

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 576**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10790942 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2510354**

54 Título: **Química esterilizable para elementos de ensayo**

30 Prioridad:

11.12.2009 EP 09178958

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.02.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HORN, CARINA y
STEINKE, NELLI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 443 576 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

Química esterilizable para elementos de ensayo

5 La presente invención se refiere a un elemento diagnóstico y a un método para prepararlo.

10 Los elementos diagnósticos son componentes importantes de métodos analíticos relevantes. En primer plano figura la medición de analitos, p.ej. metabolitos o substratos, que, por ejemplo, se determinan directa o indirectamente con la ayuda de un enzima específico para el analito. En este caso los analitos se hacen reaccionar con un complejo enzima-coenzima y a continuación se cuantifican. Para ello, el analito determinado se pone en contacto con un enzima adecuado, con un coenzima y, dado el caso, con un mediador, y como resultado de la reacción enzimática el coenzima se modifica fisicoquímicamente, p.ej. se oxida o se reduce.

15 Cuando en la reacción del analito se usa adicionalmente un mediador, éste transfiere los electrones liberados por el coenzima reducido, normalmente a un indicador óptico o a los componentes conductores de un electrodo, de modo que el proceso se puede medir fotométrica o electroquímicamente, por ejemplo. Mediante una calibración se obtiene una relación directa entre el valor medido y la concentración del analito buscado.

20 La esterilización de estos elementos de ensayo es de suma importancia para su uso como medios de diagnóstico. Los elementos diagnósticos conocidos del estado técnico, que por ejemplo se usan en la determinación de glucosa, tienen el inconveniente de ser poco estables a la radiación ionizante o a otros agentes físicos o químicos usados normalmente en la esterilización y tras ella quedan sensiblemente dañados, sobre todo el sistema enzimático. Así, elementos de ensayo asequibles actualmente en el comercio, como por ejemplo Accu-Check Active[®], Accu-Check Aviva[®] o los biosensores descritos en la patente EP 1 430 831 A1, que contienen un enzima dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ) y uno de los mediadores que sirven para la transferencia de electrones, presentan tras la esterilización con radiación ionizante una pérdida notable de actividad enzimática.

30 Una medida conocida para compensar el daño del sistema enzimático de elementos de ensayo bioquímicos debido a la esterilización consiste en sobredosificar el sistema enzimático. La patente EP 1 293 574 B1 revela sensores electroquímicos que contienen una glucosa-deshidrogenasa dependiente de PQQ en combinación con un mediador de fenotiazina, de manera que concentración de uso de la glucosa-deshidrogenasa dependiente de PQQ resulta igual a 20 unidades enzimáticas. Según la formulación del sistema enzimático, tras la esterilización por radiación electrónica (dosis de 25 kGy) pueden obtenerse sensores que gracias a la sobredosificación del sistema enzimático poseen una elevada cantidad absoluta de enzima funcional, a pesar de las mermas causadas por la esterilización.

35 Sin embargo la sobredosificación del sistema enzimático en elementos de ensayo bioquímicos está relacionada con desventajas. Aparte de que una sobredosificación de componentes es antieconómica y en la producción de artículos de consumo a escala industrial aumenta significativamente los costes de fabricación, las concentraciones elevadas de enzima pueden acarrear especialmente problemas de solubilidad y/o viscosidad y dificultar la incorporación del enzima sobre un soporte adecuado.

40 Por tanto el objetivo de la presente invención era preparar un elemento de ensayo bioquímico que sea estable, sobre todo para la determinación de glucosa, superando al menos en parte las desventajas del estado técnico. En concreto el elemento de ensayo debería garantizar un alto contenido de enzima o coenzima activo y un buen rendimiento tras la esterilización, sin necesidad de sobredosificar el sistema enzimático.

50 Este objetivo lo resuelve la presente invención con un elemento diagnóstico que comprende un reactivo químico de detección, el cual lleva como mínimo un componente sensible a la radiación ionizante y cuando dicho elemento diagnóstico se somete a una esterilización, el contenido de componente sensible a la radiación ionizante, en forma funcional, después de la esterilización es $\geq 80\%$ respecto a la cantidad total de dicho componente en el elemento diagnóstico antes de la esterilización.

55 En el marco de la presente invención se comprobó sorprendentemente que los elementos diagnósticos - como por ejemplo cintas o tiras de ensayo - que contienen un reactivo químico de detección con al menos un componente sensible a la radiación ionizante no mostraban ningún daño o solo una ligera degradación de ese componente.

60 El reactivo químico de detección empleado en los elementos diagnósticos de la presente invención puede llevar en principio cualquier componente adecuado para la determinación de un analito con el uso de, por ejemplo, medios ópticos o electroquímicos. Los ejemplos de tales componentes son conocidos del especialista y en concreto incluyen polipéptidos, coenzimas, indicadores ópticos, mediadores, así como sustancias auxiliares y/o aditivos, pero no están limitados a estos. El reactivo químico de detección puede estar constituido como se desee, pero preferiblemente debe formar parte de al menos una capa de reactivos incorporada a un soporte adecuado y, dado el caso, se puede usar al mismo tiempo para determinar un analito.

65 El componente sensible a la radiación ionizante puede ser cualquiera de los contenidos en el reactivo químico de detección necesario para el diagnóstico de un analito investigado, es decir implicado directa o indirectamente en la

reacción fisicoquímica del analito. Tal como se usa aquí, la expresión "sensible a la radiación ionizante" significa que el componente puede ser alterado fisicoquímica y/o funcionalmente por la radiación ionizante en las respectivas condiciones del entorno, es decir a la presión, temperatura y humedad relativa reinantes.

5 En tal sentido es posible, según la presente invención, que el componente sensible a la radiación ionizante quede en forma funcional tras la esterilización del elemento diagnóstico, incluso hasta el 100%, referido a la cantidad total del componente en el elemento diagnóstico, aplicando los criterios de estabilidad precedentes al elemento diagnóstico completo.

10 El componente sensible a la radiación ionizante es preferentemente un polipéptido, un coenzima, un indicador óptico o una combinación de ellos, con especial preferencia polipéptidos. Como polipéptido se puede utilizar cualquiera que satisfaga los requisitos correspondientes y que el especialista considere apropiado. El polipéptido es preferiblemente un enzima, sobre todo un enzima dependiente de coenzima. Como ejemplos de este tipo de enzimas cabe citar, entre otros, deshidrogenasas, oxidasas como p.ej. glucosa-oxidasa (EC 1.1.3.4) o colesterol-oxidasa (EC 1.1.3.6),
15 aminotransferasas como p.ej. aspartato- o alanina-aminotransferasa, 5'-nucleotidasa, creatina-cinasa y diaforasa (EC 1.6.99.2).

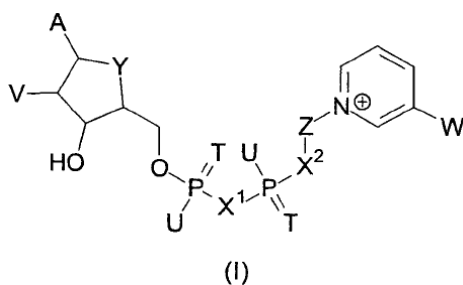
En una forma de ejecución más preferida se usa como enzima una deshidrogenasa dependiente de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP/NADPH), escogiendo el
20 enzima concretamente del grupo constituido por una alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1; EC 1.1.1.2), una L-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.1.5), una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), una glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), una glicerina-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), una 3-hidroxi-butilato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.30), una lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27; 1.1.1.28), una malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) y una sorbitol-deshidrogenasa. Como enzima se prefiere, sobre todo, una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) o una
25 glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49).

El componente sensible a la radiación ionizante también puede ser un coenzima. La presente invención prevé en principio el uso de cualquier coenzima, pero preferiblemente se usa un compuesto de NAD(P)/NAD(P)H. Tal como se emplea en el marco de la presente invención, el término "compuesto de NAD(P)/NAD(P)H" comprende tanto los
30 compuestos de NAD(P)/NAD(P)H de origen natural, por ejemplo nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH)- y nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP/NADPH), como los compuestos de NAD(P)/NAD(P)H sintéticos que pueden obtenerse por modificación química de los compuestos de NAD(P)/NAD(P)H naturales y, entre otros, 3-acetilpiridina-adenina-dinucleótido (3-acetil-NAD) y 3-acetilpiridina-adenina-dinucleótido-fosfato (3-acetil-NADP).

35 En una forma de ejecución se trata de un coenzima estabilizado. Según de la presente invención, un coenzima estabilizado es un coenzima modificado químicamente respecto al coenzima natural, que en comparación con éste tiene mayor estabilidad a presión atmosférica frente a la humedad, a temperaturas comprendidas especialmente en el intervalo de 0°C hasta 50°C, a ácidos y bases, sobre todo en el intervalo de pH 4 hasta pH 10, y/o a nucleófilos como, por ejemplo, alcoholes y aminas, y por tanto en idénticas condiciones ambientales puede desplegar su acción
40 durante un periodo superior al del coenzima natural.

El coenzima estabilizado tiene preferiblemente mayor estabilidad hidrolítica que el coenzima natural, y se prefiere especialmente que su estabilidad a la hidrólisis sea total en las condiciones de ensayo. En comparación con el coenzima natural, el coenzima estabilizado puede presentar una constante de enlace menor o mayor, por ejemplo
45 reducida o aumentada por un factor de 2.

Si se usa como coenzima un compuesto de NAD(P)/NAD(P)H, éste se escoge preferiblemente entre los compuestos de la fórmula general (I):



50 en el cual

- A = adenina o un análogo de ella,
- 55 T = O, S respectivamente independientes,
- U = OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻ respectivamente independientes,

V = OH respectivamente independiente o un grupo fosfato, o dos grupos fosfato que formen un grupo fosfato cíclico;
 W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ donde R = H o alquilo C₁-C₂ respectivamente independientes,
 X¹, X² = O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃ respectivamente independientes,
 5 Y = NH, S, O, CH₂,
 Z = un radical orgánico lineal o cíclico,
 o una sal o una forma reducida del mismo.

10 En una forma de ejecución preferida los compuestos de la fórmula general (I) contienen adenina o análogos de adenina, como p.ej. adenina sustituida en C₈ y N₆, variantes deaza como 7-deaza, azavariantes como 8-aza o bien combinaciones como 7-deaza u 8-aza o análogos carbocíclicos como formicina, donde las variantes 7-deaza pueden estar sustituidas en la posición 7 con halógeno o con alquino-, alqueno- o alquilo-C₁₋₆.

15 En otra forma de ejecución preferida los compuestos de la fórmula general (I) contienen análogos de adenosina que en lugar de ribosa llevan p.ej. 2-metoxidesoxirribosa, 2'-fluorodesoxirribosa, hexitol, alritol o análogos policíclicos como azúcares bicíclicos, azúcares de LNA y azúcares tricíclicos. En particular, en los compuestos de la fórmula general (I) los oxígenos de los (di)fosfatos también pueden estar sustituidos isotrópicamente, p.ej. O⁻ por S⁻ o BH₃⁻, O por NH, NCH₃ o CH₂ y =O por =S. En los compuestos de fórmula general (I) W es preferiblemente CONH₂ o COCH₃.

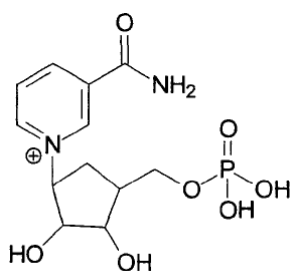
20 En los compuestos de la fórmula general (I) Z es preferiblemente un radical lineal de 4-6 átomos de C, sobre todo de 4 átomos de C, en el cual 1 o 2 átomos de C pueden estar sustituidos por uno más heteroátomos escogidos entre O, S y N, o un radical que comprende un grupo cíclico de 5 o 6 átomos de C, el cual a su vez puede contener un heteroátomo escogido entre O, S y N, así como uno o más sustituyentes, y un radical CR⁴₂, de modo que CR⁴₂ va unido al grupo cíclico y a X², siendo R⁴ = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes.

25 Z es preferiblemente un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, saturado o insaturado, sobre todo un grupo de la fórmula general (II), en el cual puede haber un enlace simple o doble entre R⁵ y R^{5'}, y donde

30 R⁴ = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes,
 R⁵ = O o CR⁴₂,
 R^{5'} = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR⁴₂, CHOH, CHOCH₃, y R^{5''} = CR⁴₂, CHOH, CHOCH₃, cuando hay un enlace simple entre R⁵ y R^{5'},
 R⁵ = R^{5'} = CR⁴, cuando hay un enlace doble entre R⁵ y R^{5'}, y
 35 R⁶, R^{6'} = CH o CCH₃ respectivamente independientes.

En los grupos de la fórmula general (II) R⁵ es preferiblemente O o CH₂. Asimismo es preferible escoger R^{5'} entre CH₂, CHOH y NH. En una forma de ejecución preferida R⁵ y R^{5'} son respectivamente CHOH. En otra forma de ejecución preferida R⁵ = NH y R^{5'} = CH₂. Sobre todo se prefieren los grupos de la fórmula (II) en los cuales R⁴ = H, R⁵ = O o CH₂, R⁵ = R^{5'} = CHOH y R⁶ = R^{6'} = CH.

40 En una forma de ejecución especialmente preferida de la presente invención el coenzima es NAD, NADP, 3-acetil-NAD o 3-acetil-NADP. En otra variante especialmente preferida se usa como coenzima un compuesto estabilizado de NAD(P)/NAD(P)H o el compuesto de la fórmula (III)



(III)

45 El compuesto de NAD(P)/NAD(P)H estabilizado comprende preferiblemente un radical 3-piridincarbonilo o un radical 3-piridintiocarbonilo que va unido, sin enlace glicosídico, mediante un radical orgánico lineal o cíclico, sobre todo mediante un radical orgánico cíclico, a un radical que contiene fósforo, como por ejemplo un fosfato.

50 En una variante preferida el compuesto de NAD(P)/NAD(P)H estabilizado se escoge entre los compuestos de la fórmula general (I) anteriormente descritos, en que el grupo Z y el radical de piridina no van unidos entre sí mediante un enlace glicosídico. En este caso el grupo Z es un grupo de la fórmula general (II), en el cual R⁵ = CR⁴₂ y los radicales R⁴, R⁵, R^{5'}, R⁶ y R^{6'} están definidos como arriba. Con especial preferencia es un grupo de la fórmula (II), en el cual R⁴ = H, R⁵ = CH₂, R⁵ = R^{5'} = CHOH y R⁶ = R^{6'} = CH.

55

En la forma de ejecución más preferida el compuesto de NAD(P)/NAD(P)H estabilizado es carba-NAD (J.T. Slama, Biochemistry (1988), 27, 183 y Biochemistry (1989), 28, 7688) o carba-NADP. Otros coenzimas estables que pueden usarse según la presente invención están descritos en las patentes WO 98/33936, WO 01/49247, WO 2007/012494, US 5,801,006, US 11/460,366 y en la publicación de Blackburn y otros (Chem. Comm. (1996), 2765), a cuya revelación se hace aquí referencia expresa.

Como alternativa, el componente sensible a la radiación ionizante también puede ser un indicador óptico. Como indicador óptico se puede emplear cualquier sustancia reducible que durante la reducción experimente una variación detectable de sus propiedades ópticas, como por ejemplo color, fluorescencia, remisión, transmisión, polarización y/o índice de refracción. La presencia y/o la cantidad del analito en la muestra se pueden determinar a simple vista y/o mediante un aparato, utilizando un método óptico adecuado para el especialista, sobre todo de tipo fotométrico o fluorimétrico, o electroquímico.

Como indicadores ópticos se usan preferentemente poliheteroácidos, como por ejemplo ácido 2,18-fosfomolibdico, que se reduce al correspondiente heteropoliazul. También se pueden usar quinonas como por ejemplo resazurina, diclorofenol-indofenol y/o sales de tetrazolio, que para el fin de la presente invención son especialmente idóneas, incluyendo por ejemplo los productos comerciales WST-3, WST-4 y WST-5 (todos de la firma Dojindo), aunque sin limitarse a ellos.

El elemento diagnóstico puede ser cualquiera susceptible de ser humectado por la muestra que contiene el analito. Así, por ejemplo, el elemento diagnóstico puede contener el o los componentes sensibles a la radiación ionizante - como por ejemplo un polipéptido o un coenzima - en una o varias capas de reactivo que a su vez pueden contener otros reactivos útiles para la determinación cualitativa y/o cuantitativa del analito. Como ejemplos de tales reactivos cabe mencionar, entre otros, mediadores y sustancias auxiliares y/o aditivos adecuados.

Tal como se usa en el marco de la presente invención, el término "mediador" designa un compuesto químico que reacciona con el coenzima reducido resultante de la reacción con el analito y permite la transferencia de electrones a un indicador o sistema indicador óptico adecuado o a electrodos electroquímicos. Según la presente invención, como mediadores se pueden usar, entre otros, nitrosoanilinas, como por ejemplo [(4-nitrosifenil)imino]dimetanolhidrocloruro, quinonas, como por ejemplo fenantrenquinona, fenantrolinquinona o benzo[h]-quinolinquinona, fenazinas, como por ejemplo 1-(3-carboxipropoxi)-5-etilfenazinio-trifluorometansulfonato, y/o diaforasa (EC 1.6.99.2). No obstante los elementos diagnósticos de la presente invención no contienen preferentemente ningún mediador, lo cual tiene la ventaja de que se evitan reacciones secundarias del mismo y por tanto no se perjudica la estabilidad del elemento diagnóstico con el tiempo.

Dependiendo del método de esterilización empleado, el contenido del componente sensible a la radiación ionizante en los elementos diagnósticos de la presente invención después de esterilizarlos es $\geq 80\%$, preferiblemente $\geq 90\%$, en forma funcional, respecto a la cantidad total del componente en el elemento diagnóstico antes de la esterilización, incluyendo también por definición el 100% de contenido, tal como se ha descrito anteriormente.

Tal como se usa en el marco de la presente invención, el término "en forma funcional" significa que el componente está en forma químicamente activa y puede realizar su función asignada en el elemento diagnóstico. El término "en forma no funcional" significa en cambio que el componente está en forma químicamente inactiva o que no cumple su función prevista por hallarse en una forma químicamente activa diferente de la requerida para realizar la función deseada.

Por consiguiente, según la presente invención, al menos un 80% de las moléculas de un componente sensible a la radiación ionizante existentes en el elemento diagnóstico antes de la esterilización, es decir moléculas funcionales y no funcionales, están en forma activa tras la esterilización y por ello pueden efectuar la reacción deseada del analito investigado, eventualmente junto con otros componentes del reactivo químico de detección. La estabilidad de los elementos diagnósticos de la presente invención frente a la radiación ionizante tiene pues la ventaja de que puede omitirse una sobredosificación de algunos componentes del reactivo químico de detección (p.ej. de un enzima) respecto a otros, como compensación de la pérdida de moléculas funcionales del respectivo componente causada por la esterilización.

En una forma de ejecución preferida los elementos diagnósticos de la presente invención - además de al menos un componente sensible a la radiación ionizante - comprenden un elemento de absorción de muestra que puede estar integrado o separado. En el sentido de la presente invención, por elemento de absorción de muestra integrado se entiende un dispositivo que va unido físicamente al elemento diagnóstico y es capaz de transferirle directamente la muestra absorbida, a través de un medio adecuado, como por ejemplo un canal capilar.

En cambio un elemento de absorción de muestra separado es un dispositivo que no tiene ninguna unión física con el elemento diagnóstico. En este caso la muestra se puede transferir al elemento diagnóstico de la presente invención, por ejemplo, tras una recarga del dispositivo de absorción de muestra hallándose el elemento diagnóstico situado en el cargador.

5 Como dispositivo de absorción de muestra se puede usar cualquier elemento capaz de incorporar una muestra del analito y transferirla seguidamente al elemento diagnóstico, aprovechando, por ejemplo, efectos capilares. En este sentido ha dado buen resultado el uso de un elemento acicular que comprenda preferiblemente un canal capilar para absorber la muestra y que esté constituido por un material cualquiera, pero preferentemente esterilizable, como por ejemplo metal o plástico.

10 Según la presente invención es preferible que el elemento diagnóstico con el elemento de absorción de muestra esté alojado, especialmente junto con un elemento acicular, en un envase almacenable que en principio puede ser de cualquier material que el especialista considere apropiado para conservar elementos diagnósticos. En este sentido se prefieren los envases que constan total o parcialmente de plástico. En particular se utilizan plásticos a base de poliamida, policarbonato, poliéster, polietileno y polipropileno.

15 El envase almacenable es con especial preferencia un cargador que contiene varios elementos diagnósticos de la presente invención. Tal como se emplea aquí, el término "varios" significa cualquier número ≥ 1 y en el cargador se pueden alojar, preferiblemente, al menos 10 y sobre todo al menos 25 elementos diagnósticos. El cargador puede tener cualquier tipo de configuración, pero en particular es de tipo blíster, de disco o de tambor, como los que están descritos en las patentes EP 0 951 939 A2 y WO 2005/104948 A1, por ejemplo, y cuya revelación se incorpora aquí expresamente como referencia.

20 La elaboración de elementos diagnósticos aquí descritos comprende una esterilización y consiste en preparar un elemento diagnóstico que contiene un reactivo químico de detección, con al menos un componente sensible a la radiación ionizante y, dado el caso, un elemento de absorción de muestra integrado o separado, y a continuación esterilizarlo. Según la presente invención el elemento diagnóstico se puede introducir en un envase almacenable adecuado, por ejemplo en un cargador, antes o después de esterilizarlo. Se considera preferible introducirlo antes de proceder a la esterilización.

30 Siempre que el elemento diagnóstico se introduzca en un envase almacenable antes de la esterilización, cabe en principio la posibilidad de precintar el envase antes o después de esterilizar el elemento diagnóstico, aunque por motivos de higiene es preferible precintarlo antes de llevar a cabo la esterilización. En este sentido, según una forma de ejecución especialmente preferida de la presente invención, se prevé que la elaboración del elemento diagnóstico comprenda su introducción en un cargador, el precinto del cargador y la subsiguiente esterilización del elemento diagnóstico en el cargador precintado y que el elemento diagnóstico incluya un elemento acicular preferiblemente separado.

35 La esterilización en sí se puede efectuar de cualquier manera, incluyendo por ejemplo la esterilización química, la esterilización por calor y la esterilización mediante radiación ionizante. Según la presente invención ha resultado ventajosa la esterilización mediante radiación ionizante, incluyendo la radiación electrónica y/o la radiación gamma, con especial preferencia la radiación electrónica.

40 El especialista puede elegir la dosis de radiación ionizante necesaria para la esterilización según las respectivas exigencias. Según una forma de ejecución preferida, la dosis de radiación electrónica necesaria para esterilizar el elemento diagnóstico está comprendida en el intervalo de 15-35 kGy, sobre todo de 20-30 kGy, y cuando se utiliza radiación gamma la dosis aplicada está comprendida en el intervalo de 15-35 kGy, sobre todo de 20-30 kGy.

45 El elemento diagnóstico esterilizado mediante el procedimiento anterior se envasa preferentemente en condiciones estériles inmediatamente después de la esterilización, si es preciso junto con el elemento de absorción de muestra integrado o separado. El envasado en condiciones estériles permite mantener esterilizado el elemento diagnóstico de la presente invención hasta su uso posterior, sin necesidad de esterilizarlo de nuevo. El elemento diagnóstico de la presente invención es por tanto, con especial preferencia, un artículo de un solo uso que luego no se reutiliza debido a la pérdida de la esterilidad.

50 Los elementos diagnósticos aquí revelados pueden tener cualquier forma física conocida del especialista, que sirva para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra. Los elementos diagnósticos comprenden respectivamente, al menos, un área de ensayo que puede ponerse en contacto con una muestra que contenga el analito y que permita su determinación cualitativa y/o cuantitativa con el uso de medios adecuados.

55 En una forma de ejecución preferida de la presente invención el elemento diagnóstico está configurado de manera que en presencia del analito investigado genere una señal óptica o electroquímicamente detectable y con el uso de métodos ópticos, como p.ej. fotometría o fluorimetría, o técnicas electroquímicas permita efectuar una determinación cualitativa y/o cuantitativa del analito. Como ejemplos de elementos diagnósticos según la presente invención cabe citar especialmente los elementos de ensayo con pieza acicular integrada, las cintas de ensayo, las tiras de ensayo y los elementos diagnósticos descritos en la patente WO 2005/084530 A2, sobre los cuales el analito se puede depositar, por ejemplo, en forma de una solución acuosa o no acuosa. La revelación de dicha patente internacional se incorpora expresamente aquí como referencia.

Los elementos diagnósticos de la presente invención se pueden usar para determinar cualquier sustancia biológica o química fotométrica o electroquímicamente detectable. El analito se elige preferiblemente del grupo formado por ácido málico, alcohol, amonio, ácido ascórbico, colesterol, cisteína, glucosa, glutatión, glicerina, urea, 3-hidroxi-butirato, ácido láctico, 5'-nucleotidasa, péptidos, piruvato, salicilato y triglicéridos, con especial preferencia glucosa. En este caso el analito puede proceder de cualquier fuente, pero preferentemente de un líquido corporal, incluyendo, sin limitarse a ellos, sangre entera, plasma, suero, líquido linfático, líquido biliar, líquido cerebroespinal, líquido tisular extracelular, orina, así como secreciones glandulares, por ejemplo saliva o sudor. Con el elemento diagnóstico aquí descrito se determina preferentemente la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra de sangre entera, plasma, suero o líquido tisular extracelular.

La determinación cualitativa y/o cuantitativa del analito puede realizarse de cualquier modo. En este caso se pueden emplear en principio todos los métodos conocidos del estado técnico para determinar reacciones enzimáticas que generan una señal medible y valorable o legible manualmente o por medios adecuados. En el marco de la presente invención se usan preferentemente métodos de detección óptica, incluyendo por ejemplo la medición de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular (CD), dispersión óptica rotatoria (ORD) y/o refractometría, y el analito se detecta con especial preferencia mediante fotometría o fluorimetría, por ejemplo indirectamente mediante una variación del coenzima detectable fluorimétricamente. Como alternativa el analito también se puede detectar electroquímicamente a través de una señal eléctrica como, por ejemplo, intensidad, tensión y/o resistencia.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un proceso para elaborar un elemento diagnóstico, que consta de los siguientes pasos:

- (a) preparación de un elemento diagnóstico que comprende un reactivo químico de detección con al menos un componente sensible a la radiación ionizante que es una deshidrogenasa dependiente de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP/NADPH), y
- (b) esterilización del elemento diagnóstico con radiación ionizante.

La presente invención se explica más detalladamente con las figuras y ejemplos siguientes:

Descripción de las figuras

Figura 1: actividad de glucosa-deshidrogenasa (GlucDH) en un elemento diagnóstico que comprende glucosa-deshidrogenasa y nicotinamida-adenina-dinucleótido, antes y después de la esterilización con radiación electrónica (haz de electrones; dosis 25 kGy). La determinación se realizó inmediatamente después de la preparación (0 días) y tras 2 y 4 días de almacenamiento del elemento diagnóstico a 5°C (frigorífico, KS), a temperatura ambiente (RT) y a 50°C.

Figura 2: contenido de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) en un elemento diagnóstico que comprende glucosa-deshidrogenasa y nicotinamida-adenina-dinucleótido, antes y después de la esterilización con radiación electrónica (haz de electrones; dosis 25 kGy). La determinación se realizó inmediatamente después de la preparación (0 días) y tras 2 y 4 semanas de almacenamiento del elemento diagnóstico a 5°C (frigorífico, KS), a temperatura ambiente (RT) y a 50°C.

Figura 3: actividad de glucosa-deshidrogenasa (GlucDH) en un elemento diagnóstico que comprende glucosa-deshidrogenasa y nicotinamida-adenina-dinucleótido, antes y después de la esterilización con radiación gamma (Gamma; dosis 25 kGy) y radiación gamma en presencia de dióxido de carbono (Gamma/CO₂; dosis 25 kGy). La determinación se realizó inmediatamente después de la preparación (0 días) y tras 2 y 4 semanas de almacenamiento del elemento diagnóstico a 5°C (KS), a temperatura ambiente (RT) y a 50°C.

Figura 4: contenido de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) en un elemento diagnóstico que comprende glucosa-deshidrogenasa y nicotinamida-adenina-dinucleótido, antes y después de la esterilización con radiación gamma (Gamma; dosis 25 kGy) y radiación gamma en presencia de dióxido de carbono (Gamma/CO₂; dosis 25 kGy). La determinación se realizó inmediatamente después de la preparación (0 días) y tras 2 y 4 semanas de almacenamiento del elemento diagnóstico a 5°C (KS), a temperatura ambiente (RT) y a 50°C.

Ejemplo

Para evaluar la estabilidad a la radiación ionizante del sistema químico de un elemento diagnóstico de determinación de glucosa que comprende glucosa-deshidrogenasa y nicotinamida-adenina-dinucleótido se determinó la actividad de glucosa-deshidrogenasa y el contenido de nicotinamida-adenina-dinucleótido en el elemento diagnóstico antes y después de la esterilización con radiación electrónica y con radiación gamma, variando los parámetros de duración y temperatura de almacenamiento.

Las figuras 1 y 2 muestran una comparación de la actividad de glucosa-deshidrogenasa (GlucDH) y del contenido de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) en el elemento diagnóstico arriba descrito, antes y después de esterilizarlo con radiación electrónica. Como se desprende de las figuras, la irradiación electrónica del elemento diagnóstico no afecta a la actividad de GlucDH ni al contenido de NAD.

5 Sorprendentemente, en una comparación realizada entre el elemento diagnóstico irradiado y el elemento diagnóstico no irradiado inmediatamente después de su preparación (0 semanas) la actividad enzimática y el contenido de NAD son respectivamente del 100%. Al aumentar la duración del almacenamiento (0 hasta 4 semanas) y la temperatura de almacenamiento (5°C hasta 50°C) disminuye tanto la actividad enzimática como el contenido de NAD en el elemento diagnóstico, independientemente de un posible efecto de la radiación esterilizante. La irradiación previa de los elementos diagnósticos así almacenados produce un ligero descenso de la actividad de GlucDH y del contenido de NAD, que de todos modos se mantiene dentro de los límites de error analíticos.

10 Las figuras 3 y 4 muestran una comparación de la actividad de glucosa-deshidrogenasa (GlucDH) y del contenido de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) en el elemento diagnóstico arriba descrito, antes y después de esterilizarlo con radiación gamma. Aquí se ve claramente que tanto el enzima como el coenzima toleran incluso la radiación gamma de gran energía, aunque en menor medida que en el caso de la esterilización con radiación electrónica.

15 En realidad la actividad enzimática de un sistema esterilizado inmediatamente después de prepararlo (0 semanas) disminuye aproximadamente hasta el 55% de su valor inicial, mientras que utilizando una combinación de radiación gamma y dióxido de carbono el daño es menor, con 80% de actividad enzimática restante. En el caso del coenzima, tras la esterilización con radiación electrónica se detecta un contenido restante de NAD del 90% aproximadamente; al usar una combinación de radiación gamma y dióxido de carbono no se observa ninguna diferencia de contenido de NAD respecto a un elemento diagnóstico no tratado.

20 Análogamente a los ensayos realizados con radiación electrónica la actividad enzimática y el contenido de coenzima disminuyen al aumentar la duración del almacenamiento (0 hasta 4 semanas) y la temperatura de almacenamiento (5°C hasta 50°C), tanto en un elemento diagnóstico no tratado, como en uno tratado con radiación gamma y con radiación gamma en combinación con dióxido de carbono, aunque la actividad enzimática y el contenido de NAD restantes son ligeramente inferiores a los valores de los respectivos elementos diagnósticos no tratados, sobre todo en el caso de los elementos diagnósticos tratados con radiación gamma y dióxido de carbono.

REIVINDICACIONES

1. Elemento diagnóstico esterilizado que contiene un reactivo químico de detección con componentes sensibles a la radiación ionizante, caracterizado porque el elemento diagnóstico esterilizado no lleva ningún mediador y los componentes sensibles a la radiación ionizante están respectivamente en forma funcional hasta un contenido $\geq 80\%$, sobre todo hasta un contenido $\geq 90\%$, respecto a la cantidad total del respectivo componente en el elemento diagnóstico antes de la esterilización, y porque los componentes sensibles a la radiación ionizante son un enzima y un coenzima.
2. Elemento diagnóstico esterilizado, según la reivindicación 1, caracterizado porque el enzima es una deshidrogenasa dependiente de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP/NADPH), con mayor preferencia una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) o una glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49).
3. Elemento diagnóstico esterilizado, según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el coenzima es un compuesto de NAD(P)/NAD(P)H, preferiblemente un compuesto de NAD(P)/NAD(P)H estabilizado, con mayor preferencia carba-NAD o carba-NADP.
4. Elemento diagnóstico esterilizado, según una de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque comprende un elemento de absorción de muestra, en concreto un elemento acicular, integrado o separado.
5. Elemento diagnóstico esterilizado, según la reivindicación 4, caracterizado porque está alojado junto con el elemento de absorción de muestra en un envase almacenable, sobre todo en un cargador.
6. Elemento diagnóstico esterilizado, según una de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque está envasado en condiciones de esterilidad.
7. Elemento diagnóstico esterilizado, según una de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque está diseñado para producir una señal óptica o electroquímicamente detectable.
8. Elemento diagnóstico esterilizado, según una de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque está diseñado como elemento de ensayo con elemento acicular integrado, como cinta de ensayo o como tira de ensayo.
9. Proceso para elaborar un elemento diagnóstico esterilizado, que consta de los siguientes pasos:
(a) preparación de un elemento diagnóstico exento de mediadores, que comprende un reactivo químico de detección con componentes sensibles a la radiación ionizante que son un enzima y un coenzima, y
(b) esterilización del elemento diagnóstico exento de mediadores con radiación ionizante, sobre todo con radiación electrónica y/o radiación gamma.
10. Proceso según la reivindicación 9, caracterizado porque el elemento diagnóstico comprende además un elemento de absorción de muestra, en concreto un elemento acicular integrado o separado.
11. Proceso según la reivindicación 9 o 10, caracterizado porque comprende la introducción del elemento diagnóstico en un envase almacenable, sobre todo en un cargador, antes de la esterilización.
12. Proceso según la reivindicación 11, caracterizado porque también comprende el precintado del envase almacenable antes de la esterilización.
13. Proceso según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque la radiación electrónica se lleva a cabo con una dosis comprendida en el intervalo de 15-35 kGy, preferiblemente en el intervalo de 20-30 kGy, o la radiación gamma se lleva a cabo con una dosis comprendida en el intervalo de 15-35 kGy, preferiblemente en el intervalo de 20-30 kGy.

Fig. 1

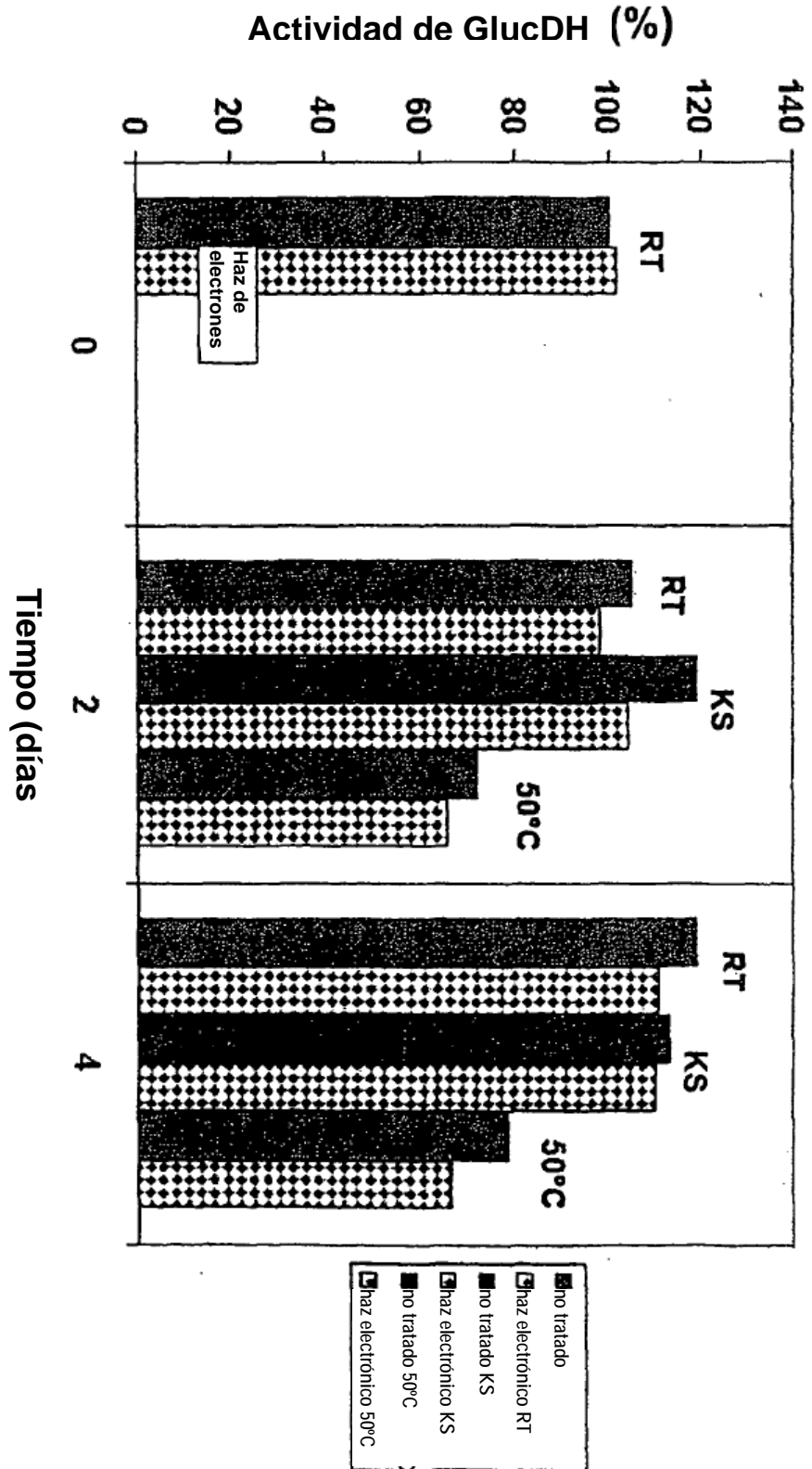


Fig. 2

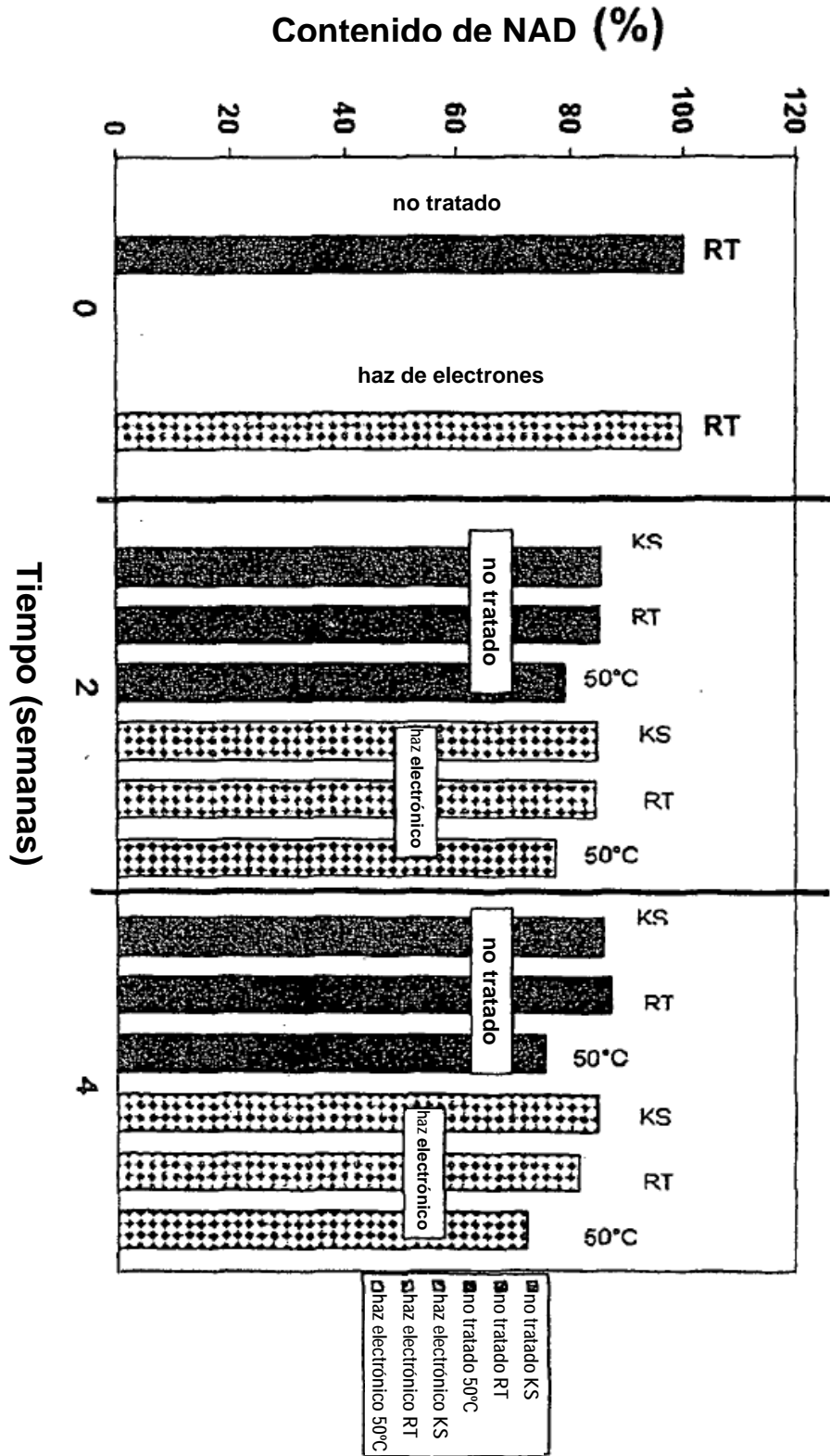


Fig. 3

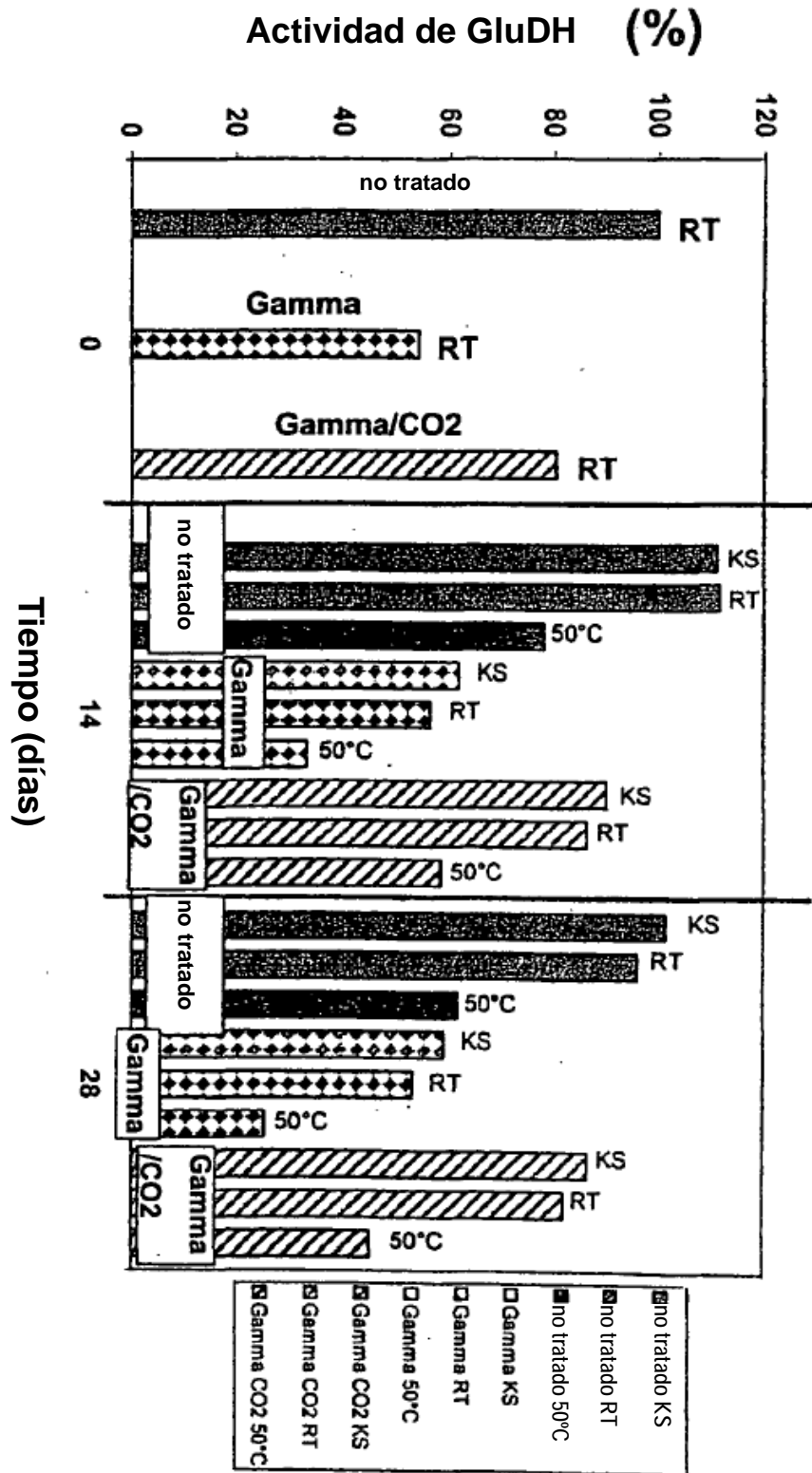


Fig. 4

