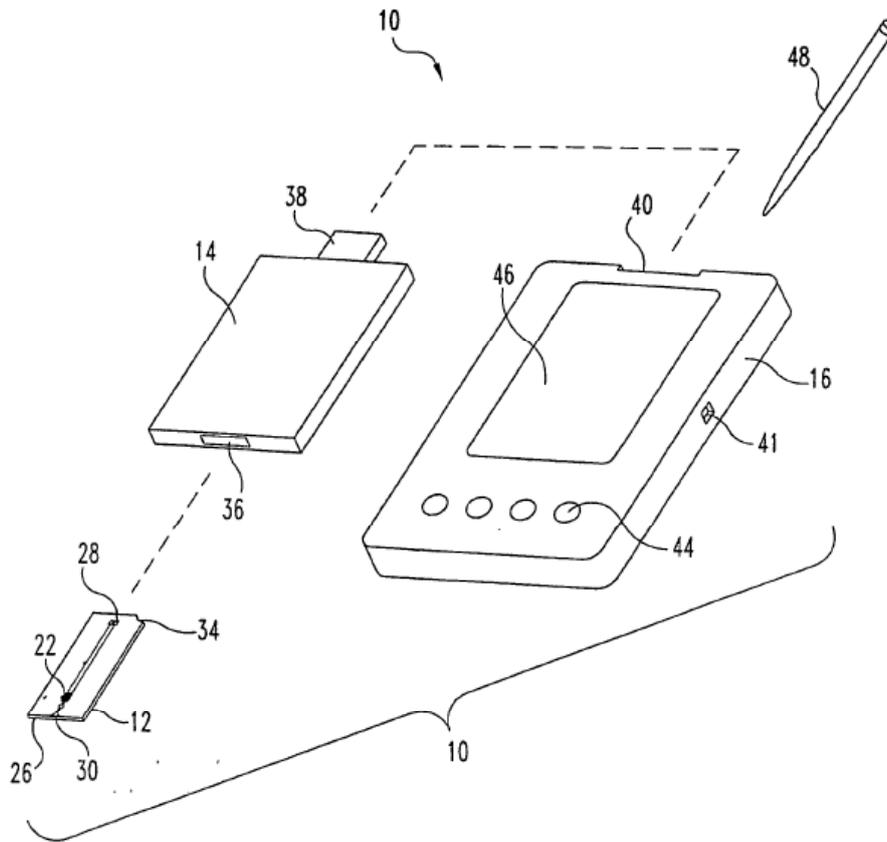


Fig. 1

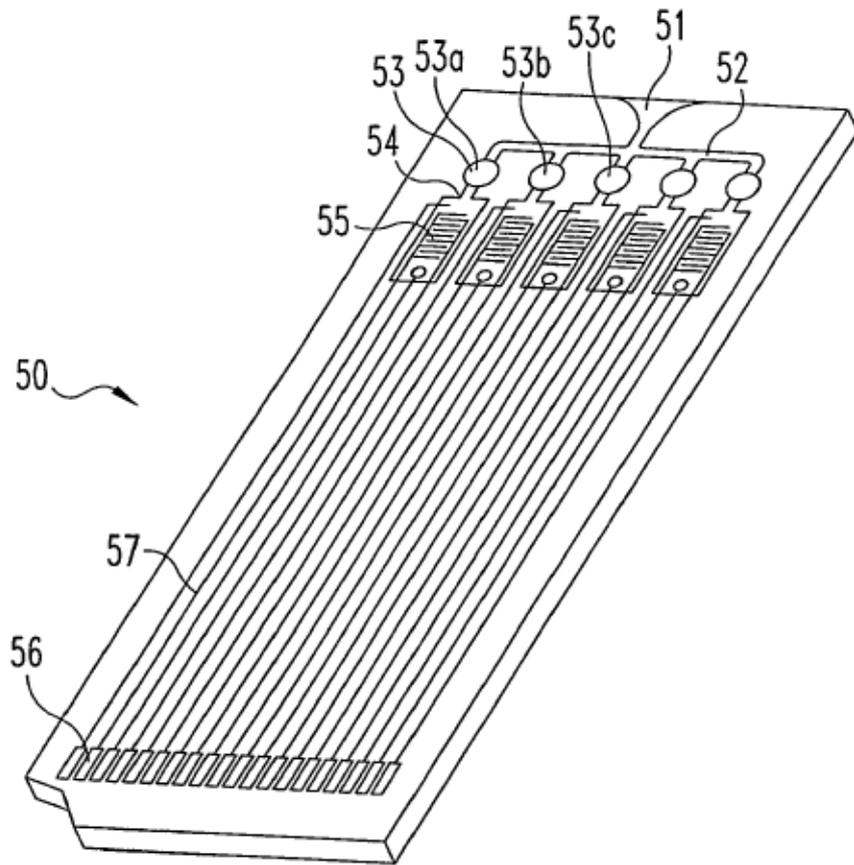


Fig. 2

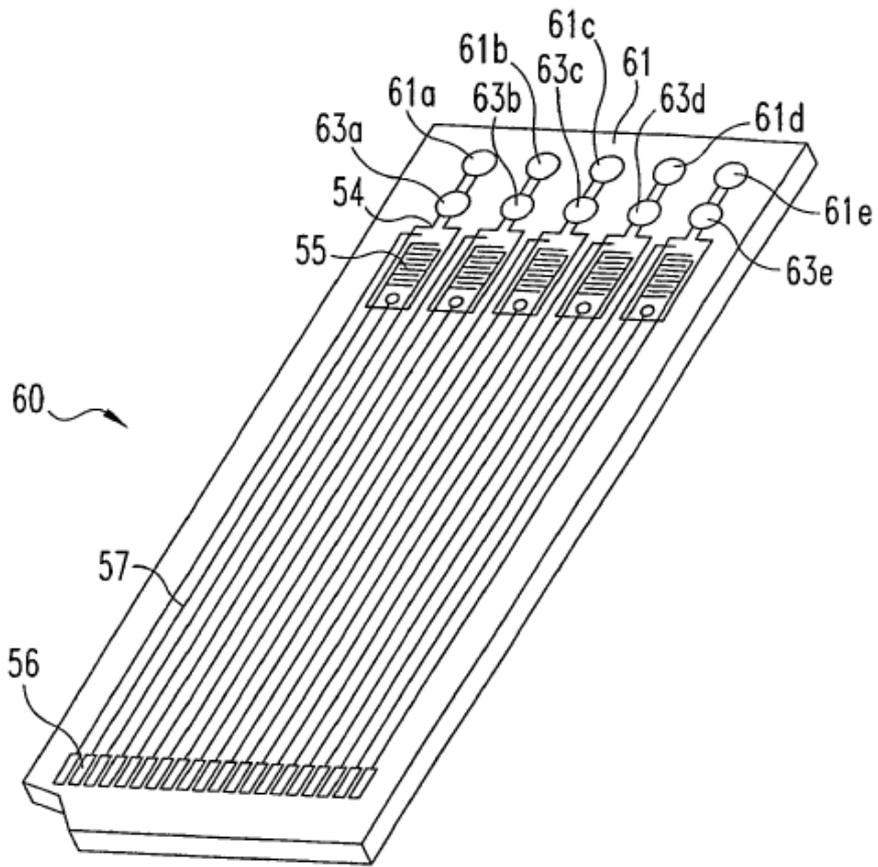
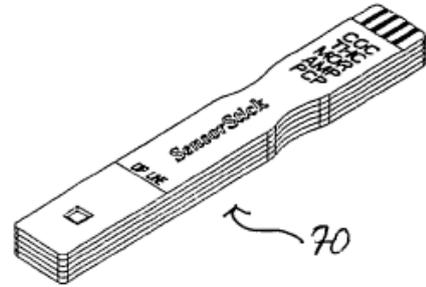
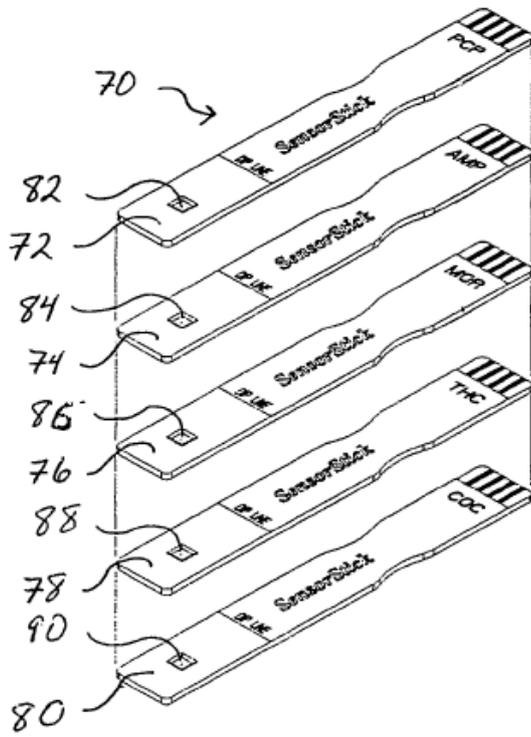


Fig. 3



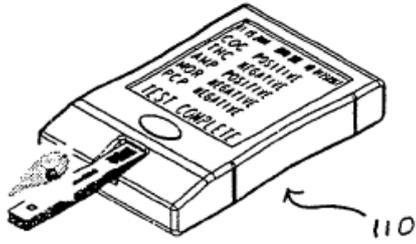


Fig. 7

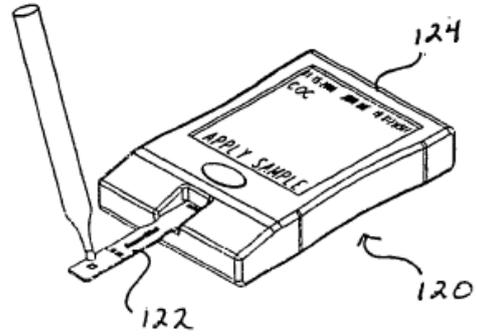


Fig. 8

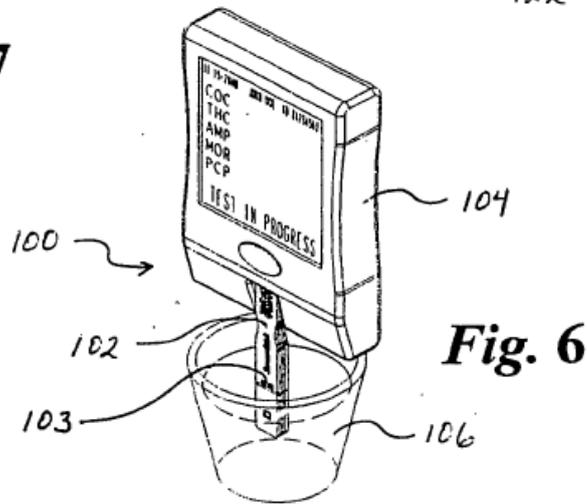


Fig. 6

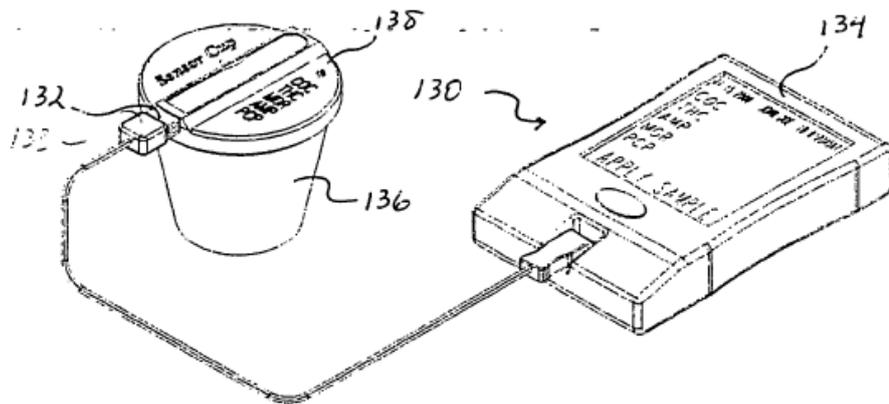


Fig. 9

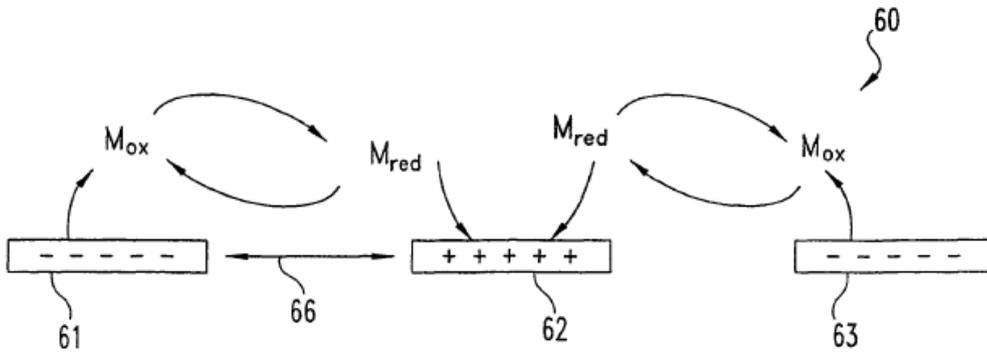


Fig. 10

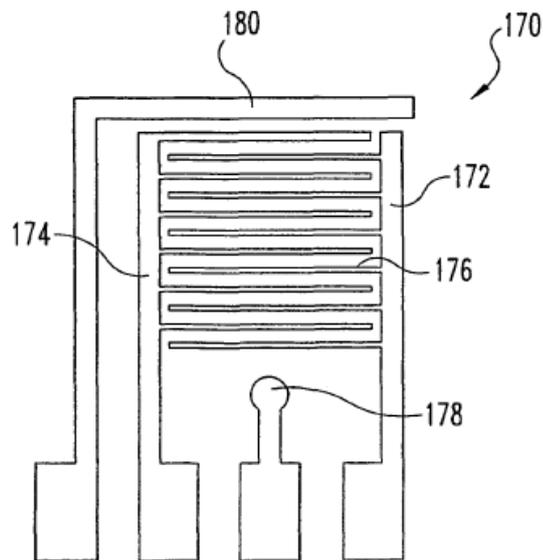


Fig. 11

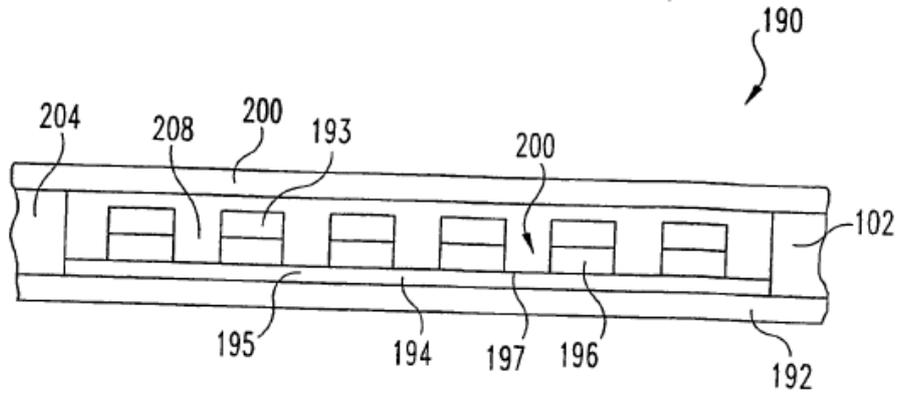


Fig. 12

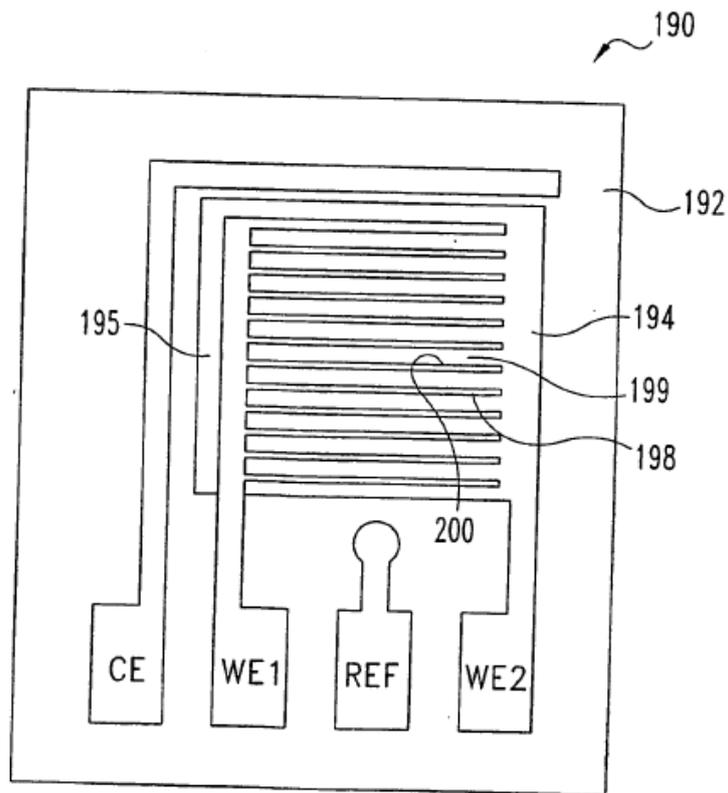


Fig. 13

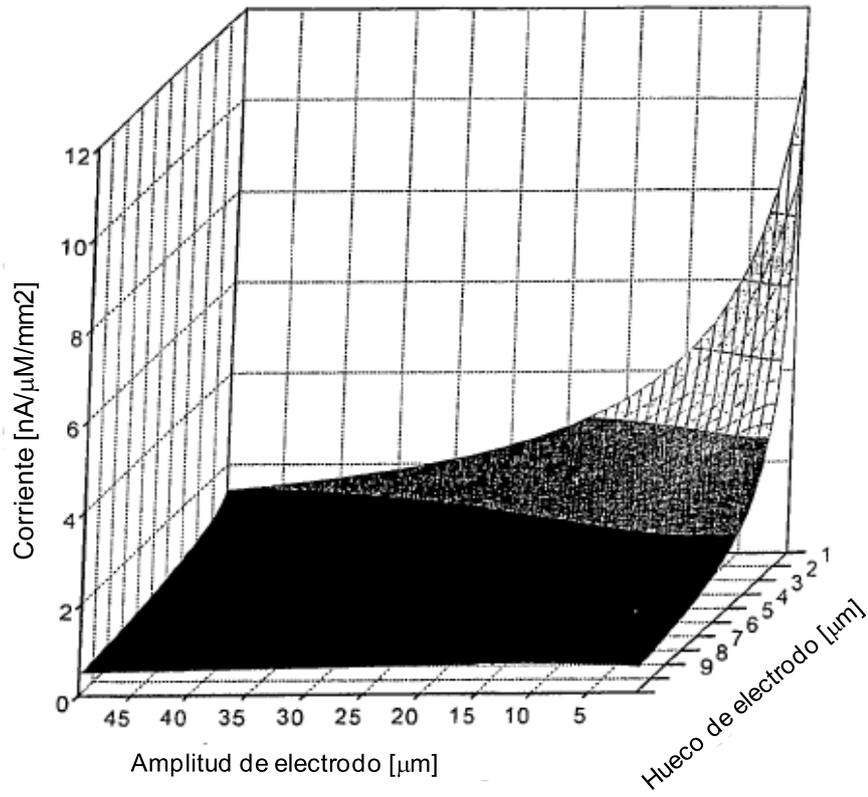


Fig. 14

Tabla 3

Electrodo	Nº de pares de electrodos	amplitud de hueco (µm)	amplitud de banda (µm)	longitud de banda (mm)	Área total de dedos de electrodos 1 (mm ²)	Área física de los dedos (mm ²)	Pendiente predicha de la ecuación (nA/µM)	Pendiente 1 experimental del reciclaje de VC (nA/µM)	Pendiente 2 experimental de la respuesta a dosis (nA/µM)	Pendiente normalizada predicha (nA/µMmm ²)	Pendiente experimental normalizada (nA/µMmm ²)	Comentarios
MVEID oblea de Si eliminado parte de CR	46	1.2	50	2.55	5.865	11.73	16.9	12		1.44	1.02	h
MVEID oblea de Si eliminado parte de CR	46	1.5	50	2.55	5.865	11.73	16.1	11		1.37	0.94	h
MVEID oblea de Si eliminado parte de CR	46	2.5	50	2.55	5.865	11.73	14.3	12		1.22	1.02	h
MVEID oblea de Si eliminado parte de CR	46	1.2	50	2.55	5.865	11.73	16.9	7.4-10		1.44	0.63-0.85	i
MVEID oblea de Si eliminado parte de CR	46	1.2	50	2.55	5.865	11.73	16.9	2-7		1.44	0.17-0.6	j
MVEID oblea de Si eliminado parte de CR	46	2.5	50	2.55	5.865	11.73	14.3	4-7.3		1.22	0.34-0.63	k
MVEID ^a sustrato Kapton	46	3	50	2.55	5.865	11.73	13.7	14		1.17	1.19	l
MVEID ^a sustrato Kapton	46	3	50	2.55	5.865	11.73	13.7	7.8		1.17	0.65	l
MVEID	50	10	21	6	6.3	18.6	18.8	20		1.01	1.08	8
MVEID	50	15	21	6	6.3	21.6	16.2	17		0.76	0.79	a
MVEID	50	21	21	6	6.3	25.2	14.3	14		0.57	0.56	a
MVEID	50	10	21	6	6.3	18.6	18.8	17.8		1.01	0.96	b
MVEID	50	15	21	6	6.3	21.6	16.2	14.8		0.75	0.69	b
MVEID	50	21	21	6	6.3	25.2	14.3	14.4		0.57	0.57	b
MVEID	150	5	5	3	2.25	9	21.5	19		2.39	2.11	c
MVEID	150	5	5	3	2.25	9	21.5	14		2.39	1.56	d
MVEID	100	5	5	2	1	4	9.6	11		2.39	2.75	e
MVEID DUAL IP ¹	100	5	5	4.985	2.4925	9.97	23.8	16.5		2.39	1.65	f
MVEID DUAL IP ²	100	5	5	4.985	2.4925	9.97	23.8	15		2.39	1.50	f
MVEID DUAL IP ²	100	5	5	4.985	2.4925	9.97	23.8	12.2		2.39	1.22	g
MVEID	750	2	2	6	9	36	215.0	152		5.97	4.22	
MVEID	600	1	5	6	18	36	300.9			8.36		
MVEID	375	1	8	6	18	36	216.4			6.01		
MVEID	300	1	10	6	18	36	184.3			5.12		
MVEID	200	1	15	6	18	36	136.7			3.80		
MVEID	150	1	20	6	18	36	110.1			3.06		

1. Pendiente calculada del "electrodo colector" del estado estacionario a partir de una VC reciclada con un mediador libre de Osmio 100 µM realizado a 5mV/s

2. Pendiente calculada a partir de una regresión a través de una curva de respuesta a dosis

^a Nota que los valores varían entre diferentes IP¹ de obleas de electrodos. Datos de oblea ID 0800 RD1. NB 33101153CW

^b Nota que los valores varían entre diferentes IP² de obleas de electrodos. Datos de oblea ID 0800 RD1. NB 482050ND

^c NB 33508-47 IA

^d NB 33508-45 IA

^e NB 33508-52 IA

^f NB 33101-148 to 149 CW

^g NB 33101-163CW

^h Los electrodos varían en la oblea y entre obleas (mejor caso de reciclaje informado) NB 33101-94 a 147 CW

ⁱ Los electrodos varían en la oblea y entre obleas. NB 33101-137 a 139 CW

^j Los electrodos varían en la oblea NB 33508 16-22 IA

^k Los electrodos varían en la oblea, las pendientes son más altas cuando ocurre reducción en los dedos de arriba. Pendiente BR no recila = 0.6. NB 33508 2429, 3439 IA

^l Kapton MVEID 0598bm4 50µM, P1273 NB 33101 146-147 CW

Fig. 15

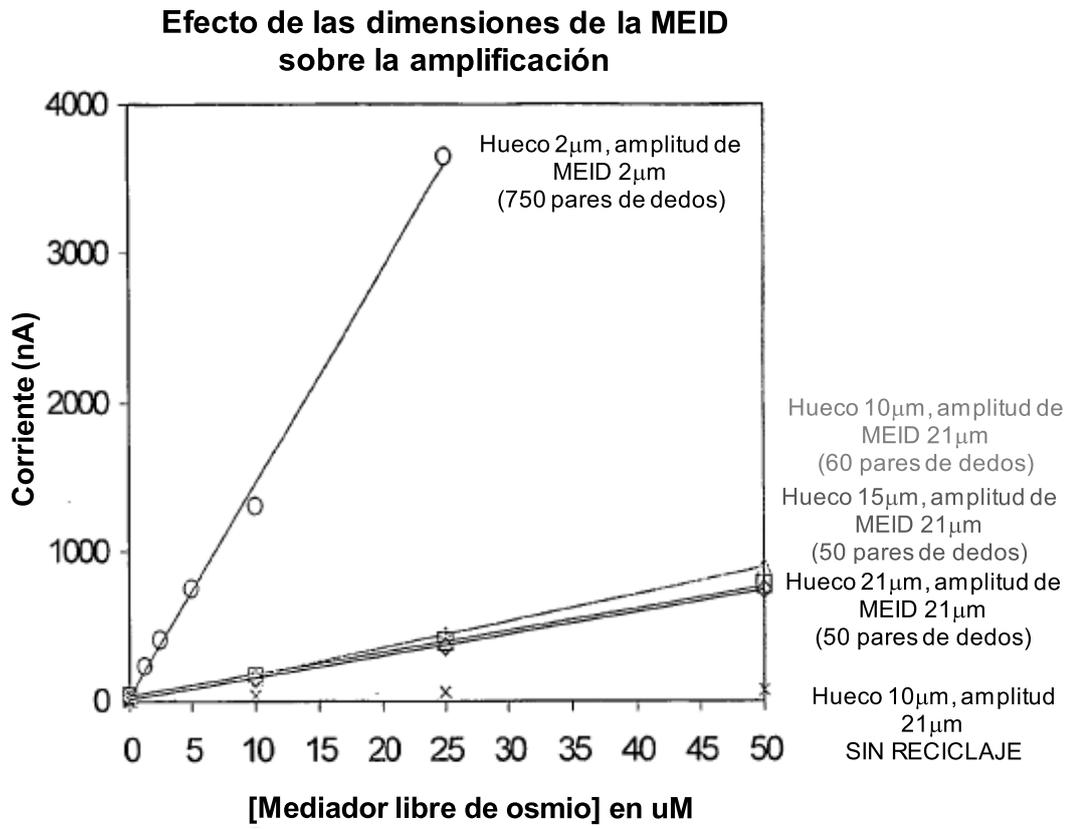


Fig. 16

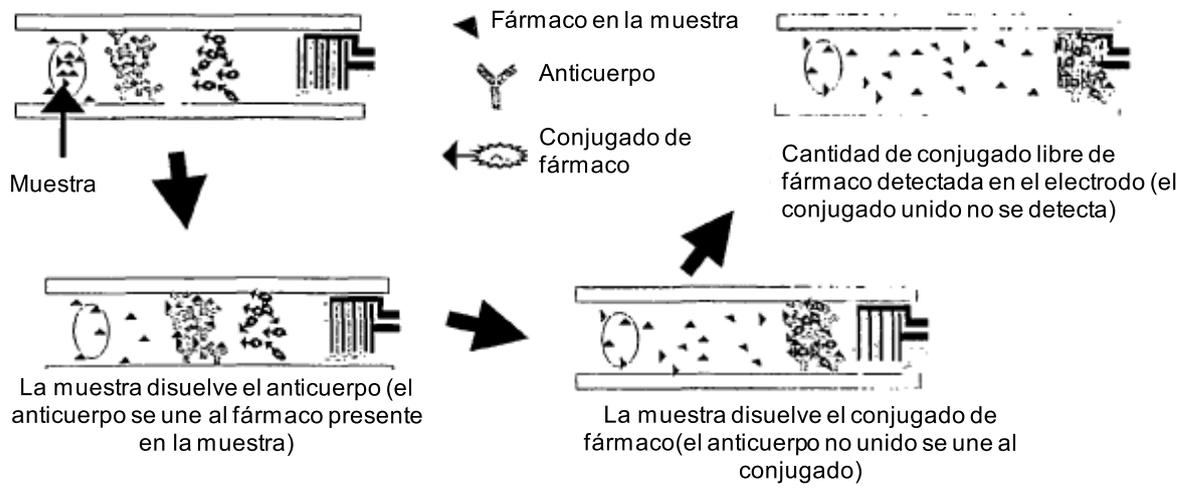


Fig. 17

Síntesis de bis (2,2'-bipiridil)-histamina-cloro-osmio
[osmio(bPy)2(histamina)Cl] (5)

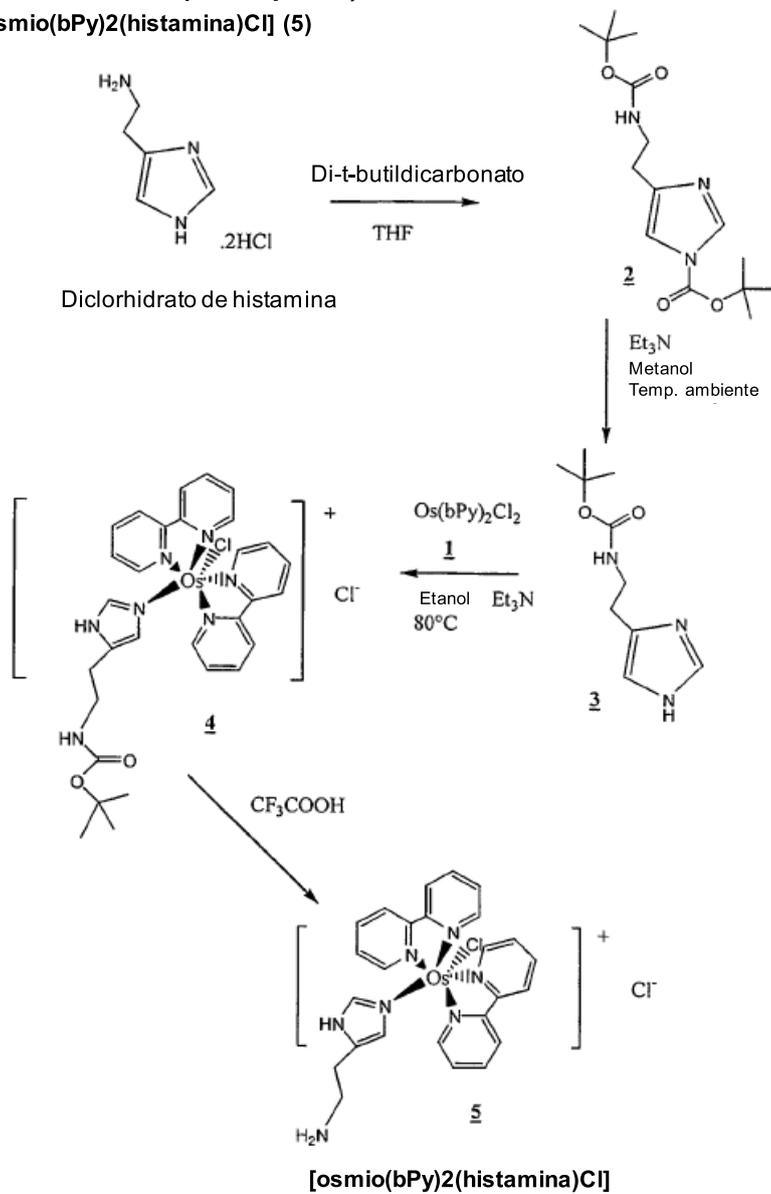


Fig. 18

Síntesis de conjugado anfetamina-osmio (10)

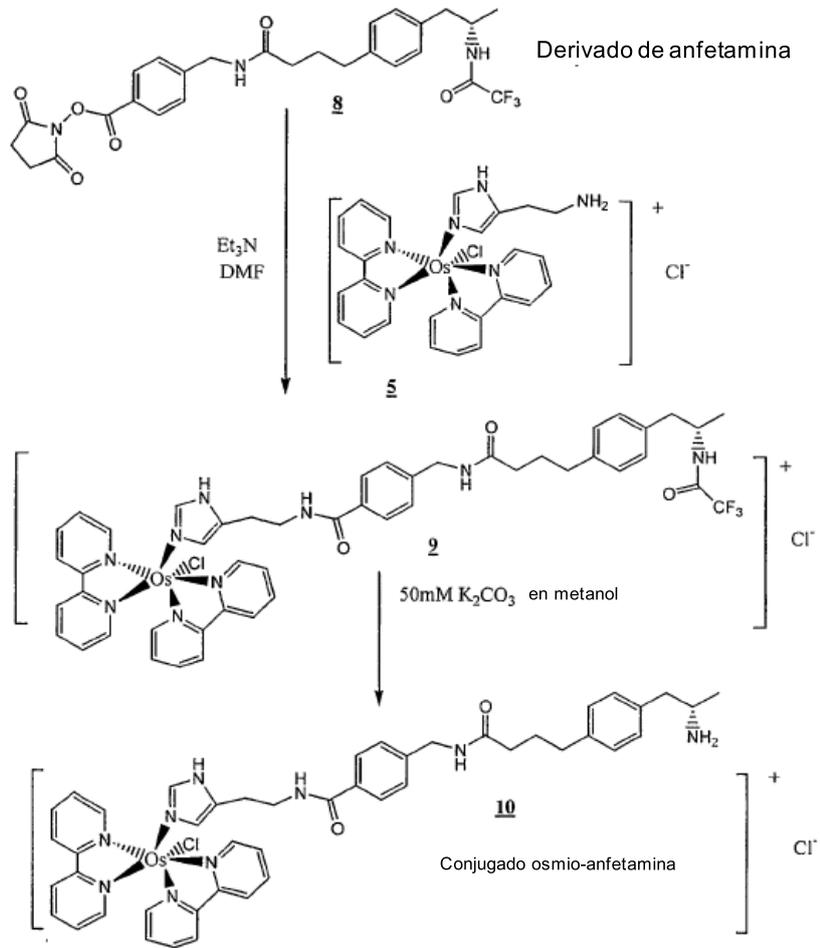


Fig. 19

Síntesis de conjugado osmio-teofilina (13)

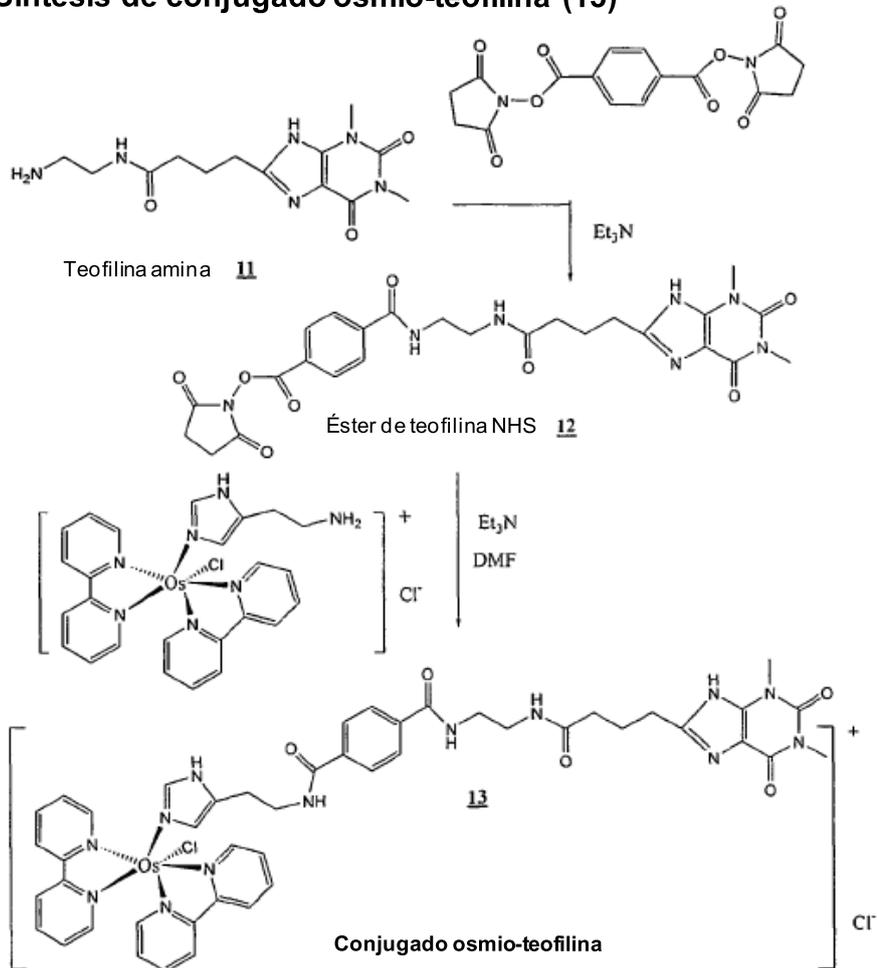
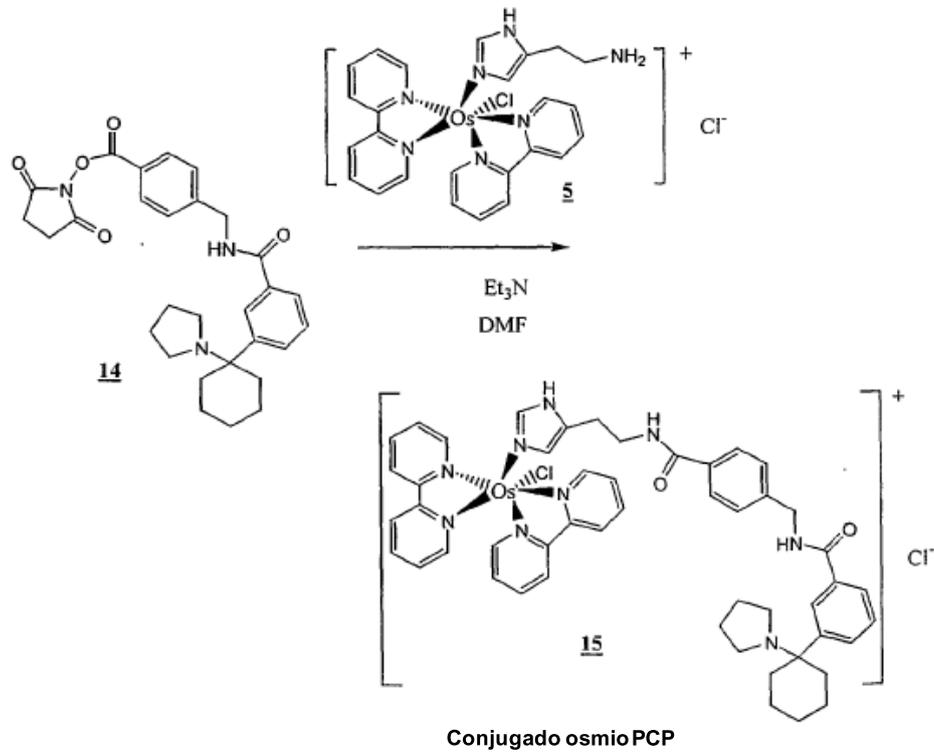
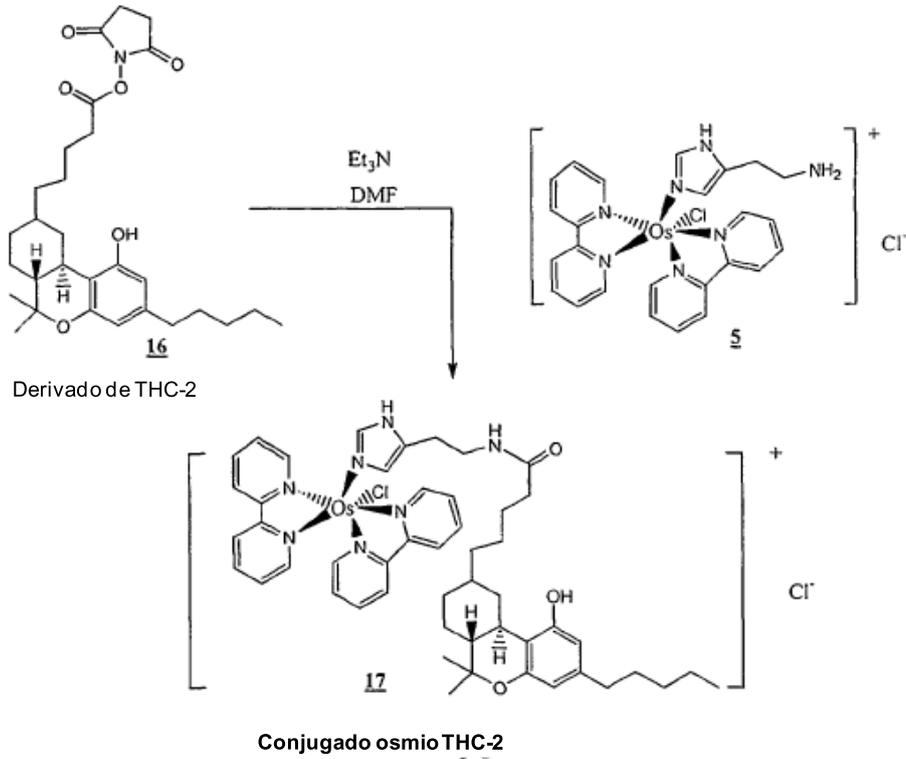


Fig. 20

Síntesis de conjugado osmio PCP (15)**Fig. 21**

Síntesis de conjugado osmio THC-2 (14)

*Fig. 22*

Síntesis de conjugado osmio THC-1 (19)

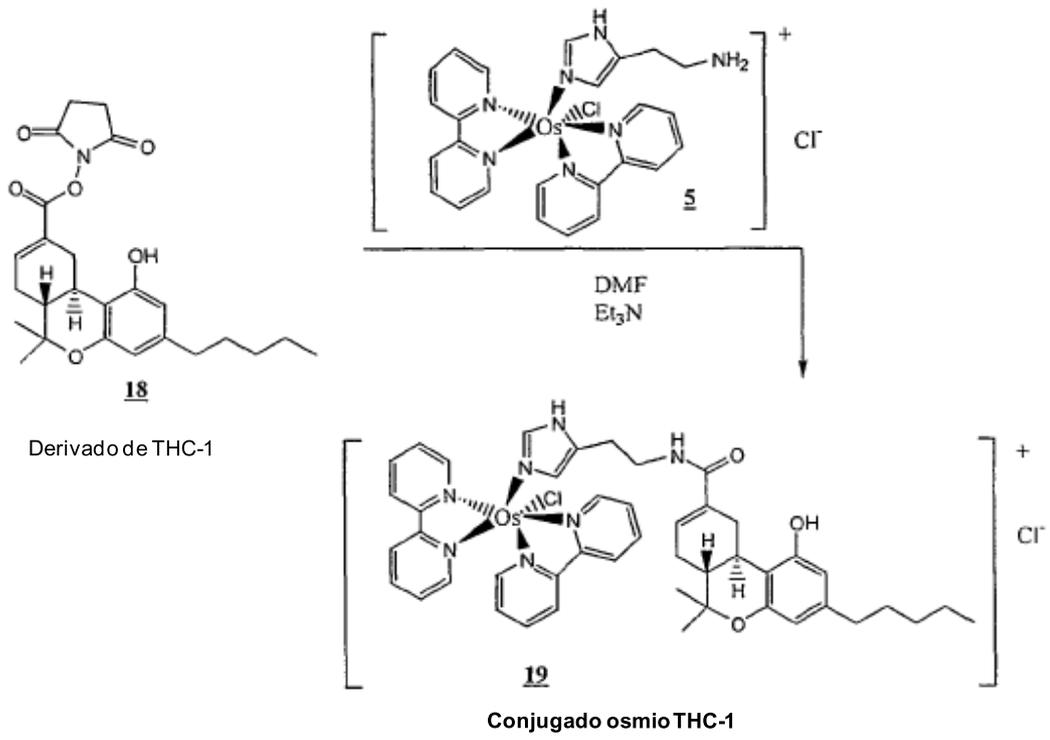
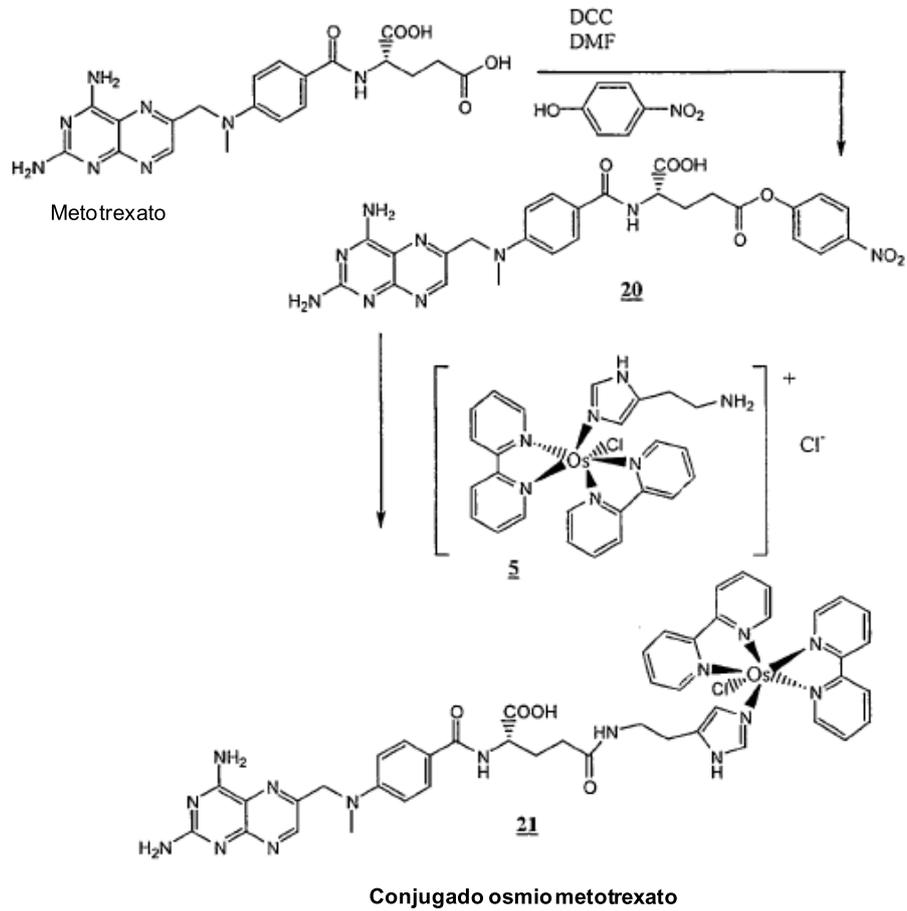
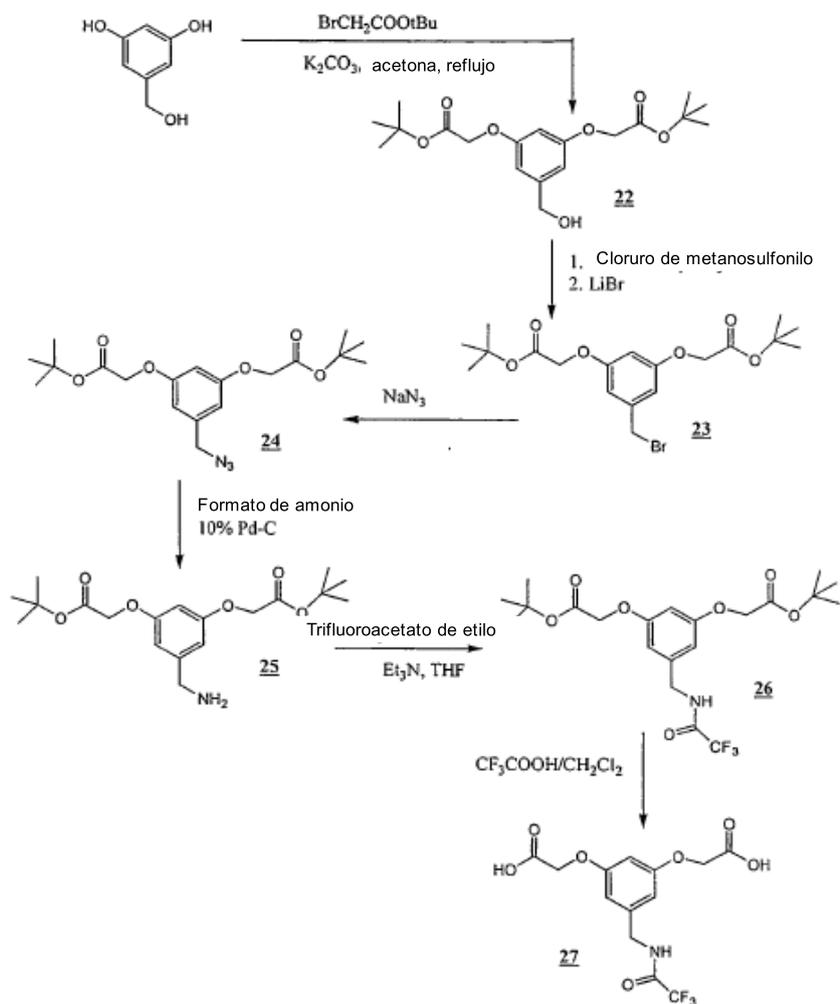


Fig. 23

Síntesis de conjugado osmio Metotrexato (21)**Fig. 24**

Síntesis de enlazante aromático trifluoroacetamido protegido (27)



Enlazante aromático trifluoroacetamido protegido

Fig. 25

Síntesis de enlazante aromático di-osmio trifluoroacetamido protegido (29) y enlazante aromático mono osmio trifluoroacetamido protegido (30)

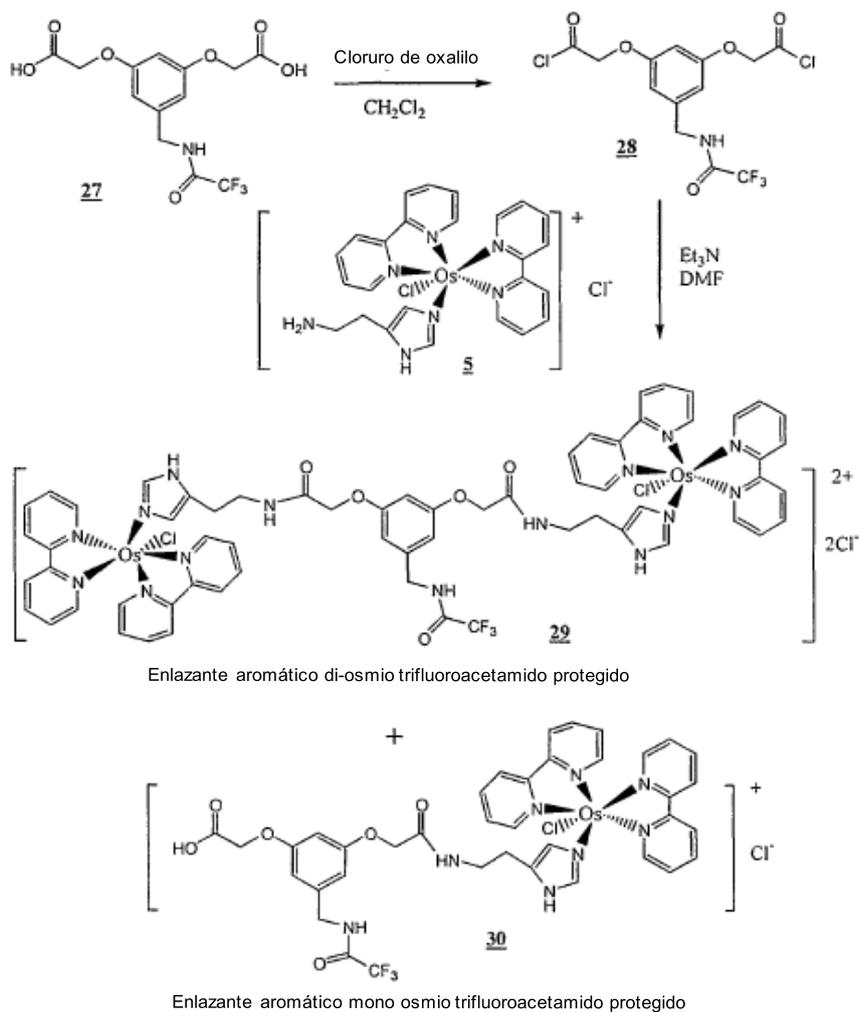


Fig. 26

Síntesis de enlazante aromático di-osmio (31)

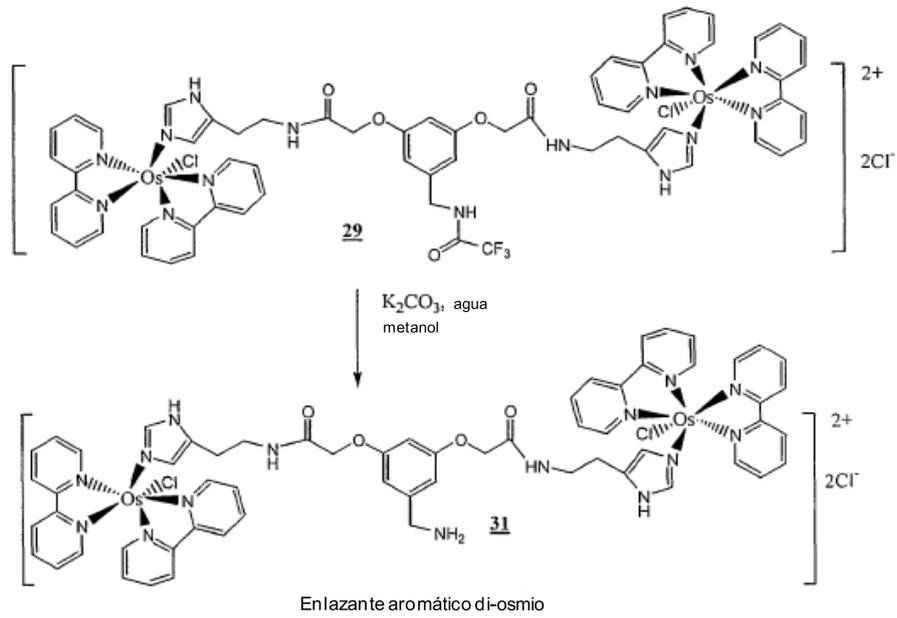


Fig. 27

Síntesis de conjugado di-osmio THC-1 (32)

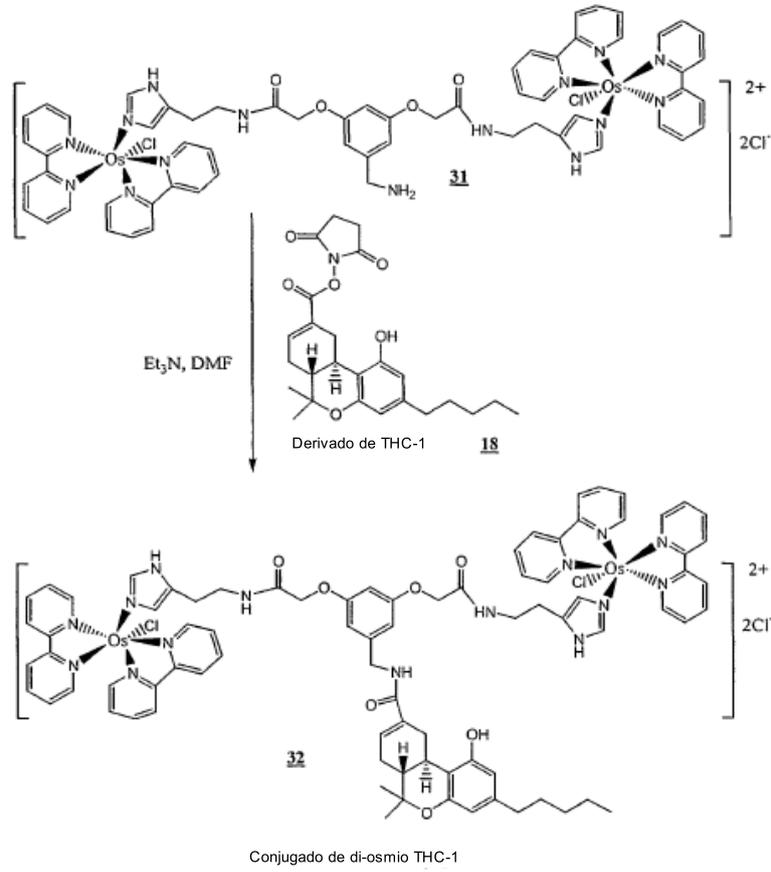


Fig. 28

Síntesis de enlazante alifático di-osmio (44)

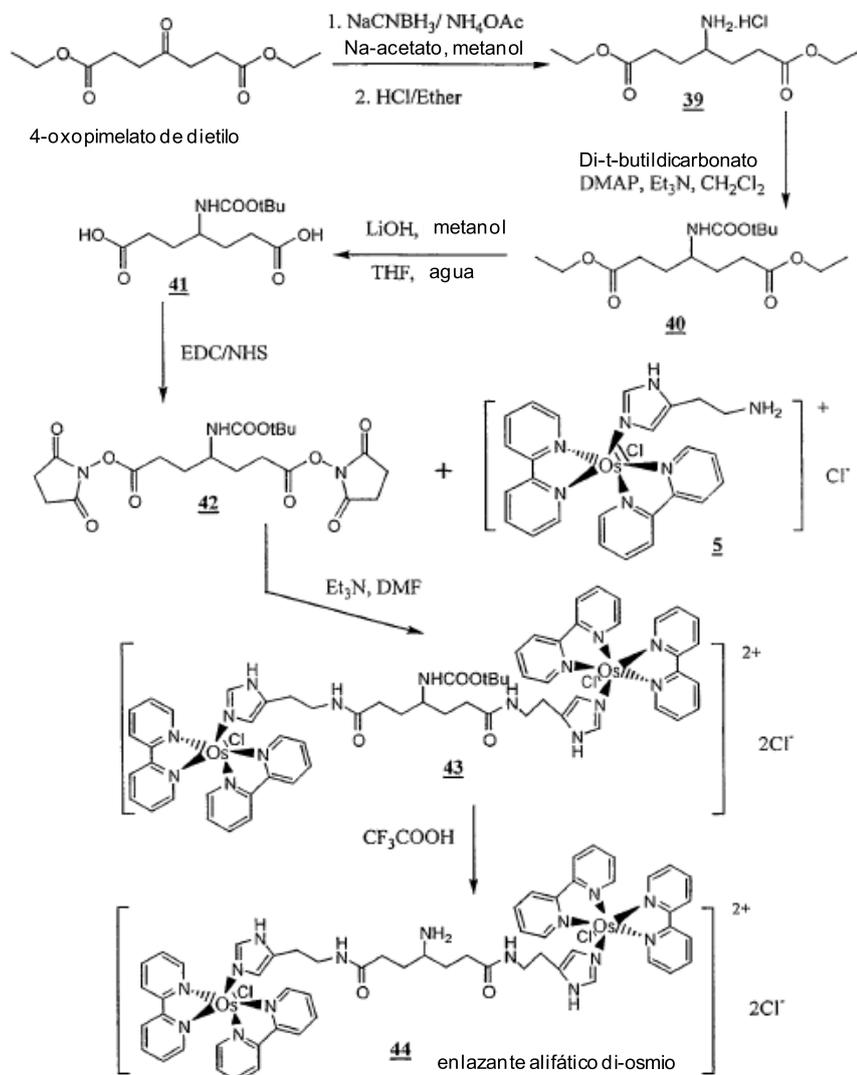


Fig. 29

Síntesis de enlazante osmio-PEG t-Boc protegido (35)

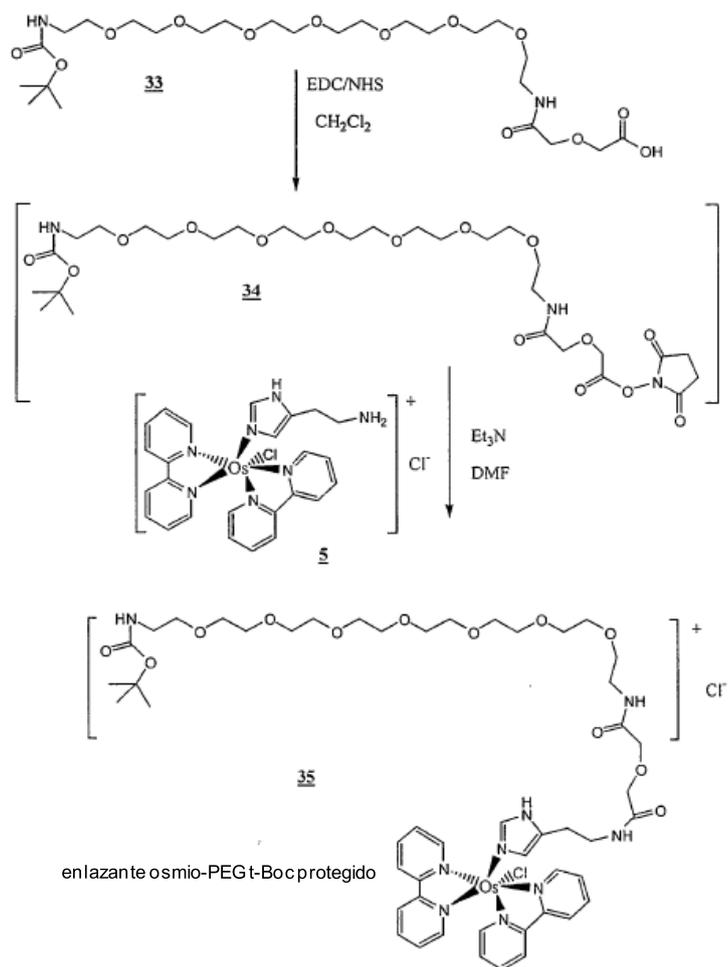
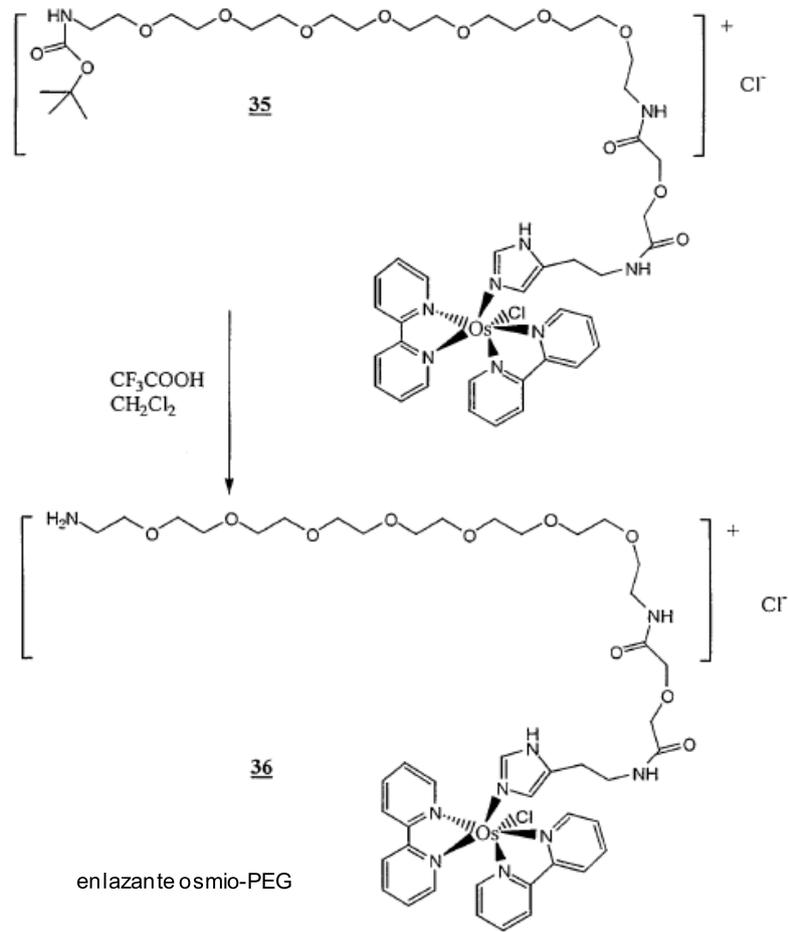


Fig. 30

Síntesis de enlazante osmio-PEG (36)

*Fig. 31*

Síntesis de conjugado osmio-PEG THC-2 (37)

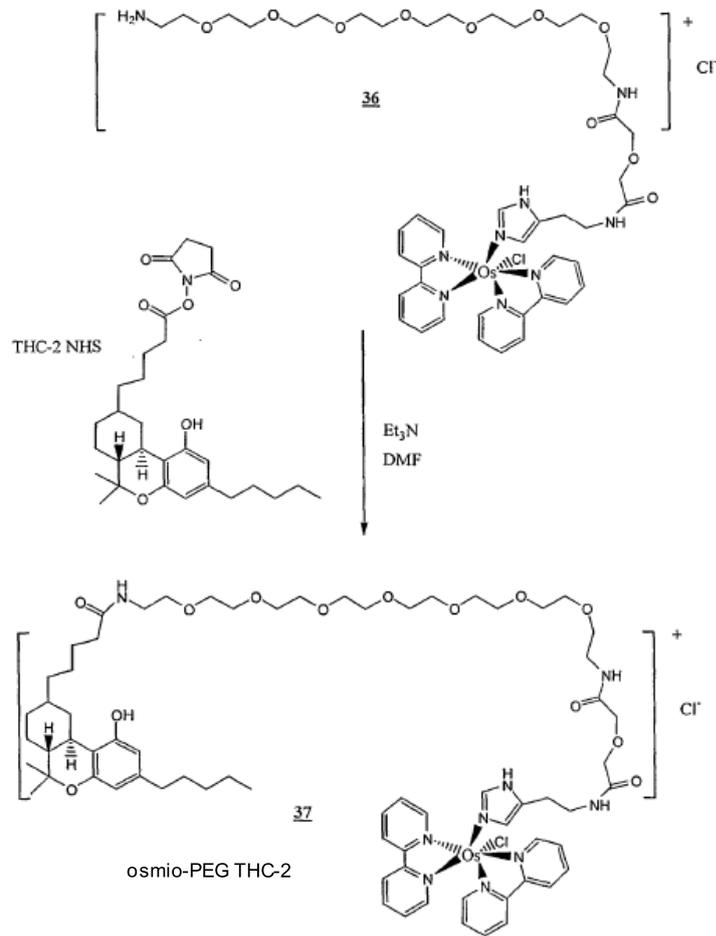


Fig. 32

Síntesis de conjugado osmio-PEG-metotrexato (19)

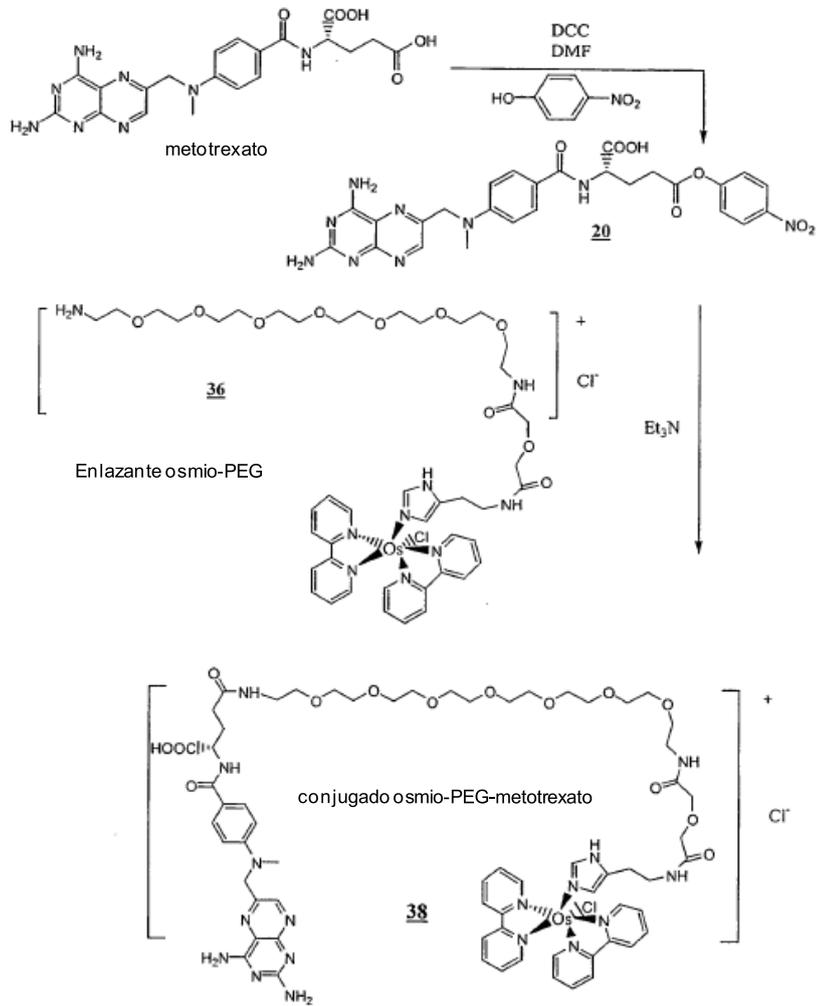


Fig. 33

Síntesis de enlazante de ácido tetra carboxílico (53)

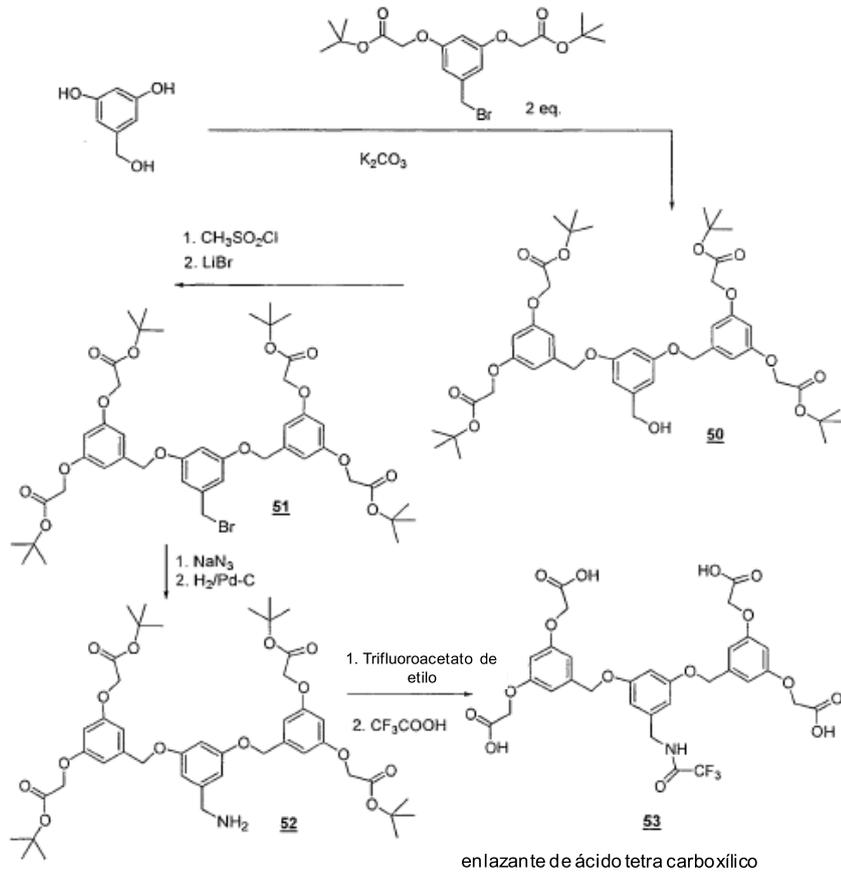
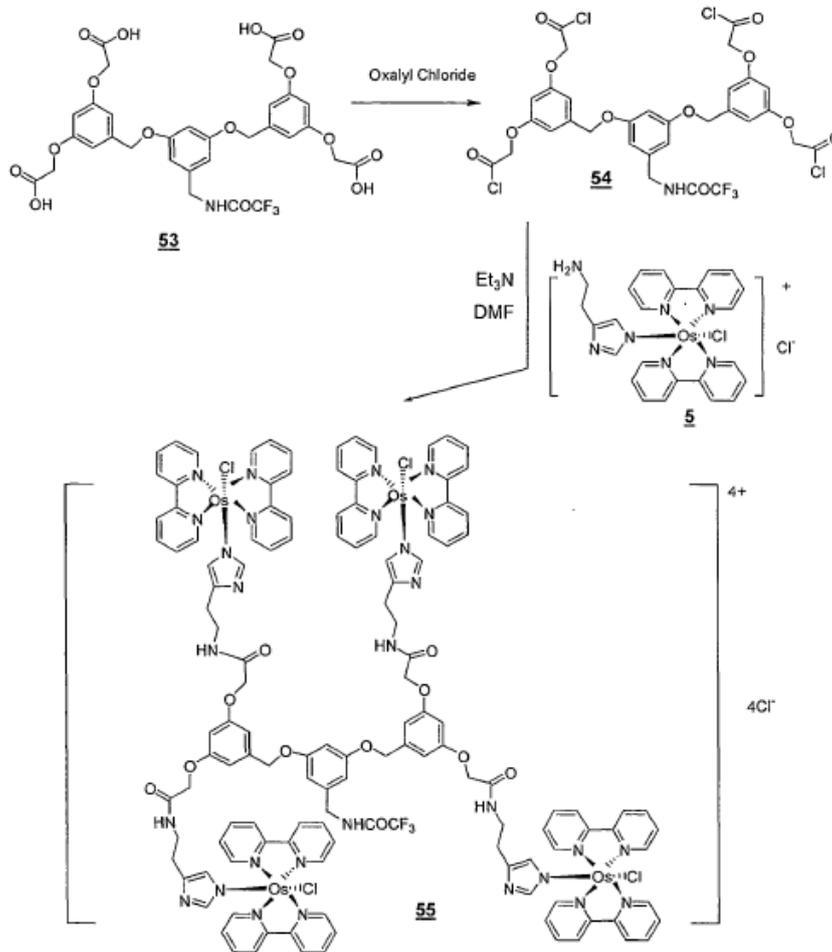


Fig. 34

Síntesis de enlazante de tetra osmio trifluoroacetamido protegido (55)



enlazante de tetra osmio trifluoroacetamido protegido

Fig. 35

Síntesis de enlazante tetra osmio (56)

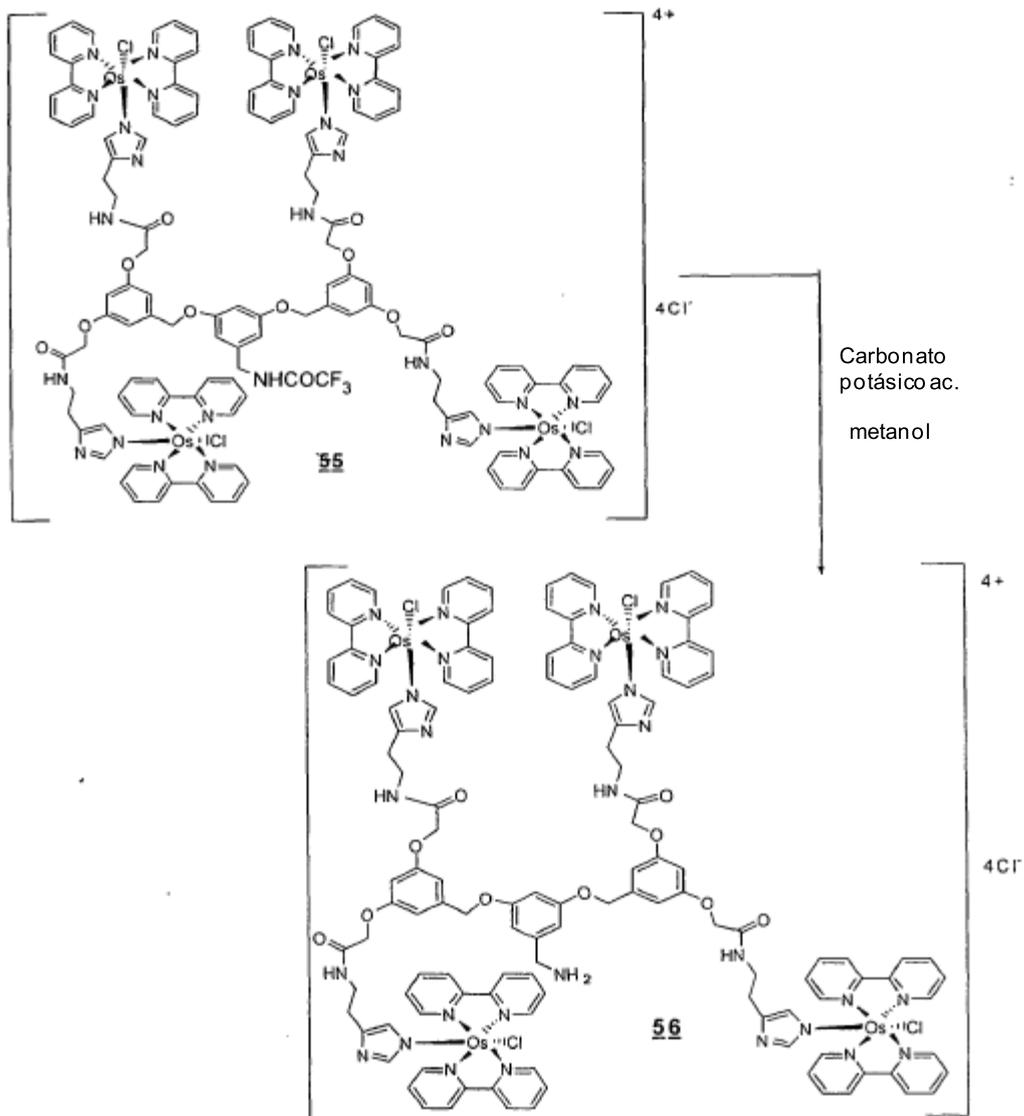
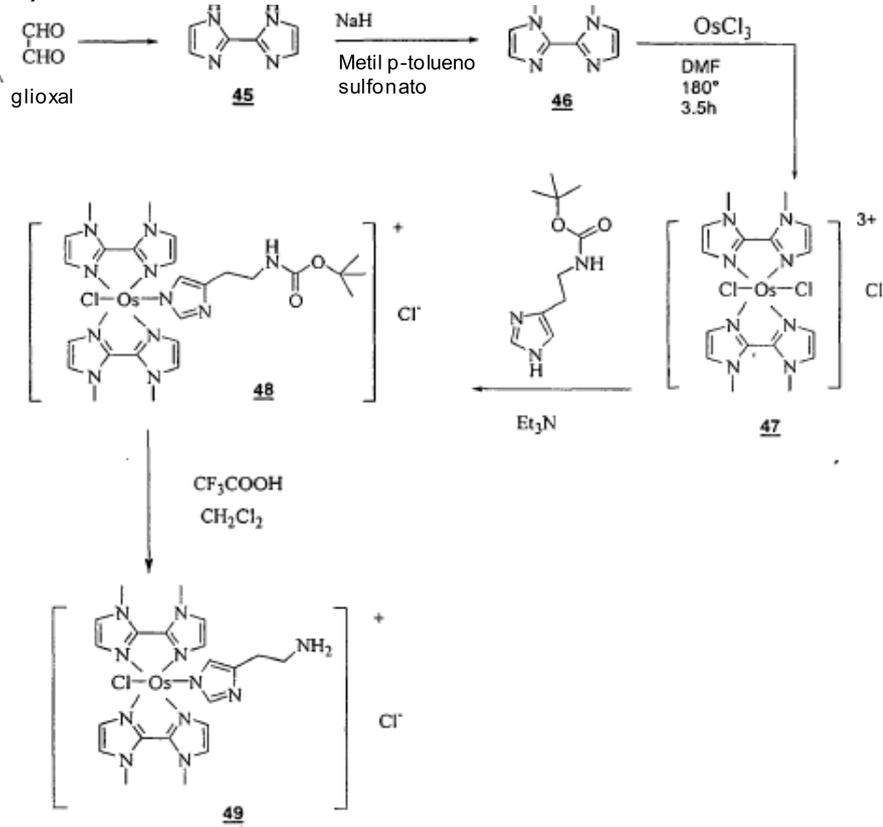


Fig. 36

Síntesis de enlazante osmio (dimetil biimidazol)2 histamina (49)



enlazante osmio (dimetil biimidazol)2 histamina

Fig. 37

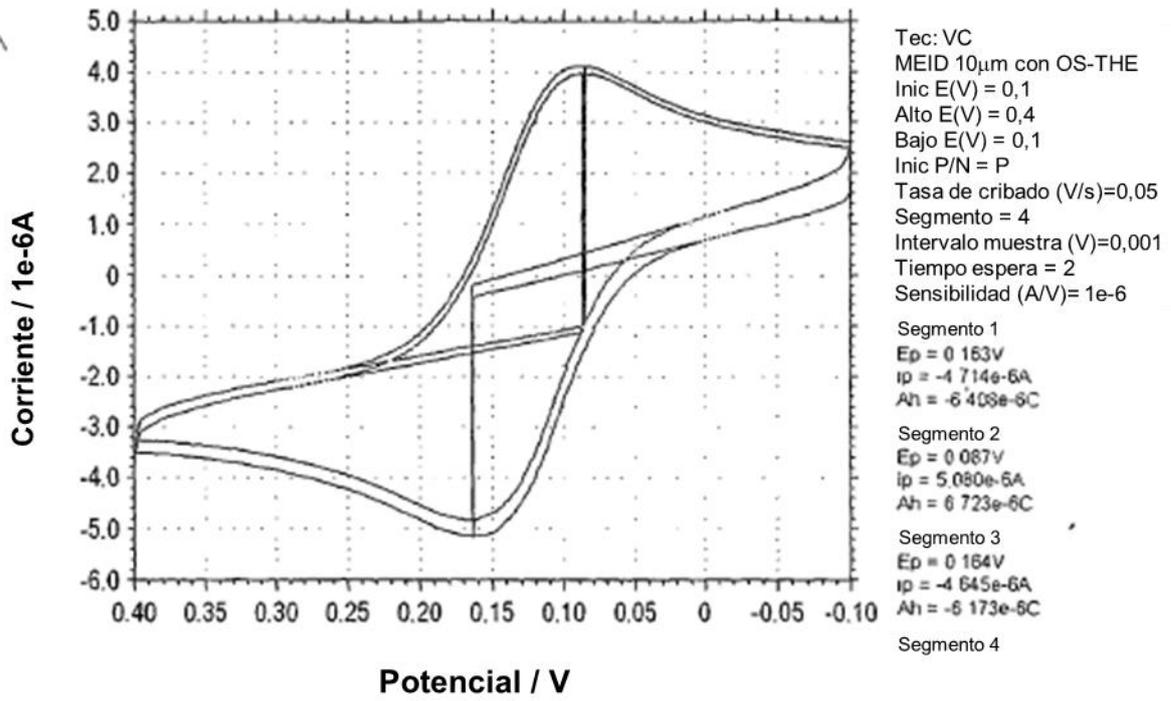


Fig. 38

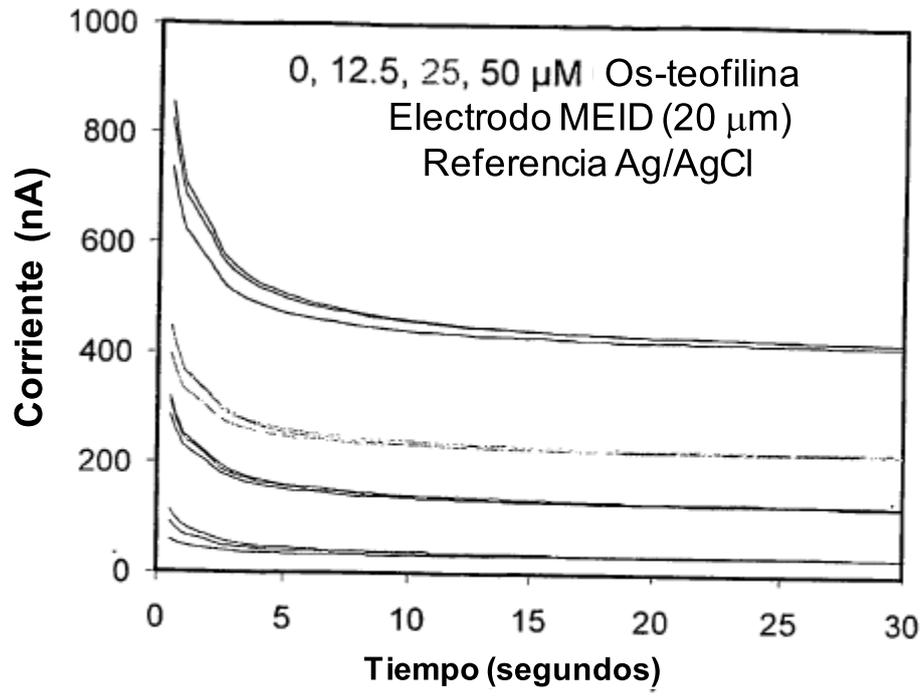


Fig. 39

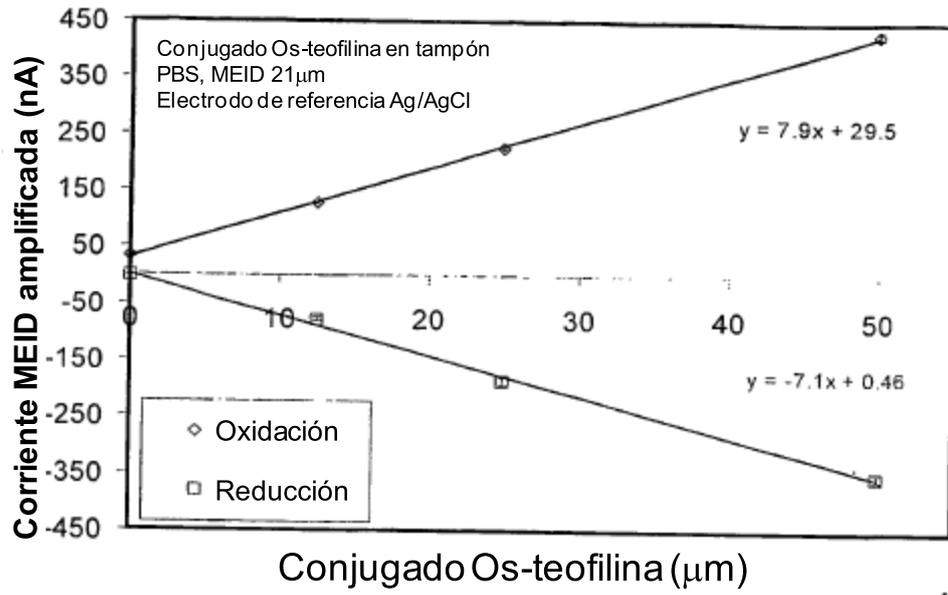


Fig. 40

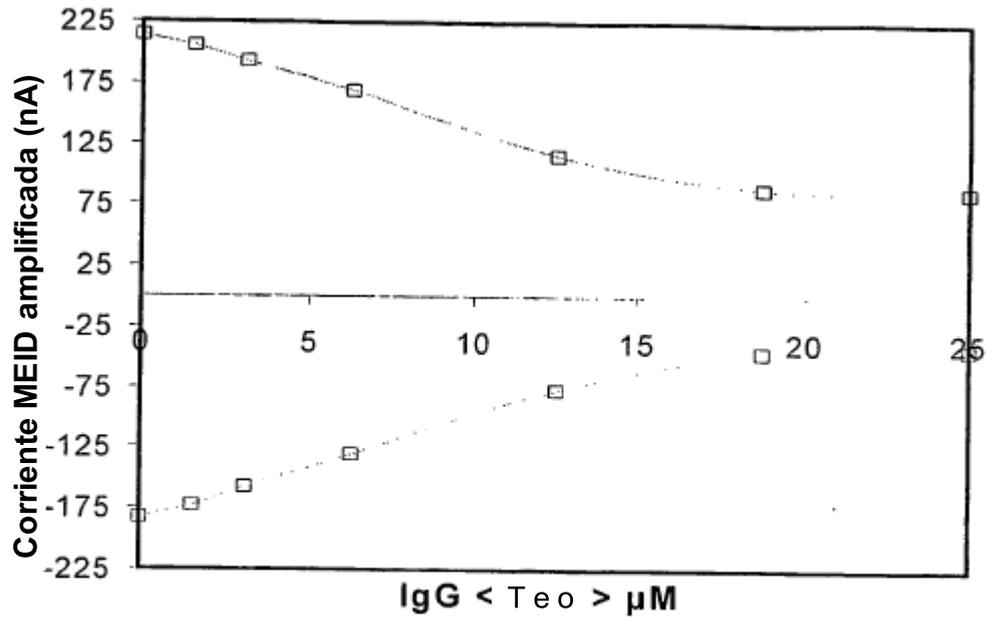


Fig. 41

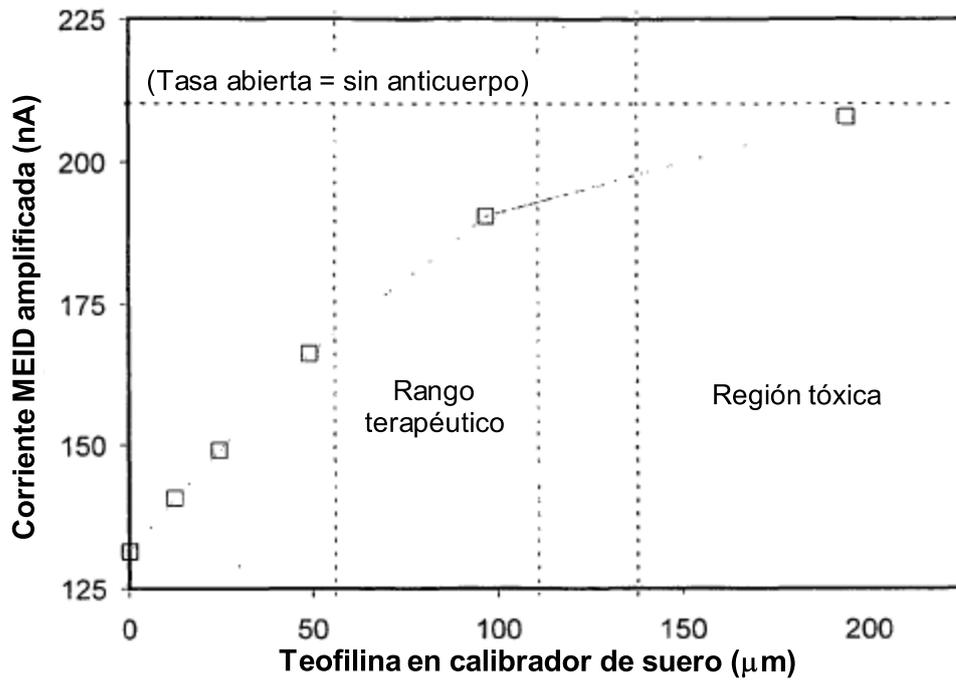


Fig. 42

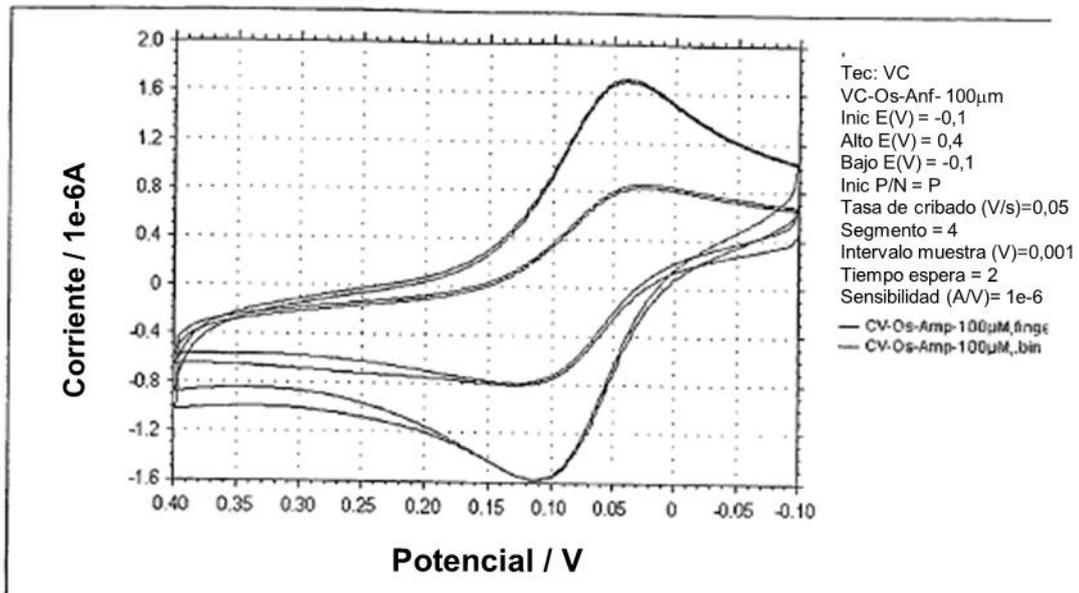


Fig. 43

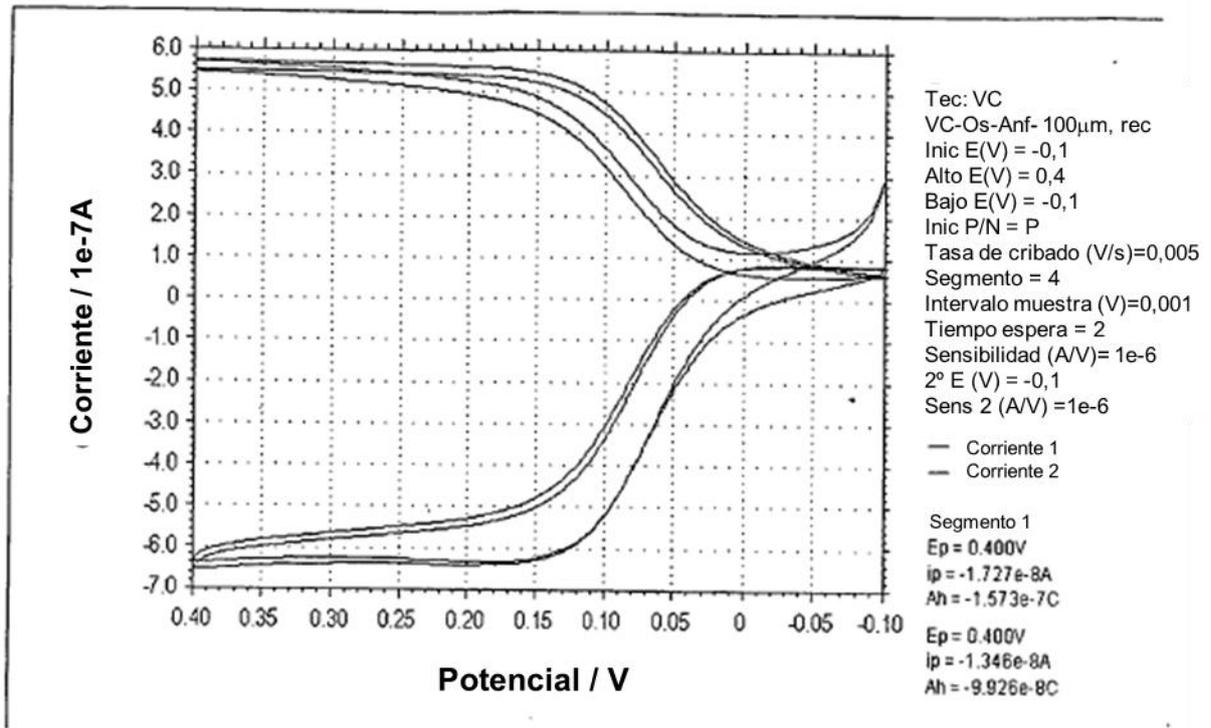


Fig. 44

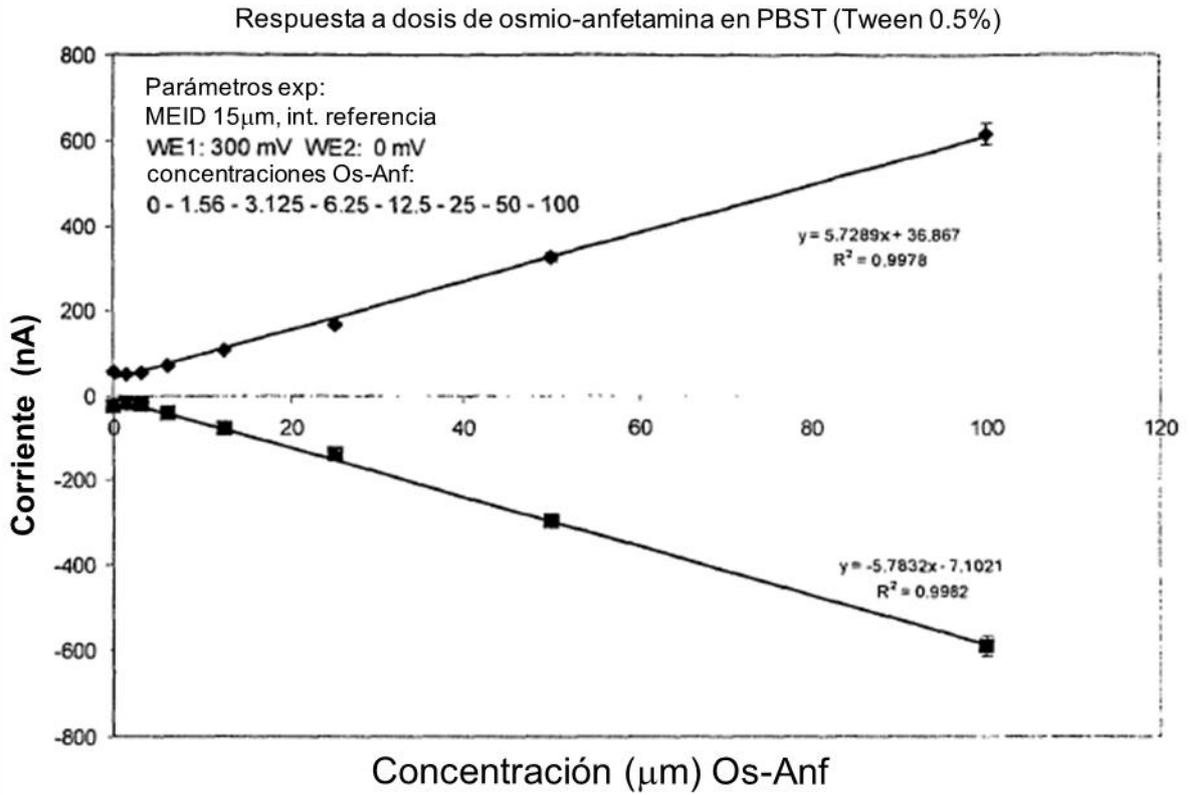


Fig. 45

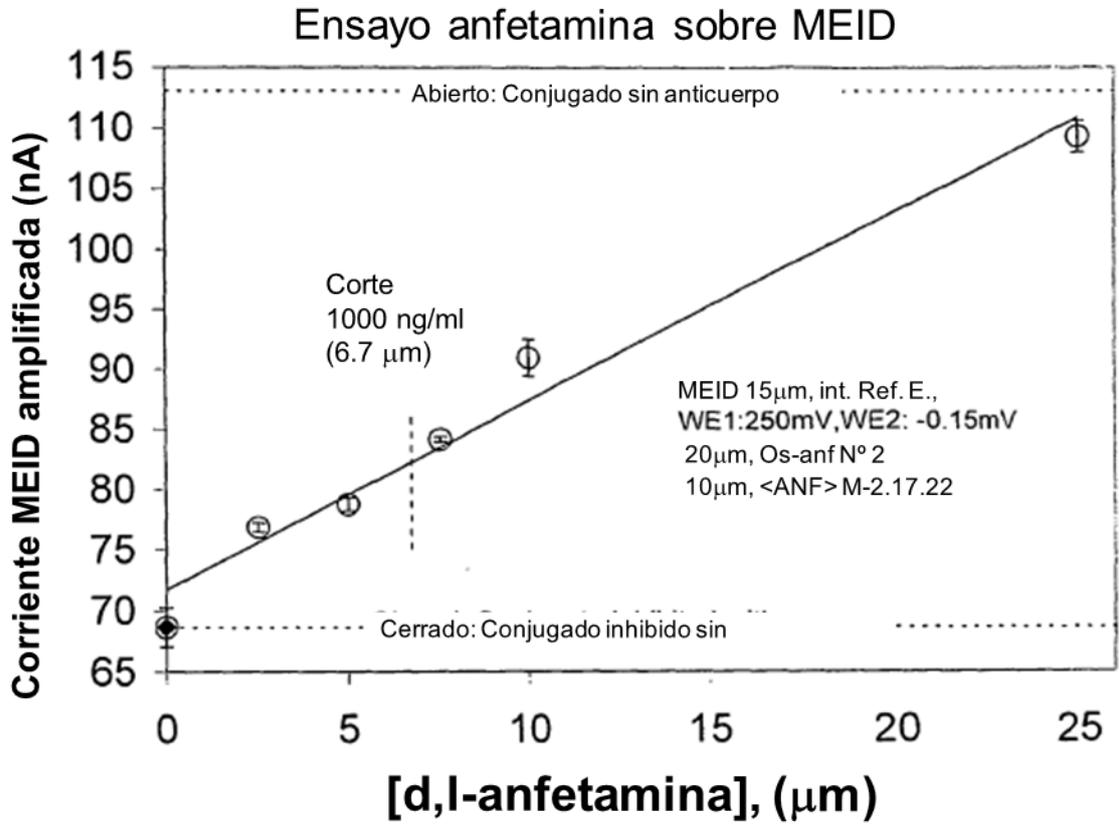


Fig. 46

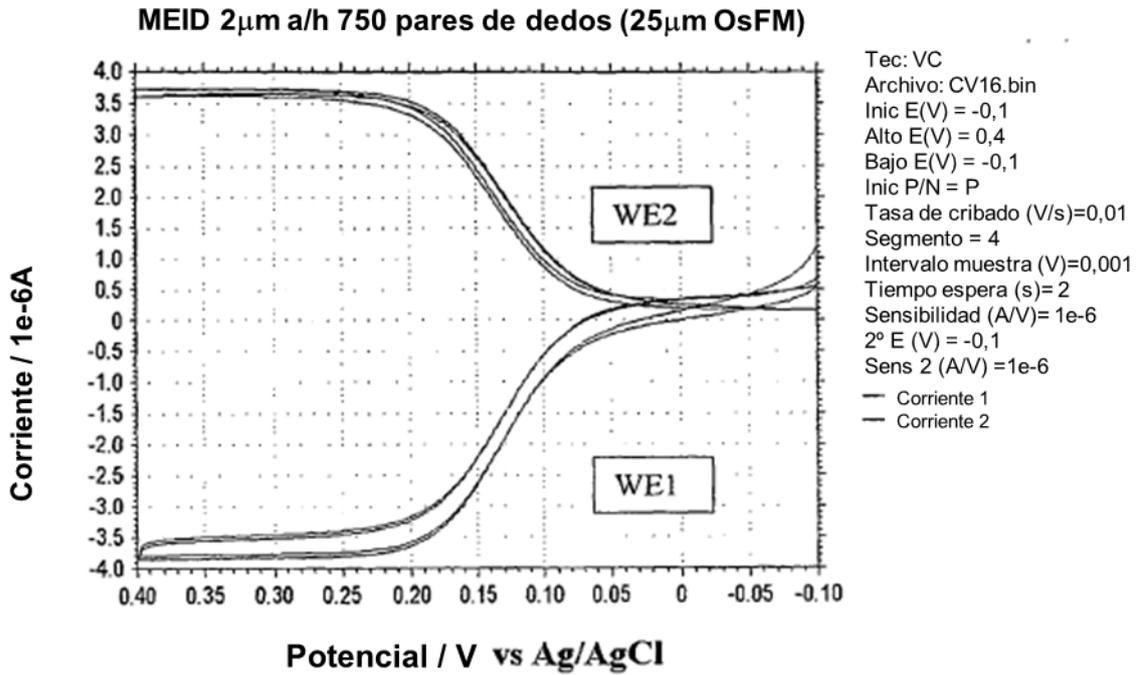


Fig. 47

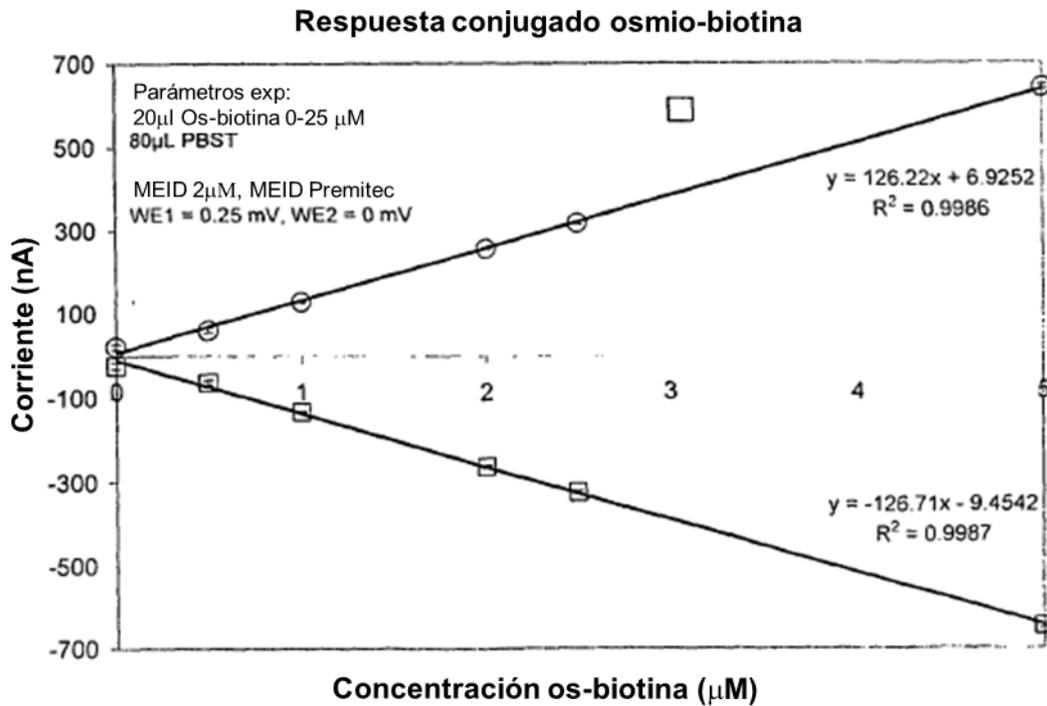


Fig. 48

Ensayo biotina

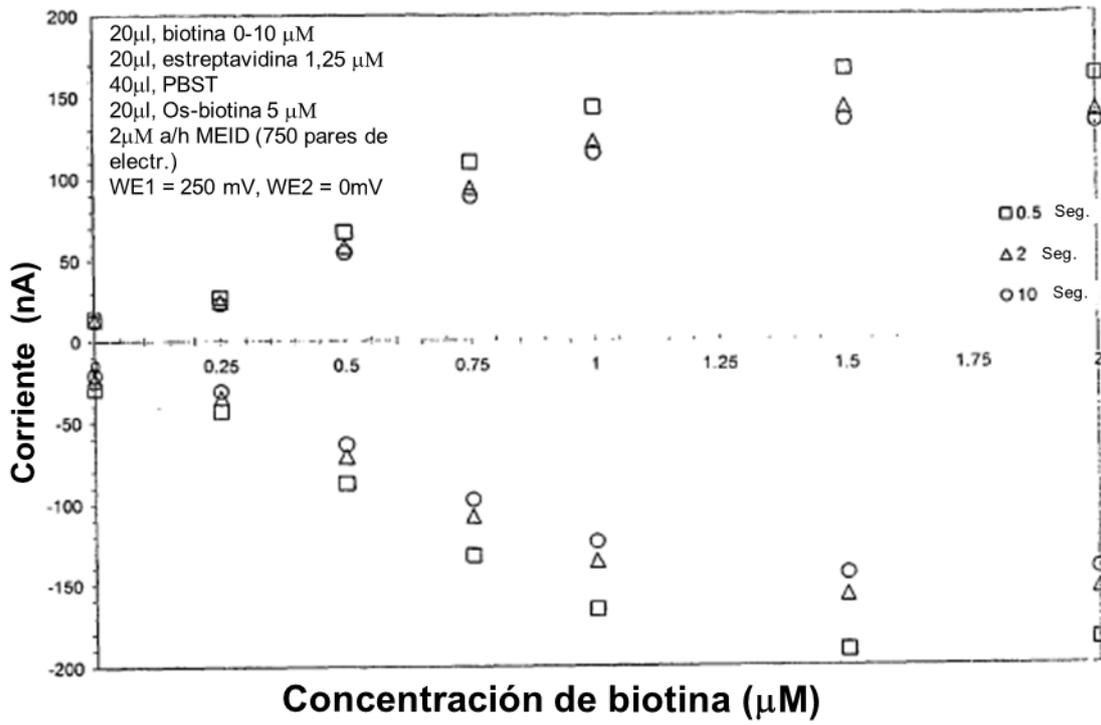


Fig. 49

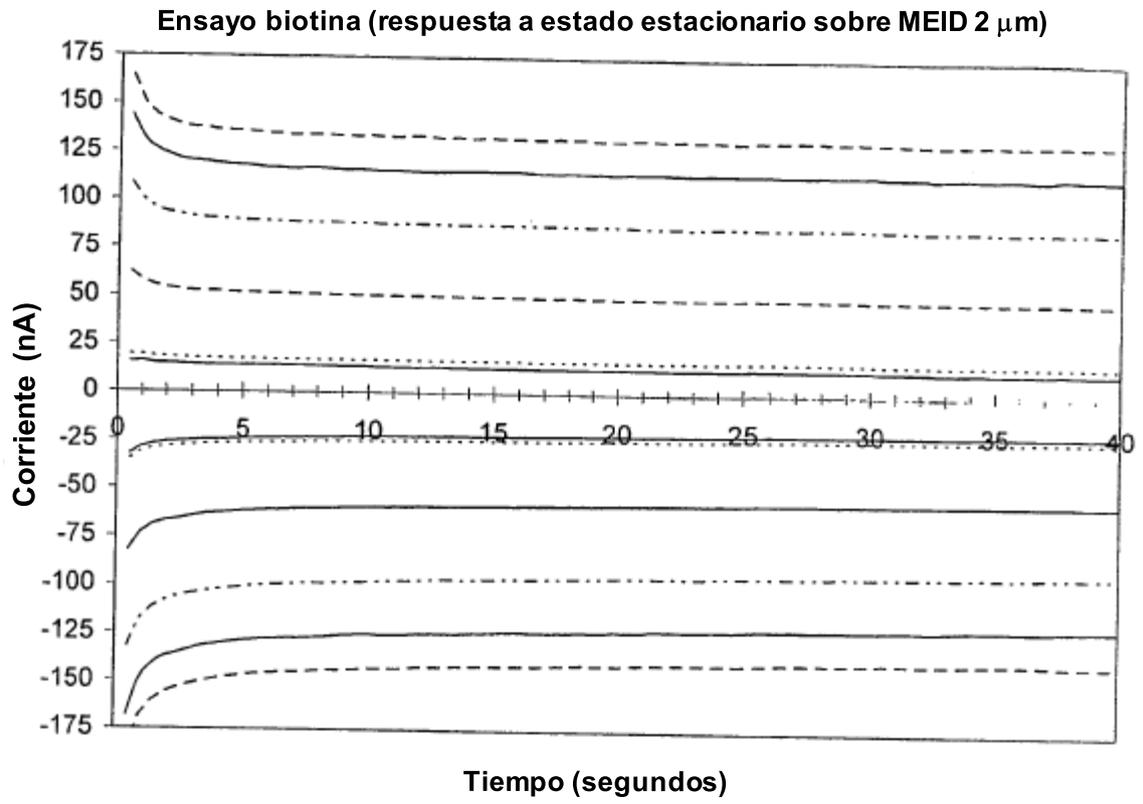


Fig. 50

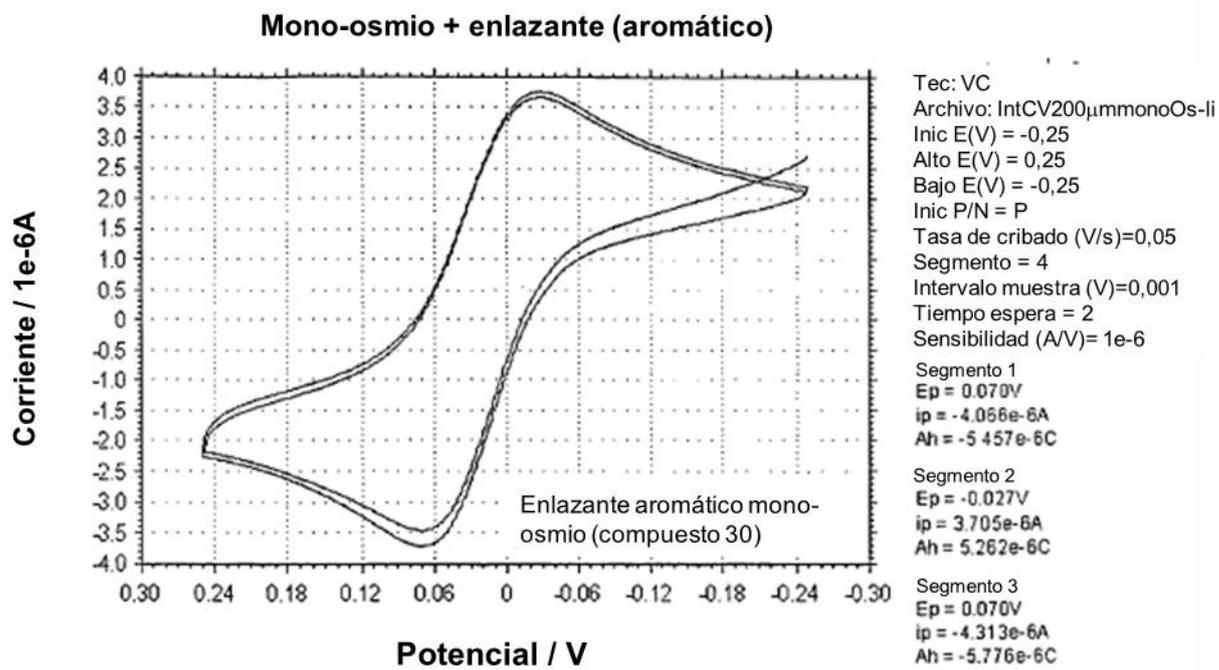
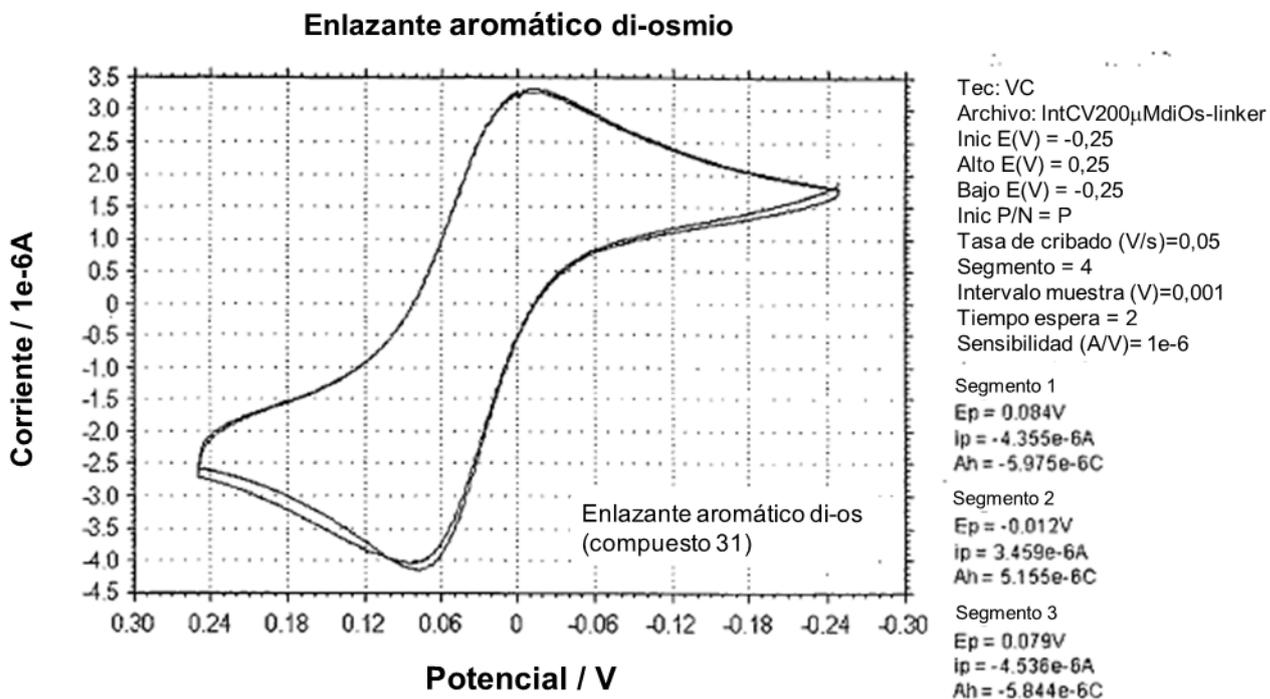


Fig. 51



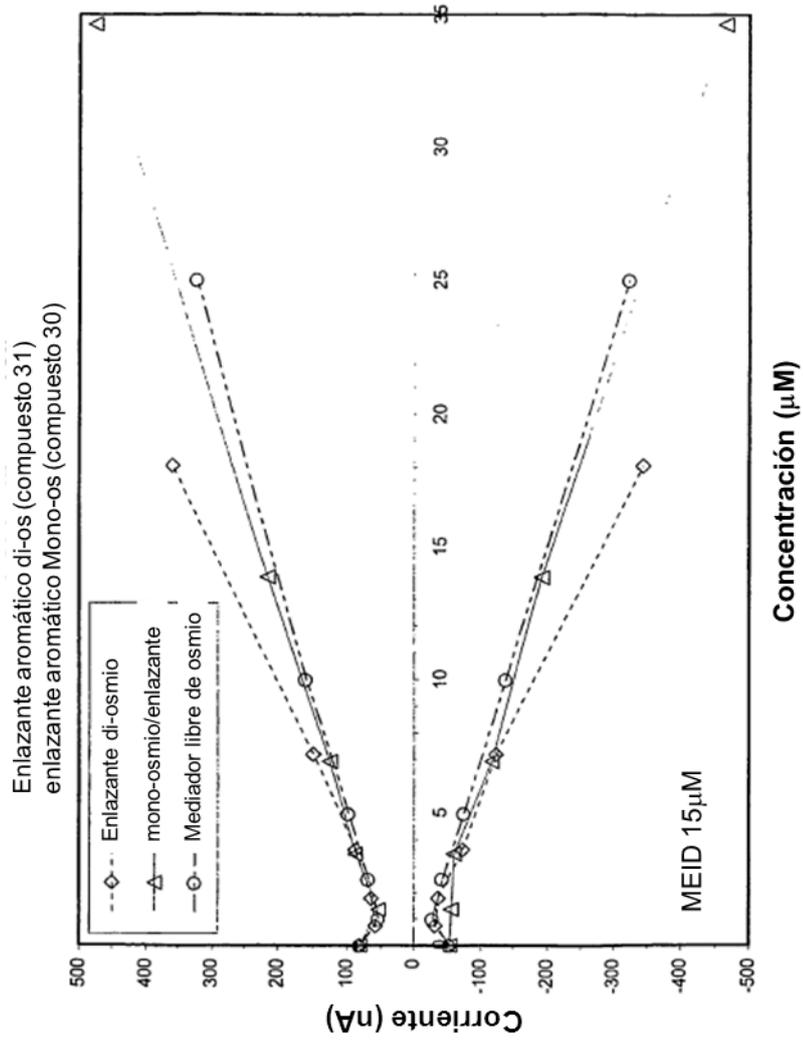


Fig. 53

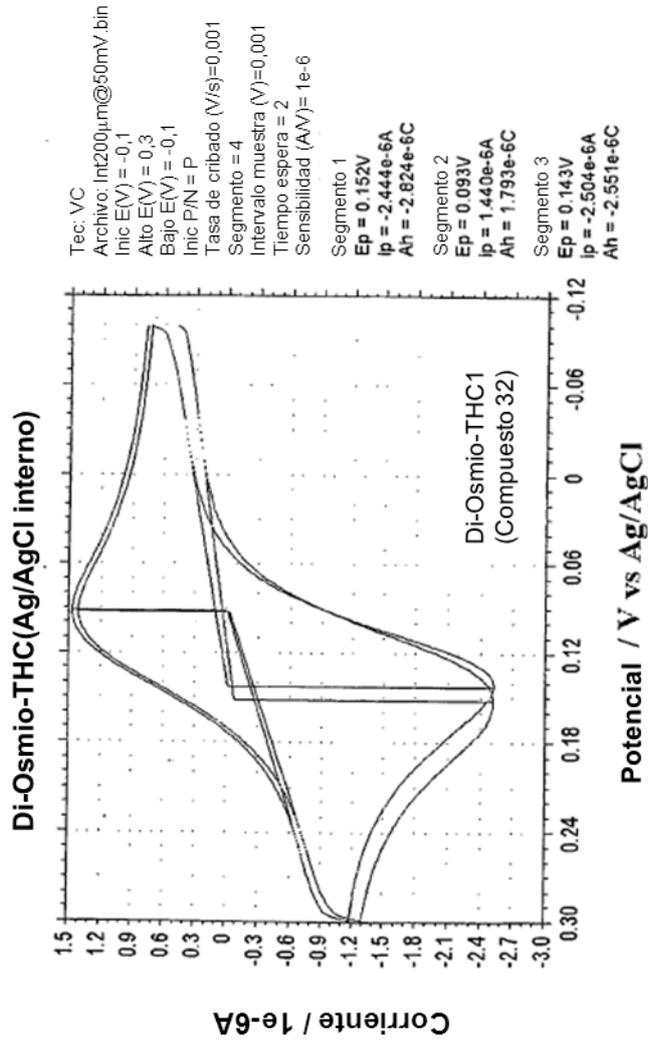


Fig. 54

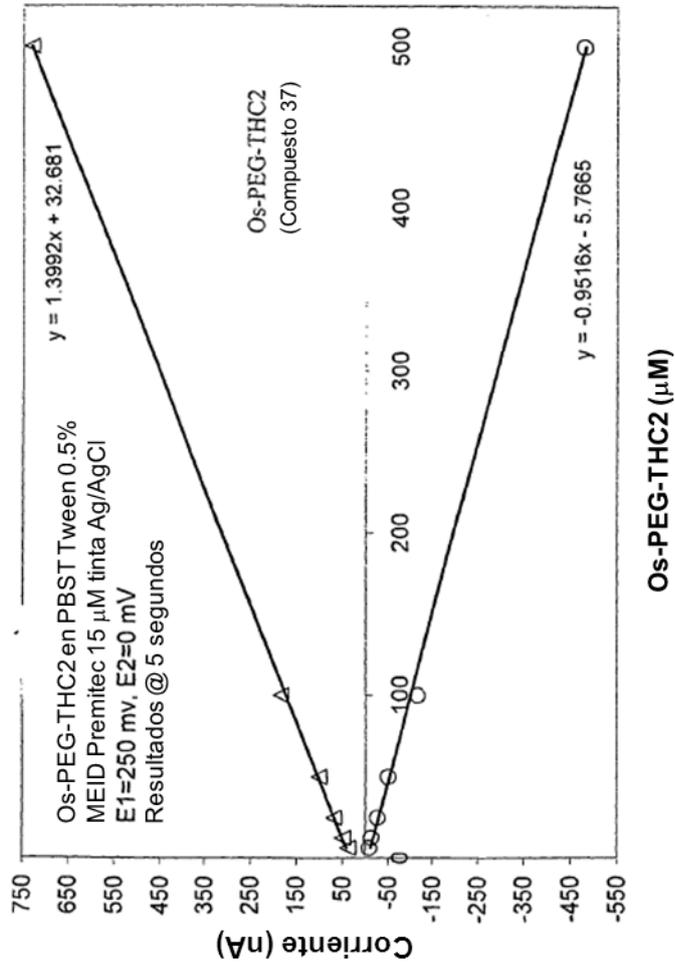


Fig. 55

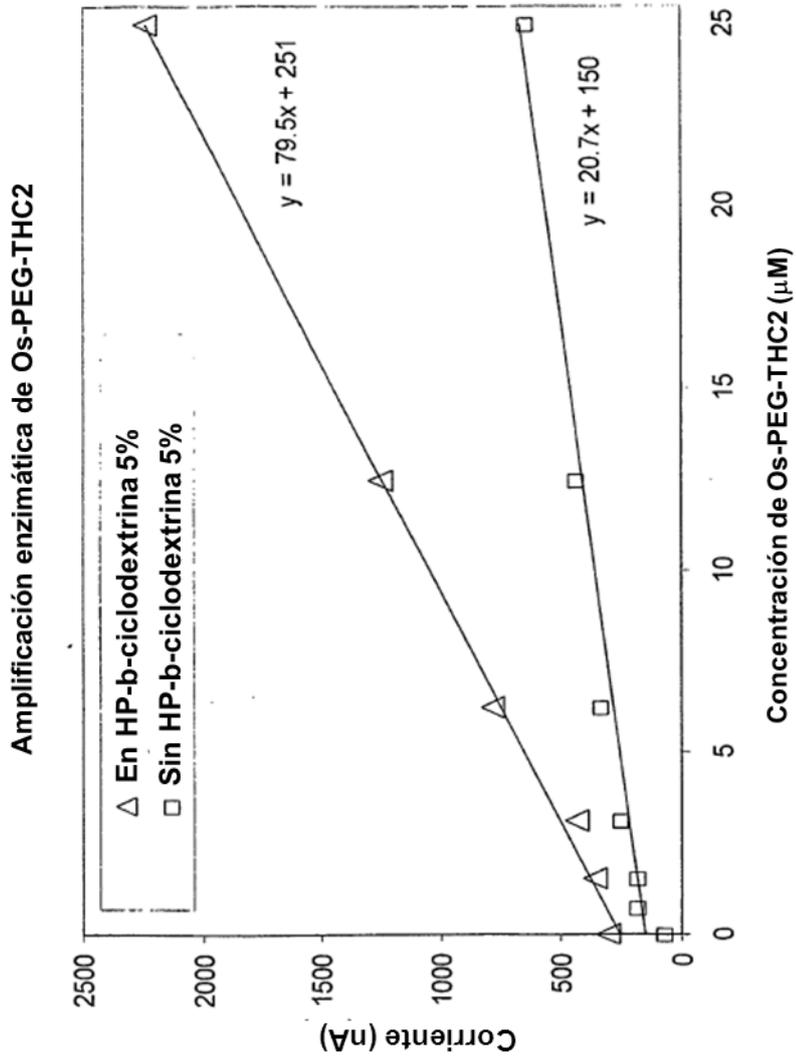


Fig. 56

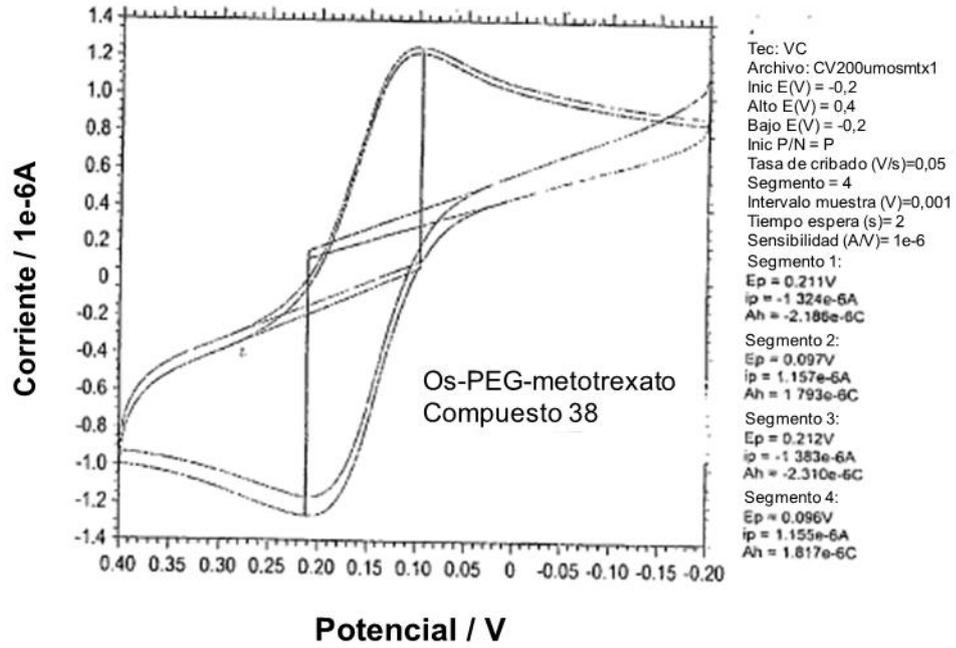


Fig. 57

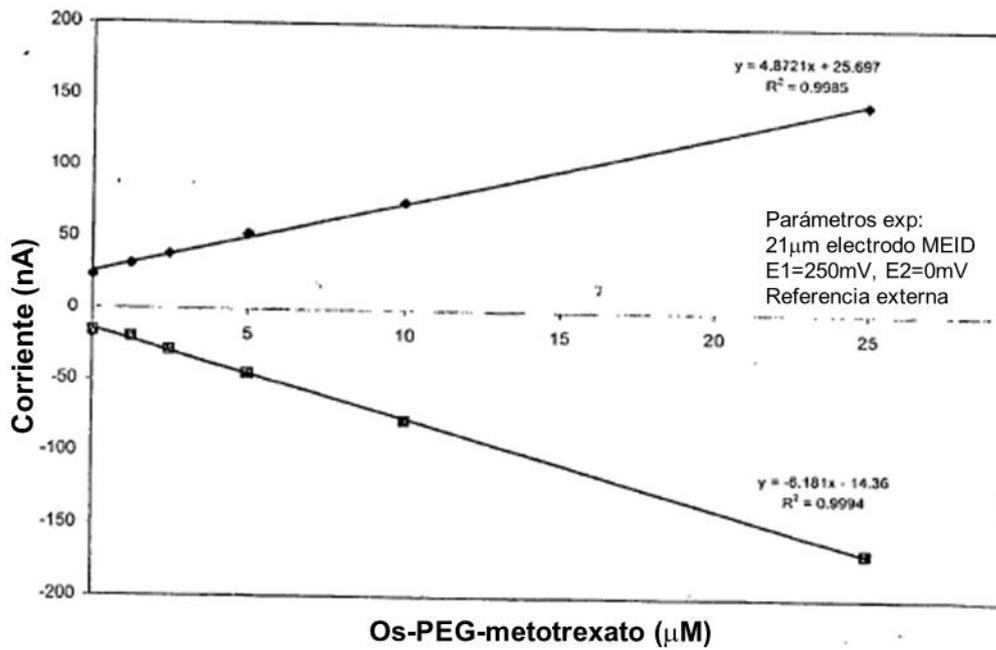


Fig. 58