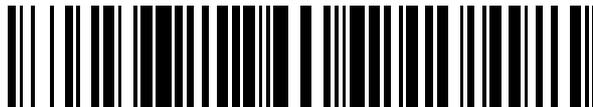


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 593**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07825225 .1**

96 Fecha de presentación: **27.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2067027**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

54 Título: **Microsensor para la detección de D-aminoácidos**

30 Prioridad:

27.09.2006 EP 06291523

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

12.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

12.12.2012

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%)
3, RUE MICHEL-ANGE**

**75794 PARIS CEDEX 16, FR;
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE LYON 1
(20.0%);**

UNIVERSITE PARIS XI (20.0%);

UNIVERSITE D'INSUBRIA (20.0%) y

**INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
(20.0%)**

72 Inventor/es:

MARINESCO, STÉPHANE;

PERNOT, PIERRE;

MOTHET, JEAN-PIERRE;

CESPUGLIO, RAYMOND;

SCUVAILO, OLEG;

SOLDATKIN, ALEXEY;

POLLEGIONI, LOREDANO y

PILONE, MIRELLA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 593 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

Microsensor para la detección de D-aminoácidos

La presente invención se refiere al campo de los microsensores o microdispositivos de detección.

5 Más precisamente, la invención se refiere a un microsensor o microelectrodo para medir la D-serina y un método electroquímico para detectar y/o medir D-aminoácido, en particular D-serina, más específicamente *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*.

Hay una necesidad especial de sensores de D-aminoácidos que se puedan usar oara mediciones *in vivo*. Por ejemplo, para la D-serina, que recientemente ha mostrado que está presente en el Sistema Nervioso Central (SNC), en el córtex,, hipocampo o cerebelo en desarrollo.

10 Este D-aminoácido ha estado implicado recientemente en varias patologías, tales como esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, dolor crónico o isquemia cerebral. Hay por tanto una necesidad de agentes farmacológicos capaces de interferir con el sistema de síntesis, liberación, catabolismo y/o captación de la D-serina en el SNC, así como de métodos fiables para detectar D-serina *in vivo* e *in vitro*.

15 Un método conocido de para medir la concentración extracelular de la D-serina es la microdiálisis. Este método es pesado, caro y difícil de emplear. Además, implica el uso de sondas relativamente grandes, lo que puede provocar lesiones que pueden comprometer la medición.

20 Además, el principio de este método por sí mismo, que comprende las etapas de diálisis del medio extracelular, recogida y análisis de su contenido, puede provocar una perturbación de la funcionalidad fisiológica de la muestra debido a la circulación de fluido exógeno extracelular, que puede cambiar la concentración local de la D-serina, así como de otros metabolitos pequeños.

También son conocidos métodos electroquímicos para detectar la D-serina, por ejemplo en la industria alimentaria. Estos métodos usan sensores que tienen un tamaño milimétrico o centimétrico, que generalmente no es compatible con un uso *in vivo* use.

25 El campo de los microsensores es de un interés creciente. Hay así una necesidad general de sensores fiables, baratos, pequeños, precisos, selectivos y/o versátiles y más particularmente de sensores que se puedan usar *in vivo* y/o que permitan medir en tiempo real los cambios en la concentración de un compuesto.

El documento EP1542017 se refiere a un método de examen o diagnóstico de la esquizofrenia mediante la medición de la concentración de la D-Serina por cromatografía.

30 Johansson et al. (J. of Biomaterials Application, vol 8, p. 146-173, 1993) describe un biosensor constituido por un electrodo de 1,7 mm de diámetro modificado con D-aminoácido oxidasa y ya sea peroxidasa de rábano picante o peroxidasa fúngica.

Qijin Chi et al (Analytica Chimica Acta, vol 310, p. 429-436, 1995) describe un biosensor amperométrico mediante la incorporación de D-amino oxidasa en una película de azul de Prusia durante el proceso de crecimiento electroquímico y la deposición electroquímica sobre un microelectrodo de grafito de 7 mm de diámetro basal.

35 Como se ha discutido anteriormente, hay una necesidad especial de un dispositivo para detectar D-aminoácidos, y en particular D-serina, *in vivo* y/o permitiendo medir su concentración en tiempo real, por ejemplo, para desarrollar un método para encontrar agentes farmacológicos capaces de interferir en la síntesis, liberación y/o eliminación de D-aminoácidos, y más específicamente D-serina en el sistema nervioso central (SNC).

40 Siguiendo un tercer aspecto, el objeto de la invención es un microelectrodo, en particular para medir la concentración de un D-aminoácido, comprendiendo dicho microelectrodo:

- medios para la oxidación de dicho D-aminoácido en al menos un compuesto B,
- medios para optimizar la detección de dicho compuesto B, y
- medios para reducir interferencias, en particular interferencias debidas a la oxidación de otras especies distintas del compuesto B.

45 El microelectrodo de la invención puede tener un límite de detección de 300 nM o menor del D-aminoácido de interés, en particular D-serina.

El microelectrodo presenta una buena selectividad. Por ejemplo, las disoluciones de serotonina, dopamina, L-serina y glicina a 10 μ M (concentraciones mucho mayores que las concentraciones fisiológicas de estas moléculas), no generan señales mayores que el 5% de las detectadas a la misma concentración de D-serina.

La Figura 1 muestra un ejemplo de experimento en donde se han inyectado 200 nM de peróxido de hidrógeno en la cámara de registro. La inyección produce un escalón en la corriente de oxidación en el electrodo de trabajo.

La figura 2 muestra la calibración del microelectrodo de la invención en cantidades en aumento de peróxido de hidrógeno. La respuesta del microelectrodo es lineal con concentraciones entre 10 nM y al menos 10 µM de peróxido de hidrógeno.

La figura 3 A y B muestra la detección de D-serina usando el microelectrodo de la presente invención.

La figura 3 A muestra el registro de oxidación (nA) que se produce en el microelectrodo de la invención con el tiempo (s) y la aplicación de serotonina (5-HT, 20 pM), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 1 µM), y D-serina (1 µM y 2 µM). La D-serina y H₂O₂ se detectan como un escalón en la corriente de oxidación, y es rechazada la interferencia de 5-HT.

La figura 3 B muestra la curva de calibración de un microelectrodo de la presente invención a concentraciones de D-serina que van de 5 µM a 1,2 mM.

La figura 4 muestra un ejemplo de liberación de D-serina por astrocito en un cultivo después de la aplicación de digitonina. Se añadieron 50 µM de digitonina a las células en el cultivo. El microelectrodo de la presente invención, colocado por encima de las células detecta la liberación de D-serina debida a la rotura de la membrana celular de los astrocitos.

La figura 5 A, B y C muestra la excelente selectividad del microelectrodo de la presente invención.

La figura 5 A es un cromatograma típico que muestra una curva de intensidad de fluorescencia (µV) frente al tiempo (min). Muestra un pico de D-serina de ejemplo después de 12 min de tiempo de elución y su desaparición después de la incubación, con D-Aminoácido Oxidasa de *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) y catalasa.

La figura 5 B muestra un ejemplo de la respuesta de la corriente registrada en el microelectrodo de la presente invención después de la adición de un extracto de cerebro (dilución X40) y 3 µM de D-serina (corriente de oxidación en pA frente al tiempo en s). La respuesta de la corriente a un extracto de cerebro preincubado en RgDAAO y catalasa se redujo enormemente en comparación a la de un extracto de cerebro de control. La figura 5 C es un diagrama que muestra los resultados resumidos de la comparación entre la concentración de D-serina estimada mediante HPLC y el microelectrodo de la presente invención.

Por "microelectrodo" en la presente invención se quiere indicar un electrodo de pequeño tamaño, en particular un electrodo que tiene un diámetro medio de menos de 1 mm, especialmente de menos de 500 µm, más particularmente de menos de 250 µm, especialmente de menos de 150 µm y más específicamente de menos de 100 µm, o incluso menos de 50 µm.

La definición de un "microelectrodo" según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada es como se indica a continuación: "microelectrodo es cualquier electrodo cuya dimensión característica es, en condiciones experimentales dadas, comparable o más pequeño que el espesor de la capa de difusión." Stulik K, Amatore C, Holub K, Marecek V y Kutner W (2000) Microelectrodes. Definitions, characterization and applications (technical report). Pure Appl. Chem. 72: 1483-92. [1]

Los medios de oxidación de los D-aminoácidos pueden ser al menos una D-aminoácido oxidasa (DAAO), en particular una D-aminoácido oxidasa que conduce a la producción de peróxido de hidrógeno como compuesto B.

Una D-aminoácido oxidasa (DAAO) puede ser flavoenzima que contiene una molécula de flavina adenina dinucleótido unido covalentemente o no covalentemente como cofactor, que es el sitio de la reacción redox

Más precisamente, los medios para la oxidación del D-aminoácido pueden ser al menos una D-aminoácido oxidasa (DAAO) que no necesita la adición de un cofactor en el medio para oxidar los D-aminoácidos. La DAAO puede tener un cofactor natural o artificial que está fuertemente unido al resto de apoproteína (es decir, no se produce apoproteína inactiva en las condiciones de ensayo), y/o una actividad altamente específica.

La D-aminoácido oxidasa puede tener una actividad altamente específica, que puede ser de al menos 20, en particular al menos 40, o incluso al menos 55 unidades/mg para al menos uno, o solo uno, D-aminoácidos específicos. Más precisamente, la D-aminoácido oxidasa puede tener una actividad altamente específica, que puede ser de al menos 20, en particular al menos 40, o incluso al menos 55 unidades/mg para D-serina y/o al menos 50, en particular al menos 75, o incluso al menos 100 unidades/mg para D-alanina. Una unidad DAAO se define como la cantidad de enzima que convierte 1 µmol de D-alanina por minuto a 25 °C.

Los medios de oxidación del D-aminoácido es una DAAO de una levadura o un microorganismo. La DAAO se puede elegir del grupo que comprende *Rhodotorula gracilis* DAAO (RgDAAO), *Trigonopsis variabilis* DAAO, *V. luteoalbum* DAAO, *F. oxysporum* DAAO y sus derivados.

Por "derivados" se quiere decir en la presente invención una enzima que tiene al menos 65 %, en particular al menos 75 %, más particularmente al menos 85 %, notablemente al menos 90 %, incluso al menos 95 %, incluso más

5 particularmente al menos 99 % de identidad de los aminoácidos con la enzima correspondiente. Los derivados tienen la actividad catalítica, por ejemplo una D-aminoácido oxidasa, en particular con una eficiencia del mismo orden es decir, al menos 50 %, más especialmente al menos 75 %, en particular al menos 100 %, incluso más de 150 % de la eficiencia de la enzima original. La eficiencia de la enzima se puede definir como la relación K_{cat}/K_m , ensayada con un electrodo de oxígeno a pH 8,5 y 25 °C, con saturación de oxígeno del aire ($[O_2] = 0,253 \text{ mM}$) [G. Molla, C. Vegezzi, M.S. Pilone, L. Pollegioni, Overexpression in Escherichia coli of a recombinant chimeric Rhodotorula gracilis D-aminoácido oxidasa, Prot. Express. Purif., 14 (1998) 289-294]. [2]

10 Los D-aminoácidos para los que se mide la concentración son un sustrato de la D-aminoácido oxidasa (DAAO). Los D-aminoácidos pueden ser naturales o un D-aminoácido sintético. Puede ser un alfa, beta, gamma u omega D-aminoácido.

Los aminoácidos se pueden seleccionar del grupo de D-alanina, D-valina, D-leucina, D-isoleucina, D-metionina, D-prolina, D-fenilalanina, D-triptofan, D-serina, D-treonina, D-tirosina, D-cisteína, D-asparagina, D-glutamina, D-lisina, D-arginina y D-histidina, en particular D-serina, y sus derivados.

Los medios para la oxidación de los D-aminoácidos se pueden inmovilizar sobre el electrodo mediante:

15 • Inmovilización covalente, por ejemplo

usando agentes bifuncionales, tales como glutaraldehído:

a) usando vapores del agente bifuncional, o

b) mediante mezcla preliminar de la disolución de agentes bifuncionales con una mezcla enzimática

20 • Atrapando la D-aminoácido oxidasa (DAAO), por ejemplo en una matriz reticular, que se puede formar por diferentes tipos de reacciones poliméricas, en particular estimulado con UV, irradiación o catalizador químico, o electrogenerado, como polímeros de fenilendiamina, pirrol o anilina,

• Inmovilización en el cuerpo del electrodo, tal como un electrodo de tipo pasta, por ejemplo mezcla de enzima, polvo, mediador y/o

25 • Adsorción, en particular sobre un material estratificado de superficie elevada, tal como acetato de celulosa, nylon, geles inorgánicos (por ejemplo gel de sílice) y tales tipos de membranas.

Los medios para optimizar la detección del compuesto B pueden corresponder a los medios para la catálisis de la oxidación del peróxido de hidrógeno.

Los medios para optimizar la detección de dicho compuesto B se puede seleccionar de:

30 • Un pretratamiento electroquímico del electrodo, en particular un electrodo basado en carbono, y

• deposición, pro ejemplo a través de deposición electroquímica o a vacío, de uno o varios metales, tales como metales que catalizan la oxidación del compuesto B,

• deposición de un sistema artificial que cataliza la oxidación del compuesto B, tal como un sistema de peroxidasa artificial, en particular basado en azul de Prusia,

• peroxidasa de rábano picante (HRP), y

35 • uso de nanopartículas, por ejemplo de Oro, Platino, óxidos de Silicio, Zinc, nanotubos de carbono, etc. En otras palabras, los medios para optimizar la detección de dicho compuesto B se pueden seleccionar de:

• un pretratamiento electroquímico del electrodo,

• deposición de al menos un metal

• deposición de un sistema artificial que cataliza la oxidación del compuesto B,

40 • peroxidasa de rábano picante (HRP),

• uso de nanopartículas, y

• una combinación de los mismos.

Cuando los medios para optimizar la detección de dicho compuesto B son un metal se puede seleccionar de los metales que comprenden platino, oro, rutenio, rodio, paladio, iridio, osmio, hierro, cromo, níquel y wolframio.

Los medios para reducir las interferencias pueden ser limitar la oxidación de los compuestos diferentes del compuesto B que puede ser oxidado por el electrodo, en particular limitando el acceso y/o el contacto de estos compuestos con el electrodo, en otras palabras, en particular limitando el acceso y/o el contacto de dicho compuesto diferente del compuesto B con el electrodo.

5 Los medios para reducir las interferencias se pueden seleccionar del grupo que consiste:

- membranas poliméricas electrogeneradas, por ejemplo basadas monómeros como benceno y sus derivados, tales como fenilendiamina, resorcinol, fenol; naftaleno y sus derivados; pirrol y sus derivados; anilina y sus derivados; y sus combinaciones,

10 • membranas depositadas de disoluciones de polímeros, cargadas, como Nafion, o neutras, como poliuretano cloruro de polivinilo, o derivados de celulosa,

- capa molecular no polimérica cargada, por ejemplo tal como una capa depositada vía una disolución, tal como fosfolípidos y ácidos grasos, como ácido esteárico,

- uso de al menos una enzima que degrada la(s) molécula(s) que interfieren, por ejemplo ácido ascórbico oxidasa, en particular esta enzima se puede inmovilizar sobre el electrodo, y

15 • uso de métodos electroquímicos que permiten discriminar entre diferentes moléculas, por ejemplo amperimetría pulsada, voltimetría cíclica o voltimetría pulsada.

Los medios para reducir las interferencias pueden ser una capa de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en polimeta-, para- u orto- fenilendiamina (PPD), polímeros basados en naftaleno sustituidos, membrana de rechazo o membrana polimérica de rechazo.

20 Entre los materiales de electrodo que se pueden usar se pueden citar los siguientes:

- electrodos basados en platino, rodio, paladio, oro, rutenio, posiblemente en forma de unja aleación, por ejemplo con oro, iridio u otros metales nobles, entre tales aleaciones un ejemplo es platino 90 % e iridio 10 %

- electrodos basados en materiales de carbono, grafito (barras), carbón tipo vidrio (barras), fibras de carbono, diamante,

25 • electrodos cubiertos por nanopartículas de metales nobles, materiales de carbono o una mezcla de los mismos, y

- electrodos amperométricos basados en cerámica.

Algunos tipos de materiales de electrodo se pueden excluir ya que posiblemente conducen a la inactivación de la D-aminoácido oxidasa (DAAO), en particular los electrodos de Ag y Hg.

30 La forma del electrodo puede ser un disco, un anillo, una barra, un cilindro, cono o una semiesfera.

Siguiendo una realización específica, el microelectrodo comprende o consiste en una fibra de carbono con la parte de trabajo cubierta por una capa de rutenio, una capa de PPD y una capa de DAAO.

Siguiendo otro aspecto, la materia objeto de la invención es un dispositivo para detectar y/o medir la concentración de un D-aminoácido en un medio, en particular *in vivo*, que comprende un electrodo como se define anteriormente.

35 Este dispositivo puede comprender además una tarjeta de adquisición que lleva un amplificador, en particular equipado con dos o tres electrodos potenciostato.

Este dispositivo puede comprender también un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia para el sistema de dos electrodos, y un electrodo adicional auxiliar o un contraelectrodo para el sistema de tres electrodos.

40 Siguiendo otro aspecto, la materia objeto de la invención es un método para detectar y/o medir la concentración de un D-aminoácido en un medio, en particular *in vivo*, que comprende las siguientes etapas:

- un microelectrodo de trabajo de la presente invención se coloca en dicho medio,

- se aplica un potencial de trabajo, en particular mediante voltimetría cíclica, voltimetría pulsada o aplicando un potencial constante.

El potencial se puede fijar entre -1 y +1 V vs. Ag/AgCl para la detección de peróxido (H₂O₂).

Un método de detección eficiente es la amperometría continua a un potencial fijo de +0,55 V vs. Ag/AgCl. En este caso la oxidación con peróxido se ve por un salto de corriente al nivel del electrodo de trabajo (Fig. 1). La relación entre la oxidación y la concentración de peróxido en la disolución es lineal, en particular en un intervalo de 0,01 μM a 10 μM (Fig. 2).

5 Siguiendo otro aspecto, una materia objeto de la invención es un método para obtener un microelectrodo que comprende las etapas siguientes:

- tratar el electrodo para aumentar su sensibilidad al compuesto B, en particular mediante metalización, por ejemplo una electrodeposición de un metal,
- 10 • la deposición de una película de polímero para discriminar el compuesto B de otros compuestos, es decir, otros compuestos presentes en el medio y que se pueden oxidar en el electrodo,
- la deposición de una película de una enzima que oxida el D-aminoácido al compuesto B sobre el electrodo, y después la inmovilización de dicha enzima, en particular a través de glutaraldehído (vapores o disolución).

15 La enzima se puede inmovilizar a través de un proceso de reticulación, por ejemplo con un aldehído, tal como glutaraldehído, o con otras moléculas tales como éster diglicídico de poli(etilen glicol) 400 (PEGDGE) o se puede quedar atrapado en el material del electrodo, tal como pasta de carbono. También puede atraparse o encapsularse en una película de polímero, tal como polipirrol.

El metal que cubre la pieza de trabajo del electrodo se puede depositar mediante métodos clásicos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo mediante un gel impregnado del metal, por ejemplo el hidrogel de osmio.

Ejemplos

20 **Ejemplo 1 : Preparación de un microelectrodo de fibra de carbono revestido de rutenio para medir la concentración de D-serina**

1. Preparación del electrodo de fibra de carbono

25 Un electrodo de fibra de carbono de 7 μm de diámetro (Goodfellow Cambridge Ltd., Huntington, GB) pegado a un alambre de cobre mediante una deposición de pintura de plata (Radiospares, Beauvais, FR). El alambre se coloca en una micropipeta de vidrio en la que la extremidad se corta para permitir que la fibra de carbono sobresalga. La unión entre la micropipeta de vidrio y la fibra de carbono se sella con una resina epoxi para asegurar su ajuste y la fibra de carbono se corta a 150 μm .

El electrodo entonces se coloca en etanol durante 20 minutos para limpiar la fibra de sus impurezas.

2. Electrodeposición de rutenio

30 La electrodeposición de rutenio se ha realizado aplicando durante 20 minutos un potencial de -450 mV Vs Ag/AgCl al electrodo de fibra de carbono que está en una disolución de RuCl_3 a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y pH 2,5 (disolución estándar de absorción atómica de rutenio, Sigma, Saint Quentin, Francia).

Después de la deposición de rutenio, el electrodo se cicla 15 veces entre 0 y 700 mV para su estabilización.

3. Deposición de una capa de película de PPD

35 La deposición se ha realizado electroquímicamente poniendo el electrodo 20 minutos en una disolución de 100 mM de m-PD y aplicando un potencial de +700 mV vs. Ag/AgCl.

4. Deposición de una película de D-aminoácido oxidasa (DAAO)

40 Se deposita una película de enzima sobre el electrodo mediante inmersión del electrodo en una disolución de enzima que comprende 56 mg/ml de RgDAAO, 25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y 1 % de glicerol. El electrodo se retira de la disolución y después la enzima se inmoviliza mediante exposición a vapores de una disolución al 50 % de glutaraldehído.

Alternativamente la enzima se puede inmovilizar usando una disolución de enzima que comprende glutaraldehído 0,17 % ; glicerol 2 % ; RgDAAO 37 mg/ml ; BSA 17 mg/ml.

El espesor de la película de DAAO obtenida es de aproximadamente 15 a 25 μm .

Ejemplo 2: Preparación de un electrodo de platino en forma de disco cubierto con D-aminoácido oxidasa de levadura para la detección de D-serina.

Los electrodos se prepararon insertando un alambre de platino de 400 μm de diámetro en un capilar de vidrio y sellando la punta de la pipeta mediante fusión del vidrio sobre una llama. El alambre de platino dentro de la pipeta se suelda a continuación a un alambre de cobre usando un soldador de Pb-Sn y el extremo final de la pipeta se sella usando resina epoxi. La punta del electrodo se pule a continuación usando papel de lija de finura en aumento (terminando con pasta de esmeril de 0,3 μm de Al_2O_3) para someterla a un disco de limpieza de Pt de 400 μm de diámetro.

Una primera capa de poli-m-fenilendiamina se deposita mediante electropolimerización de m-fenilendiamina (véase el ejemplo 1). La capa enzimática se depositó mediante colocación de una pequeña gota (~ 30 nl) de una disolución de Rhodotorula Gracilis D-aminoácido oxidasa RgDAAO (56 mg/ml de RgDAAO, 25 mg/ml de Albúmina de suero Bovino (BSA) y 1 % de glicerol) sobre el disco de Pt y su exposición a vapores saturados de glutaraldehído durante 5 min. El electrodo se aclara después en tampón salino de fosfato (PBS), se seca y se almacena a 4°C en atmósfera seca. El espesor de la membrana resultante era de aproximadamente 5-10 μm .

Ejemplo 3: Detección de D-serina usando el microelectrodo de la presente invención

El microelectrodo usado en este ejemplo era el mismo del ejemplo 2.

Se obtuvo una curva de calibración en D-serina que va de 5 μM a 1,2mM con el microelectrodo del ejemplo 2 (Figura 3 B). La respuesta del microelectrodo es lineal con la concentración entre 5 μM y al menos 100 μM .

Se midió la corriente de oxidación en el microelectrodo tras la aplicación de serotonina (5-HT, 20 μM), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 1 μM), y D-serina (1 μM y 2 μM) (Figura 3 A). La D-serina y H_2O_2 se detectaron como un escalón en la corriente de oxidación y la interferencia de 5-HT se rechazó (Figura 3B).

Ejemplo 4: Dispositivos para medir la concentración de D-serina

El sistema de comando y adquisición está compuesto de una tarjeta de adquisición ITC-18 (Instrutech Corporation, Greatneck, NY, EE.UU.), que lleva un amplificador VA-10 (NPI Electronics, Tamm, Alemania) equipado con un potencióstato de dos electrodos (electrodo de trabajo que corresponde al microelectrodo de la invención y electrodo de referencia de fabricación casera compuesto de un alambre de cloruro de plata). La tarjeta de adquisición está equipada con el software SVoltare.

Ejemplo 5: cultivos de células.

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se prepararon de ratas recién nacidas y se cultivaron hasta que se alcanzó la confluencia (14 días). Los astrocitos se trataron después 5 días con 8 μM de citosina arabinofuranosida para eliminar la microglia que queda.

Las células se colocaron en una cámara perfundida con tampón Krebs. El microelectrodo de la invención se ha colocado en la parte superior de las células sin tocarlas. Se añadió triton® X-100 1% o digitonina 50 μM en el medio de perfusión para romper la integridad de la membrana celular. Este tratamiento indujo un aumento de la corriente de oxidación en el microelectrodo que es debido a la liberación de los depósitos intracelulares de D-serina (Fig 4). Se puede proporcionar una estimación de los depósitos intracelulares de D-serina midiendo la superficie integrada de la corriente de oxidación. Este método permite por lo tanto la medida de los depósitos intracelulares de D-serina de las células en el cultivo.

Ejemplo 6: registros in vivo en el SNC de una rata anestesiada

Se anestesiaron ratas Wistar macho que pesaban entre 300 y 400g con hidrato de cloral y se colocaron en un aparato estereotáxico. El electrodo de referencia se dejó en la superficie del cráneo y el electrodo de trabajo se insertó en el cerebelo a aproximadamente 1,5 mm por debajo de la superficie de la piamadre.

Después de un tiempo de estabilización de 30 min, se registró la corriente de oxidación en el electrodo de trabajo a un potencial de 0,5V vs. Ag/AgCl.

Se inyectó D-serina a continuación intraperitonealmente a una concentración de 1g/kg de peso corporal.

Después de unos minutos la señal por nuestro método aumentó en aproximadamente 90 pA, lo que sugiere que la D-serina que penetra a través de la barrera sangre-cerebro en el sistema nervioso central era detectada por el microelectrodo como se define en el ejemplo 1.

Ejemplo 7: Detección de D-serina en extractos de cerebro de rata**A. Preparación de las muestras de cerebro**

Se decapitaron ratas Wistar macho (300-400g) con anestesia de isofurano, y se eliminó el prosencéfalo y se homogeneizó en 5 ml de ácido tricloroacético al 5% (TCA) para precipitar las proteínas. El homogenato a continuación se centrifuga a 20 000 g durante 10 min. Se extrae el TCA del sobrenadante usando éter, antes de la liofilización y almacenamiento a -20°C.

B. Medidas de cromatografía líquida de presión elevada (HPLC)

Los extractos de cerebro liofilizados se disolvieron en 1 ml de agua desionizada y se derivatizaron 50 µl con 0,8 mg de N-acetil-cisteína y 0,25 mg o-ftaldialdehído en un tampón de borato 0,1M (pH 10,4). Las medidas de HPLC se realizaron usando un instrumento Waters Alliance (Waters Corporation, Guyancourt, Francia) con una columna de simetría Waters (4,6x250mm). La columna y los compartimentos para muestras se mantuvieron a 30 y 4°C respectivamente. El caudal se fijó a 1 ml/min y el tiempo de experimento era de 25 min para todos los análisis. La L- y D-serina se detectaron con un método isocrático usando la fase móvil A (990 ml de acetato de sodio 0,1 M y 10 ml de tetrahidrofurano, pH 6,2) y la columna se lavó usando la fase móvil B (500 ml de acetato de sodio 0,1 M, 470 ml de acetonitrilo, 30 ml de tetrahidrofurano, pH 6,2). Los derivados de aminoácidos se detectaron usando un detector de fluorescencia Waters r (excitación 344 nm, emisión 443 nm), y los datos se adquirieron usando el paquete de software Empower Pro (Waters Corporation, Guyancourt, Francia). La calibración de la D-serina se realizó usando una curva patrón de 7 puntos.

C. Comparación entre la detección de D-serina usando HPLC o el microelectrodo de la presente invención.

La concentración de D-serina en los extractos de cerebro se estimó mediante dos métodos independientes, usando HPLC o el microelectrodo RgDAAO (Fig. 5). La concentración de D-serina estimada por HPLC era de aproximadamente 130 µM mientras que el microelectrodo proporcionaba un estimado de 139 µM. Además, se preincubaron los extractos de cerebro con DAAO y catalasa para eliminar D-aminoácidos y el peróxido presentes en el medio (Fig. 5 A y Fig 5B). Las medidas de HPLC indicaban que la D-serina había desaparecido por completo en el extracto de cerebro, mientras que el microelectrodo detectaba solo una pequeña respuesta amperométrica que suponía aproximadamente el 5% de la respuesta original antes del tratamiento enzimático (Fig. 5 C).

Estos datos indicaban que el microelectrodo de la presente invención puede detectar selectivamente D-serina en medios biológicos complejos tales como extractos de cerebro, con no más de 5-7 % de desviación de las medidas de HPLC.

30 REFERENCIAS

[1] Stulik K, Amatore C, Holub K, Marecek V y Kutner W (2000) Microelectrodes. Definitions, characterization and applications (technical report). Pure Appl. Chem. 72: 1483-92.

[2] G. Molla, C. Vegezzi, M.S. Pilone, L. Pollegioni, Overexpression in Escherichia coli of a recombinant chimeric Rhodotorula gracilis D-aminoácido oxidasa, Prot. Express. Purif., 14 (1998) 289-294

35

REIVINDICACIONES

1. Microelectrodo para medir la concentración de un D-aminoácido, comprendiendo dicho microelectrodo:
- al menos una D-aminoácido oxidasa (DAAO) de una levadura o un microorganismo, para la oxidación de dicho D-aminoácido en al menos un compuesto B,
- 5 - medios para optimizar la detección de dicho compuesto B, siendo dichos medios medios para la catálisis de la oxidación del compuesto B, y
- medios para reducir las interferencias debidas a la oxidación de otras especies diferentes del compuesto B, en donde los medios para reducir las interferencias son limitar la oxidación de los compuestos diferentes del compuesto B que puede oxidarse mediante el electrodo.
- 10 2. Microelectrodo según la reivindicación 1, en donde dicha D-aminoácido oxidasa conduce a la producción de peróxido de hidrógeno como el compuesto B.
3. Microelectrodo según cualquiera de la reivindicación 1 ó 2, en donde la D-aminoácido oxidasa (DAAO) no necesita la adición de un cofactor en el medio para oxidar el D-aminoácido y/o muestra una actividad de al menos 20 unidades/mg.
- 15 4. Microelectrodo según la reivindicación 1, en donde dicha DAAO se selecciona del grupo que comprende *Rhodotorula gracilis* DAAO (*RgDAAO*), *Trigonopsis variabilis* DAAO, *V. luteoalbum* DAAO, *F. oxysporum* DAAO y sus derivados.
- 20 5. Microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el D-aminoácido se selecciona del grupo que comprende D-alanina, D-valina, D-leucina, D-isoleucina, D-metionina, D-prolina, D-fenilalanina, D-triptofan, D-serina, D-treonina, D-tirosina, D-cisteína, D-asparagina, D-glutamina, D-lisina, D-arginina y D-histidina, y sus derivados.
6. Microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el D-aminoácido es D-serina.
7. Microelectrodo según cualquiera de reivindicaciones 1 a 6, en donde los medios para la oxidación del D-aminoácido es inmovilizarlo sobre el electrodo mediante:
- 25 - Inmovilización covalente,
- Atrapar la D-aminoácido oxidasa (DAAO),
 - Inmovilización en el cuerpo del electrodo, y/o
 - Adsorción.
- 30 8. Microelectrodo según cualquiera de reivindicaciones 1 a 7, en donde los medios para optimizar la detección de dicho compuesto B se seleccionan de :
- un pretratamiento electroquímico del electrodo,
 - deposición de al menos un metal
 - deposición de un sistema artificial que cataliza la oxidación del compuesto B,
 - peroxidasa de rábano picante (HRP),
- 35 - uso de nanopartículas, y
- una combinación de los mismos.
9. Microelectrodo según la reivindicación 8, en donde
- dicho electrodo es un electrodo basado en carbono,
 - dicha deposición es una deposición electroquímica o a vacío de un metal que cataliza la oxidación del compuesto B,
- 40 - dicho sistema artificial es un sistema artificial de peroxidasa basado en azul de Prusia.
10. Microelectrodo según reivindicación 8 ó 9, en donde el metal se selecciona del grupo que comprende platino, oro, rutenio, rodio, paladio, iridio, osmio, hierro, cromo, níquel y wolframio.

- 11.** Microelectrodo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los medios para reducir las interferencias son a través de limitar el acceso y/o el contacto de dichos compuestos distintos del compuesto B con el electrodo.
- 5 **12.** Microelectrodo según cualquiera de reivindicaciones 1 a 11, en donde los medios para reducir las interferencias se seleccionan de
- membranas poliméricas electrogeneradas,
 - membranas depositadas de disoluciones de polímeros neutros o cargados,
 - capa molecular no polimérica cargada,
 - uso de al menos una enzima que degrada la(s) molécula(s) que interfiere(n), y
- 10 - uso de métodos electroquímicos que permiten discriminar entre diferentes moléculas.
- 13.** Microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el electrodo se elige del grupo que comprende:
- electrodos basados en platino, rodio, paladio, oro, rutenio
 - electrodos basados en materiales de carbono, grafito y carbono brillante, fibras de carbono, diamante,
- 15 - electrodos cubiertos por nanopartículas basados en metales nobles, materiales de carbono o una mezcla de los mismos, y
- electrodos amperométricos basados en cerámica.
- 14.** Microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el microelectrodo es un electrodo de fibra de carbono cubierto por una capa de rutenio, una capa de PPD y una capa de D-aminoácido oxidasa (DAAO).
- 20 **15.** Dispositivo para detectar y/o para medir la concentración de un D-aminoácido en un medio, que comprende un electrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 16.** Método para detectar y/o medir la concentración de un D-aminoácido en un medio *in vitro* que comprende las etapas siguientes:
- un microelectrodo de trabajo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 se coloca en dicho medio,
- 25 - se aplica un potencial de trabajo, y
- la concentración del D-aminoácido se detecta y/o se mide.
- 17.** Método según la reivindicación 16, en donde el potencial de trabajo se aplica mediante voltametría cíclica, voltametría/amperometría pulsada o aplicando un potencial constante.
- 18.** Método para obtener un microelectrodo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende las etapas siguientes:
- 30 - tratar el electrodo para aumentar su sensibilidad al compuesto B,
- la deposición de una película polimérica para discriminar el compuesto B de otros compuestos presentes en el medio y que pueden ser oxidados por el electrodo,
 - la deposición de una película de una enzima que oxida el compuesto A al compuesto B en el electrodo, y después
- 35 inmovilizar dicha enzima.
- 19.** Método según la reivindicación 18, en donde el electrodo se trata mediante una metalización.

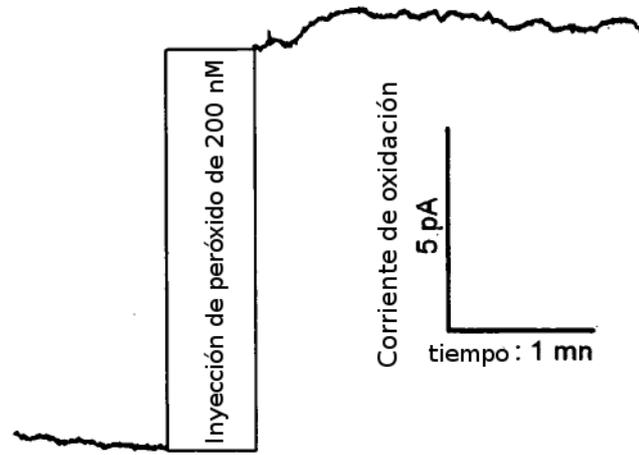


Figura 1

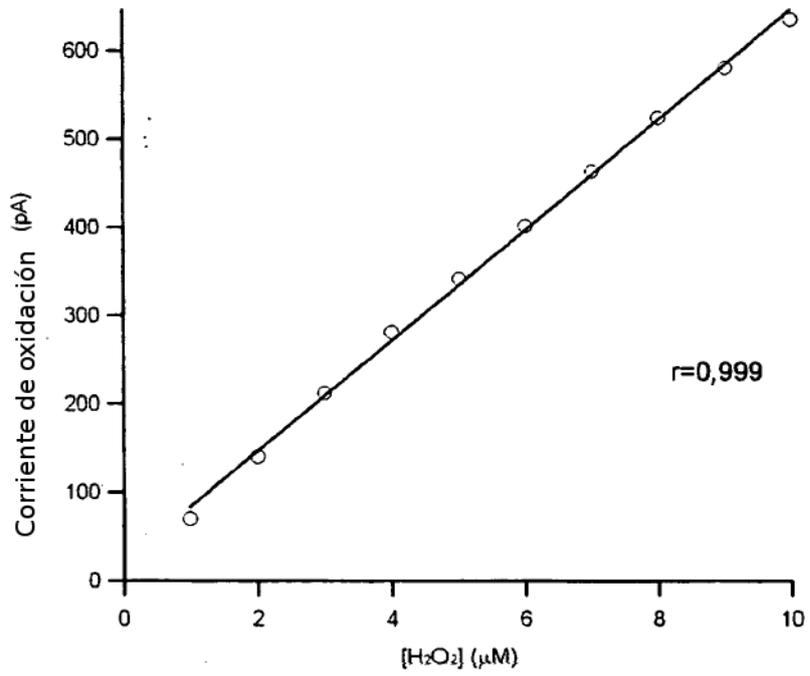


Figura 2

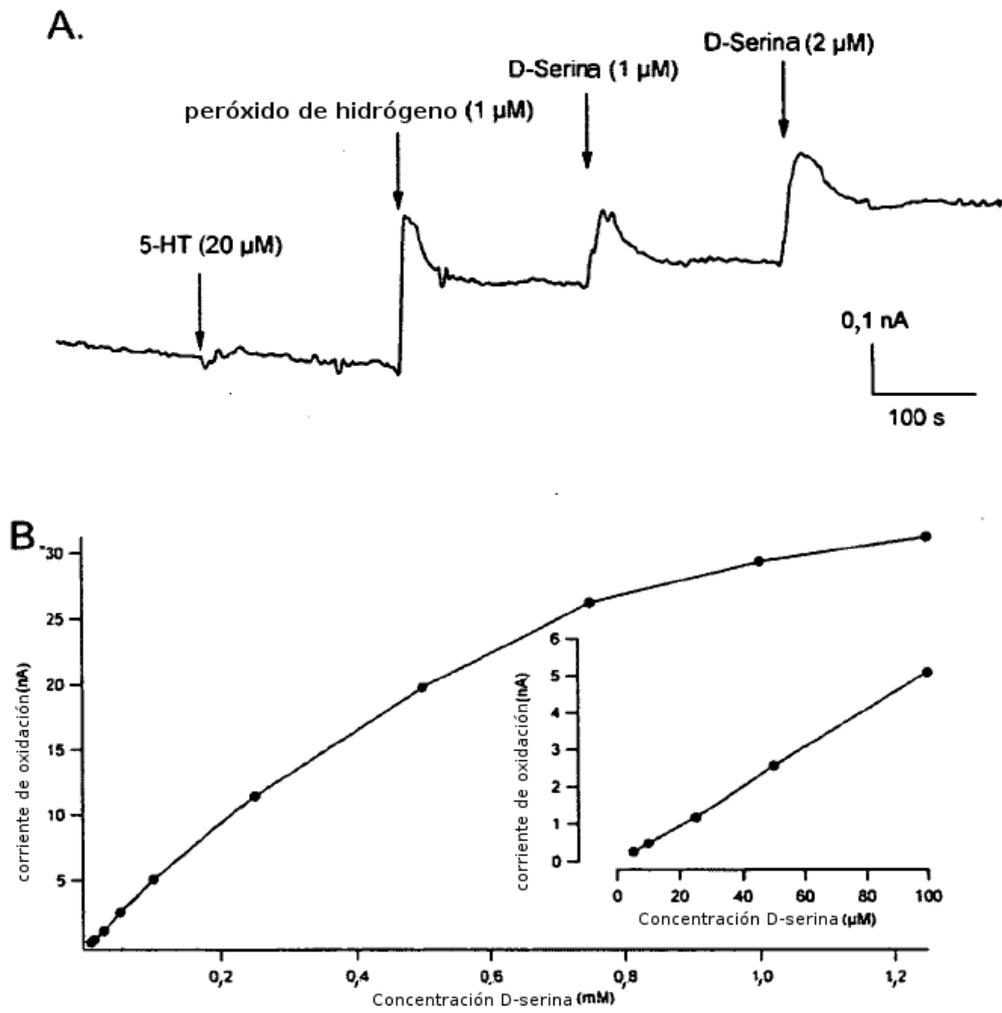


Figura 3

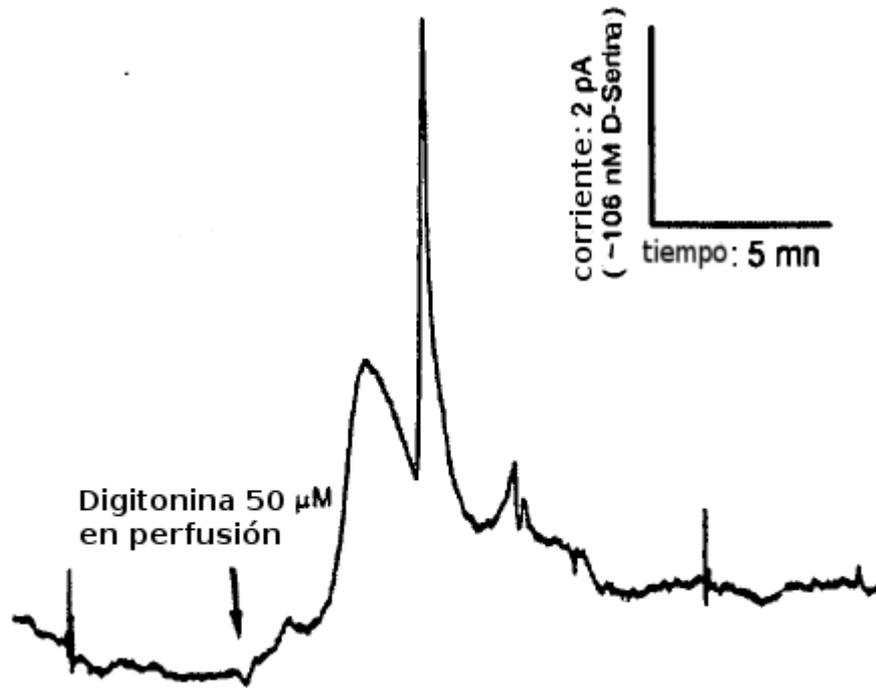


Figura 4

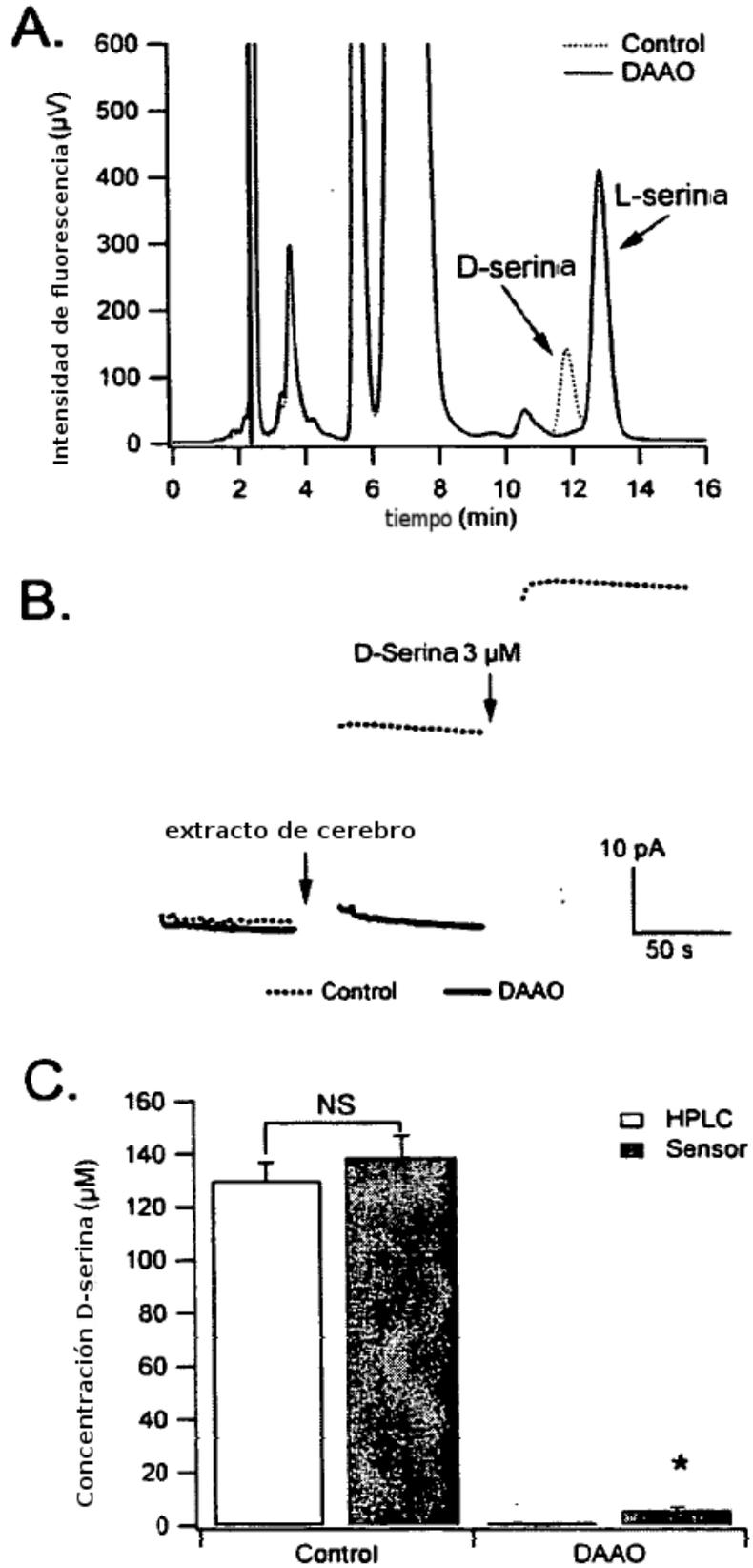


Figura 5