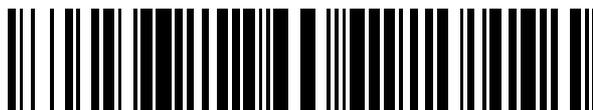


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 628**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)

**G01N 27/416** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07741962 .0**

96 Fecha de presentación: **19.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2017607**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **Biosensor**

30 Prioridad:

**19.04.2006 JP 2006116175**

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:

**PANASONIC CORPORATION (100.0%)  
1006, OAZA KADOMA, KADOMA-SHI  
OSAKA 571-8501, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAYAMA, JUNKO;  
TAKAHARA, YOSHIFUMI;  
YAMANISHI, ERIKO y  
ITOH, YOSHIHIRO**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 392 628 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

Biosensor.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un biosensor para medir la concentración de un componente específico de una disolución de muestra.

10 **Antecedentes de la técnica**

Un biosensor es un sensor que utiliza las capacidades de identificación de moléculas de materiales biológicos tales como microorganismos, enzimas y anticuerpos, para aplicar los materiales biológicos como elementos de reconocimiento de moléculas. De manera específica, el biosensor utiliza una reacción que se produce cuando un material biológico inmovilizado reconoce un componente diana específico, tal como el consumo de oxígeno por la respiración de un microorganismo, una reacción enzimática o luminiscencia.

Entre los biosensores, los sensores enzimáticos se han desarrollado en aplicaciones prácticas, y por ejemplo, se utilizan sensores enzimáticos para glucosa, ácido láctico, colesterol, lactosa, ácido úrico, urea y aminoácido, en mediciones médicas y la industria alimentaria. Un sensor enzimático reduce un aceptor de electrones mediante un electrón generado por una reacción entre una enzima y un sustrato incluido en una disolución de muestra como muestra, y el dispositivo de medición mide electroquímicamente la cantidad de oxidación-reducción del aceptor de electrones, para realizar así un análisis cuantitativo de la muestra.

La figura 5 muestra una perspectiva explosionada de un biosensor con sistema de tres electrodos como ejemplo de tal biosensor.

El biosensor mostrado en la figura 5 se fabrica tal como sigue. Después de formarse una capa conductora de la electricidad sobre un sustrato 1 aislante mediante un procedimiento de deposición por pulverización o un procedimiento de serigrafía, se forman ranuras utilizando un láser o similar para producir un electrodo de trabajo 2, un contraelectrodo 3 y un electrodo de detección 4, y entonces se forma sobre esos electrodos una capa 5 de reactivo que incluye una enzima que reacciona con un componente específico en una disolución de muestra, y un portador de electrones. Además se unen entre sí un separador 6 que presenta una muesca 6a y una cubierta 8 sobre la capa 5 de reactivo y los electrodos 2, 3 y 4, formando así una cavidad 7 en la que se suministra la disolución de muestra. Aunque el suministro de la disolución de muestra desde la cavidad 7 al biosensor se realiza mediante un fenómeno de capilaridad, el suministro suave de la disolución de muestra se realiza dotando la cubierta 8 de un orificio 9 de ventilación para dejar que el aire de la cavidad 7 salga fuera del biosensor.

Cuando se aplica la disolución de muestra a una entrada de la cavidad 7 del biosensor así configurado, se suministra la disolución de muestra desde la entrada de la cavidad 7 hacia la cavidad 7 mediante el fenómeno de capilaridad, y cuando alcanza la posición de la capa 5 de reactivo el componente específico en la disolución de muestra reacciona con el reactivo incluido en la capa 5 de reactivo. La cantidad de cambio de corriente que se produce debido a esta reacción se lee con un dispositivo de medición externo que está conectado a través de los cables 10, 11 y 12 del electrodo de trabajo 2, el contraelectrodo 3 y el electrodo de detección 4, respectivamente. El valor de corriente leído se convierte en la concentración del componente específico para determinar la cantidad del componente específico en la disolución de muestra.

El documento EP 1 785 483 describe un biosensor de glucosa que comprende una glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ como enzima y una celda electroquímica.

El documento WO 2004/038401 describe un biosensor de glucosa convencional.

La bibliografía no de patentes, Laurinavicius V *et al.*: "Oxygen insensitive glucose biosensor based on PQQ dependent dehydrogenase" Analytical letters, vol. 32, n.º 2, 1999, páginas 299-316, describe un biosensor de glucosa que comprende una glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ como enzima.

Documento de patente 1: solicitud de patente japonesa publicada n.º 2000-171428.

Documento de patente 2: solicitud de patente japonesa publicada n.º 2001-343350.

60 Documento de patente 3: solicitud de patente japonesa publicada n.º 2002-207022.

**Descripción de la invención**

**Problemas que va a resolver la invención**

5 Sin embargo, el biosensor convencional presenta el problema de que no puede obtenerse un resultado correcto de inspección debido a una influencia del hematocrito si la disolución de muestra es sangre. Especialmente, se utiliza con frecuencia un sensor enzimático para glucosa para la medición en el momento de la inyección de insulina antes de las comidas o la evaluación para hipoglucemia, y existe la posibilidad de inducir una administración excesiva de insulina o de no detectar el nivel de glucemia si se presenta una concentración de glucosa superior al valor real debido a la influencia del hematocrito. Por tanto, se desea un biosensor altamente preciso que no se vea afectado por la influencia del hematocrito cuando la disolución de muestra es sangre.

15 Además, el biosensor convencional presenta el problema de que no puede obtenerse un resultado correcto de la inspección debido a la influencia de la temperatura ambiente. Aunque el resultado de la inspección se corrige utilizando un dispositivo de control de la temperatura o similar para resolver este problema, puede realizarse una corrección errónea si el dispositivo de control de la temperatura no puede responder a un cambio rápido de temperatura y hace un reconocimiento falso de la temperatura, y no puede obtenerse un resultado correcto de inspección. Por consiguiente, se requiere un biosensor que difícilmente se vea afectado por la temperatura ambiente.

20 La presente invención se realiza para resolver los problemas descritos anteriormente y presenta como objetivo proporcionar un biosensor altamente preciso que pueda evitar la influencia del hematocrito y la influencia de la temperatura ambiente.

**25 Medidas para resolver los problemas**

Con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente la presente invención proporciona un biosensor tal como se define en la reivindicación 1.

**30 Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama que ilustra la influencia del hematocrito sobre las características de respuesta del sensor en el caso en el que se añada BSA a una capa de reactivo en un biosensor según un primer ejemplo de la presente invención.

35 La figura 2 es un diagrama que ilustra la influencia de la temperatura sobre las características de respuesta del sensor, en el caso en el que se añada BSA a una capa de reactivo en el biosensor según el primer ejemplo.

40 La figura 3 es un diagrama que ilustra la influencia del hematocrito sobre las características de respuesta del sensor, en el caso en el que se añada BSA a una capa de reactivo en un biosensor según un ejemplo de referencia de la presente invención.

45 La figura 4 es un diagrama que ilustra la influencia de la temperatura sobre las características de respuesta del sensor, en el caso en el que se añada BSA a una capa de reactivo en el biosensor según el ejemplo de referencia.

La figura 5 es una vista en perspectiva explosionada de un biosensor con sistema de tres electrodos convencional.

**Descripción de los números de referencia**

- 50 1 ... sustrato
- 2 ... electrodo de trabajo
- 3 ... contraelectrodo
- 4 ... electrodo de detección
- 5 ... capa de reactivo
- 55 6 ... separador
- 6a ... muesca
- 7 ... cavidad
- 8 ... cubierta
- 9 ... orificio de ventilación
- 60 10, 11, 12 ... cables

**Mejor modo de poner en práctica la invención**

65 A continuación en la presente memoria se describirá un ejemplo preferido de la presente invención con referencia a los dibujos. En el ejemplo de la presente invención descrito a continuación en la presente memoria se mostrará a

modo de ejemplo un sensor enzimático que adopta una enzima como elemento de identificación molecular que reacciona específicamente con un componente específico en una disolución de muestra

Primer ejemplo

5

Se describirá un biosensor según un primer ejemplo de la presente invención.

10

El biosensor de este primer ejemplo se caracteriza porque se añade una proteína solubilizada a la capa 5 de reactivo del biosensor mostrado en la figura 5. En este primer ejemplo se utiliza como enzima glucosa deshidrogenasa que presenta flavina-adenina dinucleótido como coenzima (denominada a continuación en la presente memoria FAD-GDH). Además se utiliza como proteína solubilizada albúmina sérica bovina (denominada a continuación en la presente memoria BSA).

15

A continuación en la presente memoria, se describirá la función y el efecto de este primer ejemplo.

20

La figura 1 es un diagrama que ilustra la influencia del hematocrito sobre las características de respuesta del sensor cuando se añade BSA a la capa 5 de reactivo en el biosensor del primer ejemplo. En la figura 1, el eje de ordenadas muestra la divergencia de la sensibilidad del sensor cuando el valor del hematocrito es del 45% y el eje de abscisas muestra el valor del hematocrito.

25

Como disolución de muestra, se utiliza sangre completa que presenta una concentración de glucosa ajustada a 350 mg/dl. Además, la cantidad de enzima de FAD-GDH es de 2 U (unidades) por sensor.

30

Se mide el valor de respuesta del sensor haciendo variar la concentración de BSA añadida a la capa 5 de reactivo, que constituye el biosensor del primer ejemplo, desde 0 hasta 0,0035 mg por 1 U de enzima, en otras palabras, desde 0 hasta 0,007 mg por sensor en la disolución de reactivo.

35

Como resultado de la medición, en el intervalo de concentración en el que el valor del hematocrito es del 25 al 65%, no se encuentra ningún cambio en el valor de respuesta del sensor, incluso cuando se añade BSA. Por otra parte, en el intervalo de concentración baja en el que el valor del hematocrito es del 25% e inferior, la influencia del hematocrito sobre las características de respuesta del sensor se reduce de acuerdo con la cantidad de BSA añadida.

40

De este modo, cuando están contenidas FAD-GDH y BSA en la capa 5 de reactivo, el efecto de la adición de BSA se aprecia en el intervalo de concentración baja en el que el valor del hematocrito es del 0 al 25%, mientras que no se aprecia ningún efecto de la adición de BSA en el intervalo de concentración en el que el valor del hematocrito es del 25 % y superior.

45

La figura 2 es un diagrama que ilustra la influencia de la temperatura sobre las características de respuesta del sensor cuando se añade BSA a la capa 5 de reactivo en el biosensor del primer ejemplo. En la figura 2 el eje de ordenadas muestra la divergencia de la sensibilidad a una temperatura de 25°C y el eje de abscisas muestra la temperatura.

50

Como disolución de muestra se utiliza sangre completa que presenta una concentración de glucosa ajustada a 350 mg/dl. Además la cantidad de enzima de FAD-GDH es de 2 U por sensor.

55

Se miden las características de respuesta del sensor haciendo variar la concentración de BSA añadida a la capa 5 de reactivo, que constituye el biosensor del primer ejemplo, desde 0 hasta 0,0035 mg por 1 U de enzima, en otras palabras, desde 0 hasta 0,007 mg por sensor en la disolución de reactivo.

60

Como resultado de la medición, en el intervalo de temperatura comprendido entre 5 y 25°C no se encuentra ningún cambio en el valor de respuesta del sensor, incluso cuando se añade BSA. Por otra parte, en el intervalo de temperatura alta de 25°C y superior, la influencia de la temperatura sobre las características de respuesta del sensor se reduce de acuerdo con la cantidad de BSA añadida.

65

De este modo, cuando están contenidas FAD-GDH y BSA en la capa 5 de reactivo, el efecto de la adición de BSA se aprecia en el intervalo de temperatura superior a 25°C, mientras que no se aprecia ningún efecto de la adición de BSA en el intervalo de temperatura de 25°C e inferior.

Por consiguiente, puede determinarse que las características tanto del hematocrito como de la temperatura pueden potenciarse cuando se incluye BSA en la capa 5 de reactivo en una cantidad de 0,0035 mg por 1 U de enzima o de 0,007 mg por sensor.

Según el biosensor de este primer ejemplo, ya que una gran cantidad de BSA está contenida en la capa 5 de reactivo, que incluye la enzima FAD-GDH, puede mejorarse la influencia del hematocrito y la temperatura sobre las características de respuesta del sensor.

**Ejemplo de referencia.**

Se describirá un biosensor según el ejemplo de referencia de la presente invención.

5 El biosensor de este ejemplo de referencia se caracteriza porque se añade una proteína solubilizada a la capa 5 de reactivo del biosensor mostrado en la figura 5. En este ejemplo de referencia se utiliza como enzima glucosa deshidrogenasa que presenta pirrolo-quinolin-quinona como coenzima (denominada a continuación en la presente memoria PQQ-GDH) Además se utiliza albúmina sérica bovina (denominada a continuación en la presente memoria BSA) como proteína solubilizada.

10 A continuación en la presente memoria se describirá la función y el efecto de este ejemplo de referencia.

La figura 3 es un diagrama que ilustra la influencia del hematocrito sobre las características de respuesta del sensor cuando se añade BSA a la capa 5 de reactivo en el biosensor del ejemplo de referencia. En la figura 3 el eje de ordenadas muestra la divergencia de la sensibilidad del sensor cuando el valor del hematocrito es del 45% y el eje de abscisas muestra el valor del hematocrito.

Como disolución de muestra se utiliza sangre completa que presenta una concentración de glucosa ajustada a 350 mg/dl. Además la cantidad de enzima de PQQ-GDH es de 1,7 U por sensor.

20 Se mide el valor de respuesta del sensor haciendo variar la concentración de BSA añadida a la capa 5 de reactivo, que constituye el biosensor del ejemplo de referencia, desde 0 hasta 0,008 mg por 1 U de enzima, en otras palabras, desde 0 hasta 0,014 mg por sensor en la disolución de reactivo.

25 Como resultado de la medición, no se aprecia ningún efecto de la adición de BSA sobre el valor de respuesta del sensor en la región en la que el valor del hematocrito es del 25 al 65%. Por otra parte, en el intervalo de concentración baja en el que el valor del hematocrito es del 25% e inferior, la influencia del hematocrito sobre las características de respuesta del sensor se reduce de acuerdo con la cantidad de BSA añadida.

30 De este modo, cuando están contenidas PQQ-GDH y BSA en la capa 5 de reactivo, el efecto de la adición de BSA se aprecia en el intervalo de concentración bajo en el que el valor del hematocrito es del 0 al 25%, mientras que no se aprecia ningún efecto de la adición de BSA en el intervalo de concentración en el que el valor del hematocrito es del 25% y superior.

35 La figura 4 es un diagrama que ilustra la influencia de la temperatura sobre las características de respuesta del sensor cuando se añade BSA a la capa 5 de reactivo en el biosensor del ejemplo de referencia. En la figura 2 el eje de ordenadas muestra la divergencia de la sensibilidad a una temperatura de 25°C y el eje de abscisas muestra la temperatura.

40 Como disolución de muestra se utiliza plasma sanguíneo que presenta una concentración de glucosa ajustada a 350 mg/dl. La cantidad de enzima de PQQ-GDH es de 1,7 U por sensor.

45 Se miden las características de respuesta del sensor haciendo variar la concentración de BSA añadida a la capa 5 de reactivo, que constituye el biosensor del ejemplo de referencia, desde 0 hasta 0,008 mg por 1U de enzima, en otras palabras, desde 0 hasta 0,014 mg por sensor en la disolución de reactivo.

50 Como resultado de la medición, en el intervalo de temperatura de 25 a 45°C no se aprecia ningún cambio en el valor de respuesta del sensor, incluso cuando se añade BSA. Por otra parte, en el intervalo de temperatura baja de 25°C e inferior, la influencia de la temperatura sobre las características de respuesta del sensor se reduce de acuerdo con la cantidad de BSA añadida.

De este modo, cuando están contenidas PQQ-GDH y BSA en la capa 5 de reactivo, el efecto de la adición de BSA se aprecia cuando la temperatura es inferior a 25°C, mientras que no se aprecia ningún efecto de la adición de BSA cuando la temperatura es de 25°C o superior.

55 Por consiguiente, puede determinarse que las características tanto del hematocrito como de la temperatura pueden potenciarse cuando se incluye BSA en la capa 5 de reactivo en una cantidad de 0,004 a 0,008 mg por 1 U de enzima, o de 0,0007 a 0,014 mg por sensor. Además, ya que el efecto no cambia cuando se añade BSA en una cantidad superior a 0,004 mg por 1 U de enzima o superior a 0,007mg por sensor, puede determinarse que el valor óptimo de BSA es de 0,004 mg por 1 U de enzima o 0,007 mg por sensor.

60 Según el biosensor de este ejemplo de referencia, ya que una gran cantidad de BSA está contenida en la capa de reactivo que incluye la enzima PQQ-GDH, puede mejorarse la influencia del hematocrito y la temperatura sobre las características de respuesta del sensor.

65

5 Aunque en el primer ejemplo se adopta FAD-GDH como enzimas en la capa 5 de reactivo, pueden adoptarse otras enzimas utilizadas para inspección clínica, tales como colesterol oxidasa, colesterol esterasa, colesterol deshidrogenasa, lipoproteína lipasa, catalasa, peroxidasa, lactato oxidasa, lactato deshidrogenasa, ureasa, uricasa, glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, hexoquinasa, ácido ascórbico oxidasa, ácido ascórbico deshidrogenasa, diaforasa y similares.

10 Aunque en el primer ejemplo y en el ejemplo de referencia se adopta BSA como proteína solubilizada, también pueden obtenerse los mismos efectos cuando se adoptan albúmina de huevo, gelatina, colágeno o similares. Puede determinarse que el valor óptimo de la cantidad de la proteína solubilizada añadida es 0,004 mg por 1 U de enzima o 0,007 mg por sensor.

Aunque en el primer ejemplo y en el ejemplo de referencia se describe un biosensor con sistema de tres electrodos, puede utilizarse un biosensor con sistema de dos electrodos.

15 **Aplicabilidad industrial**

Puede utilizarse un biosensor de la presente invención como sensor enzimático de alta precisión, que puede reducir la influencia del hematocrito así como la influencia de la temperatura.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Biosensor para medir la concentración de un componente específico en una disolución de muestra, en el que están previstos unos electrodos que incluyen por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo sobre un sustrato aislante,
- una proteína solubilizada está contenida en una capa de reactivo que incluye un reactivo que reacciona específicamente con el componente específico en la disolución de muestra,
- 10 la proteína solubilizada es albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gelatina o colágeno,
- la capa de reactivo incluye por lo menos una enzima y un portador de electrones, y dicha capa de reactivo está formada sobre los electrodos, o está formada, de tal manera que los electrodos están dispuestos en un área de difusión en la que el reactivo de la capa de reactivo es disuelto en la disolución de muestra que va a difundirse, y
- 15 la enzima es glucosa deshidrogenasa que presenta flavina-adenina dinucleótido como coenzima.
2. Biosensor según la reivindicación 1, en el que la cantidad de la proteína solubilizada contenida está dentro de un intervalo comprendido entre 0,0004 y 0,008 mg por 1 U de enzima.
- 20 3. Biosensor según la reivindicación 1, en el que la cantidad de la proteína solubilizada contenida está dentro de un intervalo comprendido entre 0,0007 y 0,014 mg por sensor.
4. Biosensor según la reivindicación 2, en el que la cantidad de la proteína solubilizada contenida está dentro de un intervalo comprendido entre 0,0035 y 0,004 mg por 1 U de enzima.
- 25 5. Biosensor según la reivindicación 3, en el que la cantidad de la proteína solubilizada contenida es de 0,007 mg por sensor.

Fig.1

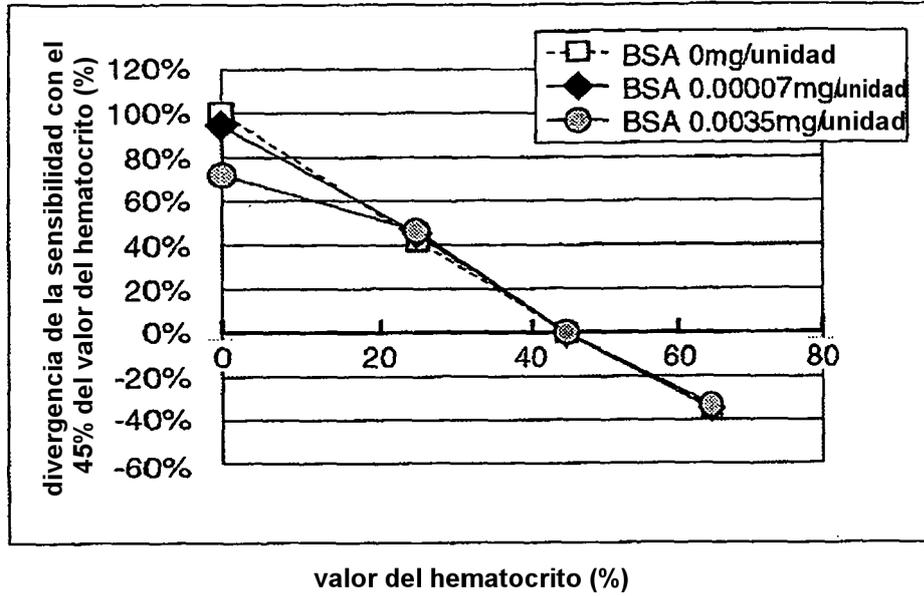


Fig.2

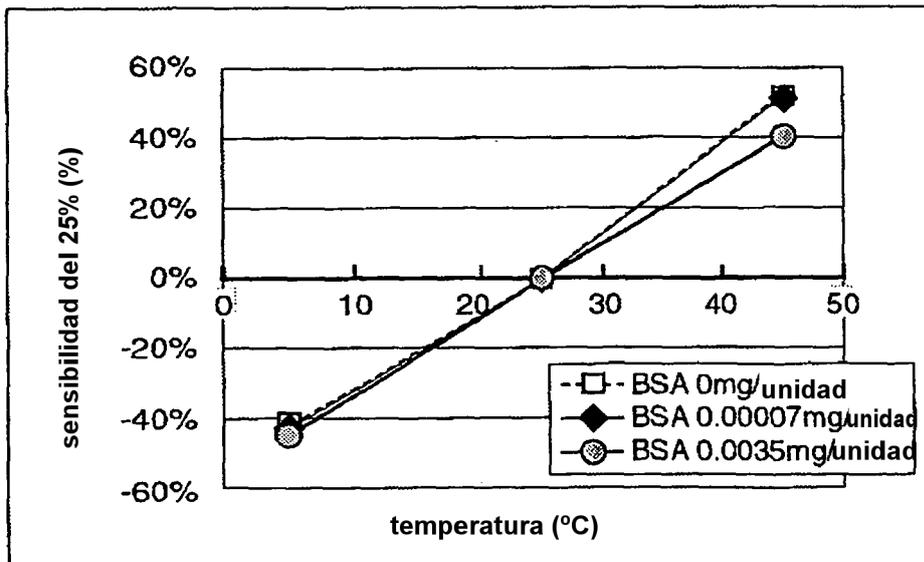


Fig.3

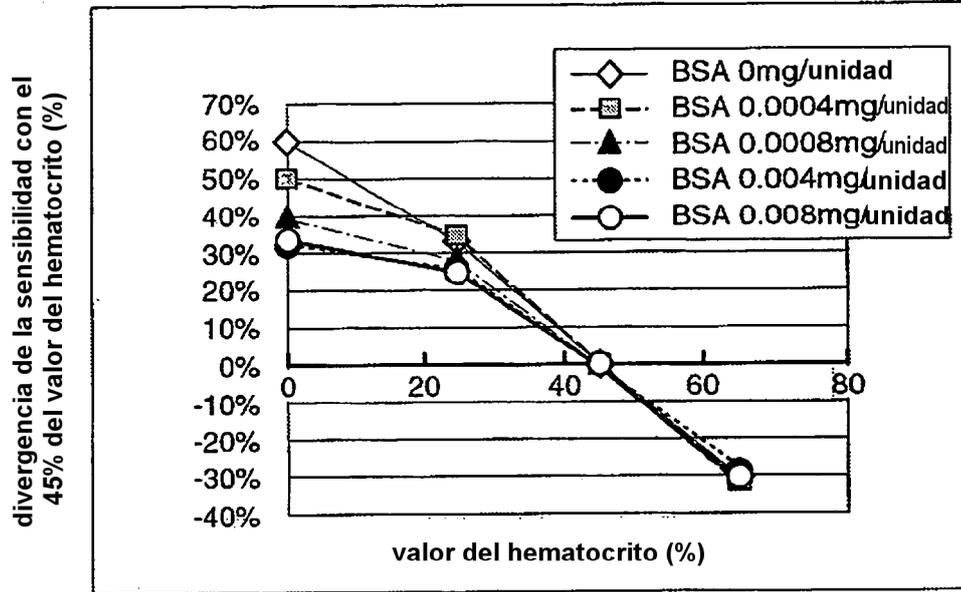


Fig.4

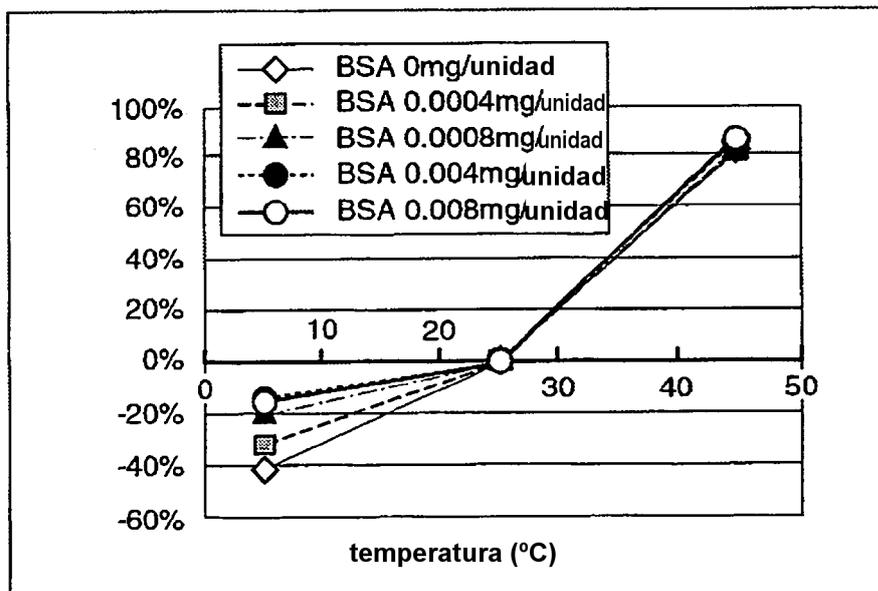


Fig.5

