

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 286**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/54 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2002 E 07018162 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 1867732**

54 Título: **Reactivos, procedimientos y dispositivos para detectar analitos**

30 Prioridad:

14.09.2001 US 318716 P

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

08.05.2015

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard
Whippany, NJ 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**VREEKE, MARK S.;
WARCHAL-WINDHAM, MARY ELLEN;
BLASCHKE, CHRISTINA;
MIKEL, BARBARA J. y
COOPER, HOWARD A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 535 286 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

Reactivos, procedimientos y dispositivos para detectar analitos

Antecedentes

5 La presente invención se refiere a sensores electroquímicos para la medición de analitos y, más particularmente, a sensores electroquímicos para la medición de glucosa en la sangre.

10 La vigilancia de las concentraciones de determinados analitos en el cuerpo permite la detección temprana de riesgos para la salud e identifica la necesidad de la introducción de medidas terapéuticas. Uno de los analitos más comúnmente vigilados es la glucosa, cuya concentración en sangre es importante para determinar las dosis apropiadas de insulina para diabéticos. Se han desarrollado diversos procedimientos para vigilar los niveles de glucosa en sangre, que incluyen el uso de biosensores electroquímicos. Los biosensores electroquímicos se basan en reacciones químicas catalizadas por enzimas que implican al analito de interés. En el caso de la vigilancia de glucosa, la reacción química relevante es la oxidación de glucosa a glucolactona. Esta oxidación está catalizada por una diversidad de enzimas, algunas de las cuales pueden contener una coenzima unida, tal como nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (NAD(P)), mientras que otras pueden contener un cofactor unido, tal como flavina adenina dinucleótido (FAD) o pirroloquinolina-quinona (PQQ).

15 En aplicaciones de biosensores, los equivalentes rédox generados en el transcurso de la oxidación de la glucosa se transportan a la superficie de un electrodo, con lo que se genera una señal eléctrica. La magnitud de la señal eléctrica se correlaciona después con la concentración de glucosa. La transferencia de equivalentes rédox desde el sitio de reacción química de la enzima a la superficie del electrodo se realiza usando mediadores de transferencia de electrones.

20 Un problema significativo con el uso de mediadores de transferencia de electrones en biosensores es la inestabilidad de estos compuestos después de la exposición a condiciones ambientales comunes tales como temperatura y humedad. Como consecuencia, el número de mediadores adecuados para su uso en biosensores de glucosa está bastante limitado.

25 La patente de Estados Unidos N° 5.520.786 ('786) de Bloczynski y col. describe familias de compuestos de fenotiazina y fenoxazina adecuados para su uso como mediadores de transferencia de electrones con las enzimas dihidronicotinamida adenina dinucleótido (NADH), NADPH y análogos de las mismas. Las enzimas basadas en cofactor tales como FAD-glucosa oxidasa y PQQ-glucosa deshidrogenasa tienen varias ventajas sobre las enzimas basadas en NAD, que incluyen un coste inferior, una actividad enzimática más elevada, unas mayores estabilidad y capacidad de unión, a diferencia de cofactores fácilmente disociables.

30 Los mediadores de transferencia de electrones usados previamente con FAD-glucosa oxidasa y PQQ-glucosa deshidrogenasa incluyen quinonas, fenozina metosulfato, diclorofenolindofenol y ferricianuro. Desafortunadamente, se ha demostrado que estos compuestos son muy susceptibles a los agentes medioambientales descritos anteriormente y dan como resultado reactivos biosensores de baja estabilidad. Por lo tanto, se necesitan mediadores que muestren una buena estabilidad después de la exposición a agentes medioambientales que se encuentran comúnmente y que puedan usarse en sistemas basados en flavoproteína y quinoproteína.

35 Además de la necesidad de reactivos biosensores que sean estables a los agentes medioambientales descritos anteriormente, sería deseable proporcionar reactivos biosensores que fueran estables a las condiciones de radiación usadas comúnmente en esterilización de lancetas. Los reactivos estables a dicha esterilización por radiación podrían incorporarse a unidades muy prácticas para el usuario en las que se combinan lanceta y biosensor.

40 La presente invención está dirigida a mediadores de transferencia de electrones para su uso en reactivos biosensores basados en flavoproteína y quinoproteína que muestran una estabilidad mejorada tanto a interferentes medioambientales como a esterilización por radiación.

Sumario

45 El alcance de la presente invención viene definido únicamente por las reivindicaciones adjuntas y no se ve afectado en ningún grado por las declaraciones presentes en este sumario. A modo de introducción, las realizaciones actualmente preferentes descritas en el presente documento están dirigidas a remediar los problemas de estabilidad mencionados anteriormente de mediadores de transferencia de electrones y biosensores enzimáticos.

50 Mencionado brevemente, un aspecto de composición de la presente invención se refiere a un reactivo para detectar un analito, que comprende (a) una enzima seleccionada del grupo que consiste en una flavoproteína, una quinoproteína y una combinación de las mismas y (b) un mediador seleccionado del grupo que consiste en 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina y ácido 3-(3',5'-fenilimino)-3H-fenotiazinadisulfónico y una combinación de los mismos.

Un primer aspecto de aparato de la presente invención se refiere a un sensor electroquímico que comprende: (a) un

electrodo de trabajo que tiene una superficie y (b) un segundo electrodo acoplado al electrodo de trabajo. La superficie del electrodo de trabajo está recubierta con una solución o mezcla de un reactivo que comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en una flavoproteína, una quinoproteína y una combinación de las mismas y un mediador seleccionado del grupo que consiste en 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina y ácido 3-(3',5'-fenilimino)-3H-fenotiazinadisulfónico y una combinación de los mismos.

Un segundo aspecto de aparato de la presente invención se refiere a un dispositivo para medir un analito que comprende (a) una lanceta y (b) una cámara de muestreo conectada a la lanceta. La cámara de muestreo comprende un reactivo que comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en PQQ-glucosa deshidrogenasa, FAD-glucosa oxidasa y una combinación de las mismas y (B) un mediador seleccionado del grupo que consiste en 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina y ácido 3-(3',5'-fenilimino)-3H-fenotiazinadisulfónico y una combinación de los mismos.

En el presente documento se divulga un primer procedimiento de producción de un dispositivo esterilizado para medir un analito que comprende (a) proporcionar un dispositivo según la presente invención y (b) irradiar el dispositivo con un haz electrónico o radiación de rayos gamma.

También se divulga en el presente documento un segundo aspecto de procedimiento de la presente invención que se refiere a un procedimiento para detectar un analito que experimenta una reacción química, comprendiendo el procedimiento (a) proporcionar una superficie de electrodo; (b) catalizar la reacción química con una enzima seleccionada del grupo que consiste en una flavoproteína, una quinoproteína y una combinación de las mismas; (c) generar un equivalente rédox mediante la reacción química y (d) transferir el equivalente rédox a la superficie del electrodo usando un mediador seleccionado del grupo que consiste en 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina, ácido 3-(3',5'-fenilimino)-3H-fenotiazinadisulfónico y una combinación de los mismos.

Las realizaciones actualmente preferentes discutidas en el presente documento pueden poseer una o más ventajas con respecto a otros reactivos basados en flavoproteína y quinoproteína, que pueden incluir, pero no están limitadas a: estabilidad de reactivo biosensor mejorada; capacidad de transferencia de electrones de mediadores potenciada; capacidad para ajustar los mediadores para una operación de electrodo óptima; susceptibilidad por el oxígeno de mediadores reducida; estabilidad térmica de mediadores aumentada; estabilidad aumentada de mediadores a la humedad ambiental; menor potencial rédox de mediadores; susceptibilidad reducida a interferentes en sangre y estabilidad de reactivos biosensores a condiciones de esterilización por radiación.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra una ilustración esquemática de un dispositivo para medir un analito que presenta características de la presente invención. La FIG. 2 muestra una vista en perspectiva de un dispositivo integrado de lanceta/biosensor para su uso según la presente invención. La FIG. 3 muestra un gráfico de corrientes de fondo para 3 formulaciones de reactivos biosensores expuestos a niveles crecientes de radiación. La FIG. 4 muestra un gráfico de la respuesta a corrientes de reactivos biosensores esterilizados por radiación después de la exposición a glucosa. La FIG 5 muestra un gráfico de corriente frente a concentración de glucosa a intervalos de tiempo crecientes para un biosensor de PQQ-glucosa deshidrogenasa/fenotiazina. La FIG. 6 muestra un gráfico de corriente frente a concentración de glucosa para un biosensor de [FAD]-glucosa oxidasa/fenotiazina. La FIG. 7 muestra un gráfico de corriente frente a concentración de glucosa para un reactivo biosensor de PQQ-glucosa deshidrogenasa/fenotiazina sometido a tensión por calor y tensión por humedad. Las FIGS. 8-12 muestran gráficos de corriente frente a concentración de glucosa para 5 formulaciones de biosensores de PQQ-glucosa deshidrogenasa/fenotiazina expuestos a diferentes niveles de radiación.

Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferentes

A lo largo de la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, se entiende que para las definiciones siguientes: El término "analito" se refiere a una o a una pluralidad de especies que tienen una concentración de interés. El término "flavoproteína" se refiere a enzimas que contienen cofactores de flavina. El término "quinoproteína" se refiere a enzimas que contienen PQQ o cofactores similares. La expresión "equivalente rédox" se refiere a una o a una pluralidad de especies (por ejemplo, electrones) producidas en reacciones electroquímicas que implican al analito. La expresión "irradiación con haz electrónico" o "irradiación con haz de electrones" se refiere a la exposición a una corriente de electrones a alta corriente concentrada. Los términos "alquilo", "alquenilo", "alquinilo", "arilo", "heteroarilo", "cíclico", "heterocíclico", "halo", "haloalquilo", "carboxi", "carboxialquilo", "alcoxicarbonilo", "arilooxicarbonilo", "ceto aromático", "ceto alifático", "alcoxi", "arilooxi", "nitro", "dialquilamino", "aminoalquilo", "sulfo", "dihidroxiboro" y similares se refieren a sustituyentes bien conocidos en la técnica, que pueden estar ramificados o sin ramificar y pueden estar a su vez sustituidos con uno o más sustituyentes. La expresión "reactivo biosensor" se refiere a la combinación de una enzima que cataliza una reacción de un analito y un mediador de fenotiazina y/o fenoxazina. El término "biocarga" se refiera a la población de microorganismos viables en un producto determinados inmediatamente antes de la irradiación.

Un reactivo biosensor para detectar un analito según la presente invención incluye (1) una enzima seleccionada del grupo que consiste en una flavoproteína, una quinoproteína y una combinación de las mismas y (2) un mediador

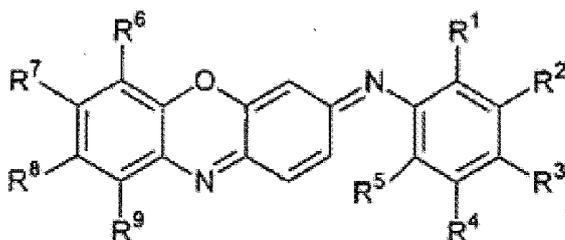
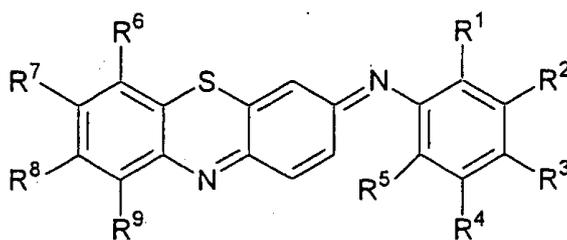
seleccionado del grupo que consiste en 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina y ácido 3-(3',5'-fenilimino)-3H-fenotiazinadisulfónico y una combinación de los mismos.

5 La naturaleza del analito que se va a vigilar según la presente invención no está restringida, siempre que el analito experimente una reacción química que esté catalizada por una enzima seleccionada del grupo que consiste en una flavoproteína, una quinoproteína y una combinación de las mismas. Los analitos preferentes incluyen, pero sin limitación, glucosa, lactato, D-aminoácidos, ascorbato, alcohol, colesterol, colina y acetilcolina.

10 Las flavoproteínas según la presente invención incluyen FAD-glucosa oxidasa (Nº de clasificación de enzimas (CE) 1.1.3.4), flavin-hexosa oxidasa (Nº de CE 1.1.3.5) y FAD-glucosa deshidrogenasa (Nº de CE 1.1.99.10). Para información con respecto a estas flavoproteínas véase: Adriaan Joseph Jan Olsthoorn, "Structural and Mechanistic Aspects of Soluble Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*," Ph.D. dissertation, Delft University of Technology, Países Bajos, 1999. Enzimas oxidasa adicionales para su uso según la presente invención incluyen, pero sin limitación, lactato oxidasa, colesterol oxidasa, alcohol oxidasa (por ejemplo, metanol oxidasa), d-aminoácido oxidasa, colina oxidasa y derivados de FAD de las mismas. Una flavoproteína preferente para su uso según la presente invención es FAD-glucosa oxidasa.

15 Las quinoproteínas según la presente invención incluyen, pero sin limitación, PQQ-glucosa deshidrogenada unida a membrana y soluble (Nº de CE 1.1.99.17). Puede encontrarse información relacionada con la PQQ-glucosa deshidrogenasa en la referencia de Olsthoorn citada anteriormente. Enzimas quinoproteínas adicionales para su uso según la presente invención incluyen, pero sin limitación, lactato deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, metilamina deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa (por ejemplo, metanol deshidrogenasa) y derivados de PQQ de las mismas. Una quinoproteína preferente para su uso según la presente invención es PQQ-glucosa deshidrogenasa.

Los mediadores según la presente invención incluyen fenotiazinas que tienen la fórmula



25 en la que R3, R5, R6, R7, R8 y R9 son hidrógeno y (i) cualesquiera R2 y R3 son ambos hidrógeno y R1 y R4 son ambos ácido sulfónico o (ii) R1 y R5 son ambos hidrógeno y R2 y R4 son ambos ácido carboxílico.

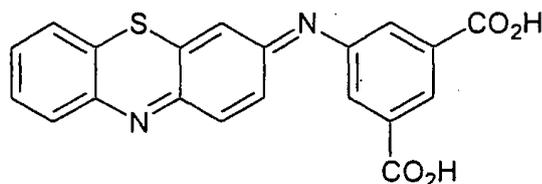
30 A diferencia de la capacidad de transporte de transferencia de un único electrón del $K_3Fe(CN)_6$, los mediadores según la presente invención tienen la capacidad de transportar dos equivalentes rédox y, por lo tanto, son muy adecuados para su uso en procesos de oxidación/reducción con FAD y quinoproteína, que implican generalmente la transferencia de dos electrones. Además, el potencial de mediadores de la presente invención puede ajustarse al potencial óptimo (es decir, el potencial en el que la contribución de señal de las interferencias se minimiza) para una matriz de muestra específica variando la sustitución de los anillos aromáticos. Los sustituyentes donantes de electrones (por ejemplo, alquilo, alcoxi, amina, hidroxilo, etc.) dan como resultado potenciales rédox reducidos, mientras que los sustituyentes aceptores de electrones (por ejemplo, ácido carboxílico, éster, aldehído, cetona, nitrilo, nitro, ácido sulfónico, trifluorometilo, etc.) dan como resultado potenciales rédox aumentados. Para muestras de sangre o plasma, el potencial ideal se encuentra habitualmente entre aproximadamente -200 y aproximadamente 100 mV frente a una referencia de Ag/AgCl.

Los sustituyentes de los anillos aromáticos, además de su utilidad en el ajuste de los potenciales rédox de los mediadores, también pueden usarse para potenciar la solubilidad del mediador. Por ejemplo, puede esperarse que

la introducción de un sustituyente que tiene la capacidad de unirse a hidrógeno haga al mediador más soluble en agua que un mediador que carezca de dicha sustitución. Además, estos sustituyentes pueden servir como grupos funcionales para inmovilizar los mediadores a un soporte (por ejemplo, la superficie del electrodo o, como alternativa, una matriz química tal como un esqueleto polimérico que sea adecuada para la aplicación a la superficie del electrodo).

Los mediadores usados en reactivos biosensores según la presente invención son 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina, ácido 3-(3',5'-fenilimino)-3H-fenotiazinadisulfónico.

Más preferentemente, el mediador usado según la presente invención



Mediador I

Con respecto al ferricianuro, los mediadores de fenotiazina, en particular el mediador I, son menos susceptibles a degradación por oxígeno, más térmicamente estables y más estables a la humedad ambiental. Además, el mediador I trabaja a un potencial rédox inferior que el ferricianuro. Por ejemplo, el E_0 para el mediador I es aproximadamente 0 mV frente a una referencia de Ag/AgCl, mientras que el E_0 para ferricianuro es 250 mV frente a una referencia de Ag/AgCl. El potencial rédox inferior de mediadores de fenotiazina es ventajoso porque existe una región a aproximadamente 0 mV frente a una referencia de Ag/AgCl en la que la cantidad de interferencias electroquímicas se minimiza. De este modo, la influencia de interferentes químicos en la sangre puede minimizarse usando estos mediadores.

Pueden incorporarse reactivos que presentan características de la presente invención en una diversidad de dispositivos, que incluyen, pero sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos N° 5.120.420 y N° 5.798.031, incorporándose la totalidad del contenido de ambas al presente documento por referencia, excepto en que en el caso de cualquier divulgación o definición no consecuente con la presente invención, prevalecerá la divulgación o definición del presente documento.

Volviendo ahora a los dibujos, la FIG. 1 muestra un sensor electroquímico representativo según la presente invención. El sensor electroquímico 2 está constituido por una base aislante 4 sobre la que se imprime (típicamente mediante técnicas de serigrafía) un patrón de electrodo (6 y 8) y una capa de reactivo 10 que contiene un reactivo que presenta características de la presente invención. Las dos partes de la impresión de electrodo, 6 y 8, proporcionan los electrodos de trabajo y de referencia necesarios para la determinación electroquímica. Puede incorporarse un elemento de lanceta 12 al sensor electroquímico (por ejemplo, interpuesto entre las capas 1 y 2), tal como se describe con más detalle a continuación en el presente documento. Las tres capas mostradas en la FIG. 1 pueden unirse por medio de un adhesivo (por ejemplo, sensible a la presión, de fusión en caliente, etc.) o mediante soldadura sónica, en función de la identidad de los materiales.

Se ha hallado que los reactivos biosensores comprenden PQQ-glucosa deshidrogenasa y determinados mediadores de fenotiazina muestran una estabilidad elevada a esterilización por radiación. Una aplicación preferente de reactivos biosensores estables a la radiación según la presente invención es para el desarrollo de dispositivos integrados de lanceta/biosensor. Un ejemplo de dicho dispositivo integrado se ilustra en la FIG. 2 y se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.801.057, incorporándose la totalidad de su contenido al presente documento por referencia, excepto en que en el caso de cualquier divulgación o definición no consecuente con la presente divulgación, prevalecerá la divulgación o definición del presente documento.

Como se muestra en la FIG. 2, el dispositivo integrado de lanceta/biosensor 14 tiene una aguja perforada finamente 16 conectada a una cámara de muestreo 18. La cámara de muestreo 18 tiene al menos una ventana óptica 20 y una ventilación 22 a través de la que puede descargarse aire cuando la cámara 18 se llena con sangre u otros fluidos. Preferentemente, la cámara de muestreo 18 comprende un reactivo biosensor que comprende PQQ-glucosa deshidrogenasa y un mediador de fenotiazina y/o fenoxazina. Preferentemente, el mediador tiene una estructura representada por el mediador I anterior. Una vez la cámara de muestreo 18 se ha cargado con reactivo biosensor 14 puede someterse a esterilización por radiación. Preferentemente, el procedimiento de esterilización implica irradiación con haz de electrones (haz electrónico) o irradiación gamma.

Como se indica en el documento de la Association for the Advancement of Medical Instrumentation ANSI/AAMI/ISO 11137-1994, los productos que penetran en la piel y entran en contacto con la sangre deben tener un nivel de aseguramiento de esterilidad (SAL) de 10^{-6} , lo que corresponde a una probabilidad de uno entre un millón de que un microorganismo esté presente en una unidad de producto después de la esterilización. La dosis de esterilización

necesaria para lograr un 10^{-6} de SAL depende de la biocarga de la muestra. Por ejemplo, una muestra con una biocarga de 1,021 requiere una dosis de esterilización de 24,9 kGy para lograr un 10^{-6} de SAL.

En los ejemplos descritos más adelante en el presente documento, se usó como procedimiento de esterilización la irradiación con haz de electrones (haz electrónico). Los reactivos biosensores sometidos al haz electrónico absorben energía de los electrones. La energía que es absorbida por unidad de masa de material se denomina la dosis absorbida y es esta absorción de energía, o suministro de dosis, la que destruye las células reproductoras y las cadenas de ADN de microorganismos, proporcionando de este modo un producto estéril. Se usaron dosis de haz electrónico de 25, 50 y 100 kGy debido a que la biocarga de los reactivos biosensores era desconocida.

La FIG. 3 muestra un gráfico de las corrientes de fondo observadas para tres formulaciones de reactivos biosensores expuestos a niveles crecientes de radiación: (1) NAD-glucosa deshidrogenasa con mediador I, (2) PQQ-glucosa deshidrogenasa con ferricianuro y (3) PQQ-glucosa deshidrogenasa con mediador I. Las formulaciones de PQQ toleraron la irradiación extremadamente bien. Por el contrario, la formulación de NAD mostró una mala tolerancia a las condiciones de esterilización y dio como resultado una señal de fondo que constituía una cantidad significativa de la señal de glucosa. Aunque la formulación (2) mostró una buena tolerancia al procedimiento de radiación, la actividad de la enzima extraída fue inferior a la actividad correspondiente de la enzima extraída de la formulación (3). La Fig 4 muestra un gráfico de respuesta a corriente cuando estos sensores esterilizados por radiación se expusieron a 600 mg/dl de glucosa.

El modo en que se fabrica un dispositivo que presenta características de la presente invención, y el procedimiento mediante el que se usa dicho dispositivo para vigilar el analito, será muy claro para un experto en la técnica en base a la consideración conjunta de la descripción precedente y los procedimientos representativos siguientes. Se entenderá que serán obvias muchas variaciones en las realizaciones actualmente preferentes en el presente documento para un experto en la técnica y estas permanecen dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Por ejemplo, el electrodo de trabajo usado en sensores electroquímicos según la presente invención puede variarse, incluyendo los electrodos adecuados, pero sin limitación, electrodos de carbono, electrodos de platino, electrodos de paladio, electrodos de oro y similares. De forma similar, el electrodo de referencia puede variarse, incluyendo los electrodos adecuados, pero sin limitación, electrodos de plata-cloruro de plata, electrodos de calomelanos, electrodos de calomelanos saturados y similares. Como alternativa, puede usarse según la presente invención un casi electrodo de referencia (por ejemplo, un electrodo de platino de área superficial grande) del tipo usado comúnmente en experimentos electroquímicos no acuosos (es decir, un electrodo que no tenga una especie redox específica para referenciar su potencial). Las áreas superficiales de todos los electrodos usados según la presente invención son también objeto de variación. Preferentemente, el electrodo de trabajo tiene dimensiones de aproximadamente 0,6 mm x 1,2 mm.

Además, las composiciones y el pH de las soluciones tampón usadas y las actividades enzimáticas y concentraciones de componentes de los reactivos biosensores son objeto de una variación amplia. Las soluciones tampón adecuadas incluyen, pero sin limitación, HEPES (es decir, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), MOPS (es decir, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), TES (es decir, ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico), ácido 2-([2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)-etil]amino)etanosulfónico), PIPES (es decir, ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)), 1,4-ácido piperazinadietanosulfónico), ACES (es decir, ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfónico), ácido N-(2-acetamidol)-2-aminoetanosulfónico, BES (es decir, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) y tampón de Dulbecco (es decir, fosfato de sodio 0,008 M, fosfato de potasio 0,002 M, cloruro de sodio 0,14 M, cloruro de potasio 0,01 M, pH 7,4).

El modo en que se fabrican reactivos y dispositivos que presentan características de la presente invención, y los procedimientos mediante los que se usan dichos reactivos y dispositivos para vigilar el analito, serán muy claros para un experto en la técnica en base a la consideración conjunta de la descripción precedente y los procedimientos representativos siguientes.

Aunque los ejemplos que se proporcionan a continuación en el presente documento se refieren a aplicaciones *in vitro* de los reactivos biosensores según la presente invención, se considera que estos reactivos también puedan adaptarse para la vigilancia de un analito *in vivo* inmovilizando químicamente los mediadores de fenoxazina y/o fenotiazina (por ejemplo, mediante reacción química en uno o más de los grupos sustituyentes de los grupos aromáticos) e incorporando los mediadores inmovilizados a un dispositivo que puede implantarse subcutáneamente a un paciente.

Ejemplos

Preparación de biosensores y dosis-respuesta de glucosa

Se preparó un reactivo químico líquido para que fuera 20 unidades/ μ l de piroloquinolinaquinona-glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH) y mediador I 24 mM en fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4. El primer componente del reactivo se fabricó disolviendo el mediador en fosfato 100 mM, pH 7,4, ajustando el pH de nuevo a 7,4 y filtrando la solución forzándola a través de un filtro de jeringa Whatman de PTFE de 0,45 micrómetros. El reactivo se completó añadiendo PQQ-GDH liofilizada (Toyobo Producto N° GLD-321) a una actividad de 20 U/ μ l

La formulación de producto químico se depositó sobre electrodos, que se habían producido usando un procedimiento de serigrafía de 3 pasos de Conductive Technologies, Inc. Durante este procedimiento, los electrodos de plata/cloruro de plata (DuPont 5870 ink) y el electrodo de referencia se imprimieron en primer lugar sobre material de base de policarbonato. El segundo paso de electrodo de trabajo de carbono-grafito Dupont 7102T se imprimió en la parte superior del mismo. Un paso final de dieléctrico de Norcote RDMSK4954-A2 definió que el área del electrodo de trabajo era 0,0113 cm².

El producto químico se depositó sobre el electrodo de trabajo usando un sistema de suministro Asymtek Automove[®] 402. El sistema se programó para realizar la transferencia sumergiendo una clavija de acero inoxidable de 62 ml en una vial de 1,5 ml Eppendorf relleno con reactivo. El material de la tapa de policarbonato se laminó a unos sensores creando un área capilar sobre los electrodos de trabajo y de referencia capaz de contener aproximadamente 3 µl de solución de ensayo. El área capilar, que define el volumen de muestra, se forma en primer lugar en el material de la tapa de policarbonato mediante un procedimiento de acuñado o de estampado.

Tal como se muestra en la FIG. 5, la reactividad del producto químico se analizó generando una curva de dosis-respuesta de glucosa con muestras tamponadas (fosfato 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,4) que contenían un intervalo de concentraciones de glucosa de 0 a 600 mg/dl. La corriente generada en cada una de las concentraciones de glucosa se midió usando un potenciostato programado para aplicar un potencial de 150 mV con un ajuste de nivel de activación a 100 nA y una temporización programada para registrar la corriente a 5, 10, 15 y 20 segundos. El nivel de activación se refiere a un nivel de umbral superior en el que se inician la temporización y el registro.

Los sensores formulados con sensor de 20 U de glucosa oxidasa y mediador I 6 mM se depositaron sobre electrodos sensores de electrodos como anteriormente. Se obtuvo la gráfica de dosis-respuesta que se muestra en la FIG. 6.

Preparación de biosensor electroquímico y estabilidad al calor/a la humedad

Se construyeron biosensores electroquímicos usando un procedimiento de impresión serigráfica. Los sensores estaban compuestos por un electrodo de trabajo de carbono y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata. Una solución (150 a 800 nl) que contenía mediador I 12 mM en tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) y de la enzima PQQ-glucosa deshidrogenasa (10 U/µl) se depositó sobre la superficie del electrodo de trabajo y se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de su desecación. Los electrodos se ensamblaron en un formato que tenía un hueco capilar pequeño que permitía la inoculación de los sensores con soluciones de muestra.

En ensayos subsiguientes, los sensores se sometieron a las condiciones medioambientales siguientes antes del análisis: 1) 50 °C durante 2, 4 y 8 semanas; y 2) temperatura ambiente con el 40 % de humedad relativa. El potencial de los sensores se mantuvo constante a 150 mV con respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl y se midió la corriente resultante. Esta combinación de mediador/enzima es bastante estable tanto a la tensión por calor como a la tensión por humedad tal como se muestra en la FIG. 7.

Esterilización de biosensores y datos de estabilidad a la radiación

Se prepararon cinco formulaciones de reactivos biosensores (Tabla 1) y se sometieron a irradiación con haz de electrones usando tecnología de esterilización SureBeam[®] en Titan Scan Technologies (San Diego, CA). La formulación I se irradió a 25 kGy, 50 kGy y 100 kGy, irradiándose cada una de las formulaciones II-V a 25 kGy solo. En los dos encabezados de columna más a la derecha de la Tabla 1, la abreviatura CMC se refiere a carboximetilcelulosa y la abreviatura PEO se refiere a poli(óxido de etileno).

Tabla 1

Nº de formulación	Unidades de concentración de enzima PQQ-GDH	Concentración de mediador I mM	% de concentración de polímero CMC	% de concentración de polímero PEO
I	20	12	0	0
II	20	12	0	0
III	20	12	1	0
IV	20	12	2	0
V	20	12	0	2

Las FIG. 8-12 muestran curvas de dosis-respuesta de glucosa para cada una de las cinco formulaciones tanto antes como después de la irradiación. La estabilidad de las cinco formulaciones es elevada, como se muestra claramente mediante el casi solapamiento de la respuesta de glucosa generada antes y después de la irradiación.

La tabla 2 muestra los resultados de ensayos enzimáticos realizados sobre las cinco formulaciones antes y después de la irradiación. La actividad enzimática después de la irradiación permanece elevada en todos los casos.

Tabla 2

Formulación N°	Nivel de kGy	Actividad enzimática
I	0	4,67
	25	4,32
	50	4,20
	100	4,24
II	0	3,31
	25	3,34
III	0	4,93
	25	4,87
IV	0	4,96
	25	4,86
V	0	3,63
	25	4,05

5 La descripción detallada anterior y los ejemplos se han proporcionado a modo de explicación e ilustración, y no pretenden limitar el ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Serán obvias muchas variaciones en las realizaciones actualmente preferentes ilustradas en el presente documento para un experto en la técnica y permanecen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un sensor electroquímico que comprende:

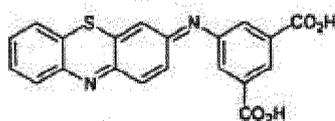
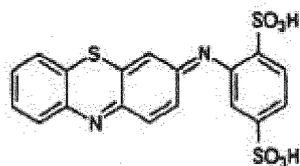
un primer electrodo que tiene una superficie; y

un segundo electrodo acoplado al primer electrodo,

5 en el que la superficie del primer electrodo incluye un reactivo que comprende

una enzima seleccionada del grupo que consiste en una flavoproteína, una quinoproteína o una combinación de las mismas; y

un mediador seleccionado del grupo que consiste en



10 o una combinación de los mismos.

2. El sensor electroquímico de la reivindicación 1, que además comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, poli(óxido de etileno) y combinaciones de los mismos.

15 3. El sensor electroquímico de la reivindicación 1, en el que el tampón es seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, Hepes, MOPS, TES, Pipes, ACES, BES, de Dulbecco y combinaciones de los mismos.

4. El sensor electroquímico de la reivindicación 1, en el que el reactivo es estable después de exposición a irradiación.

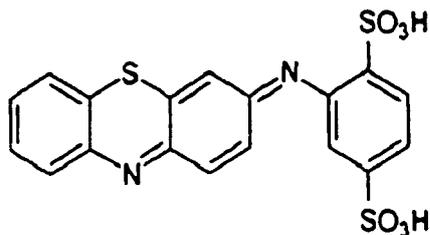
5. El sensor electroquímico de la reivindicación 4, en el que la irradiación es una de radiación con haz de electrones, radiación gamma y radiación ultravioleta.

20 6. El sensor electroquímico de la reivindicación 1, en el que la enzima es seleccionada del grupo que consiste en FAD-glucosa deshidrogenasa, PQQ-glucosa deshidrogenasa y combinaciones de las mismas.

7. Un sensor electroquímico para detectar un analito, que comprende:

una enzima flavoproteína; y

un mediador que comprende



25 8. El sensor electroquímico de la reivindicación 7, que además comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, poli(óxido de etileno) y combinaciones de los mismos.

9. El sensor electroquímico de la reivindicación 7, en el que la flavoproteína es seleccionada del grupo que consiste en FAD-glucosa oxidasa, flavin-hexosa oxidasa, FAD-glucosa deshidrogenasa, FAD-lactato oxidasa, FAD-colesterol oxidasa, FAD-alcohol oxidasa, FAD-d-aminoácido oxidasa, FAD-colina oxidasa y combinaciones de las mismas.

10. El sensor electroquímico de la reivindicación 7, en el que el reactivo es estable después de exposición a irradiación.

5

FIG. 1

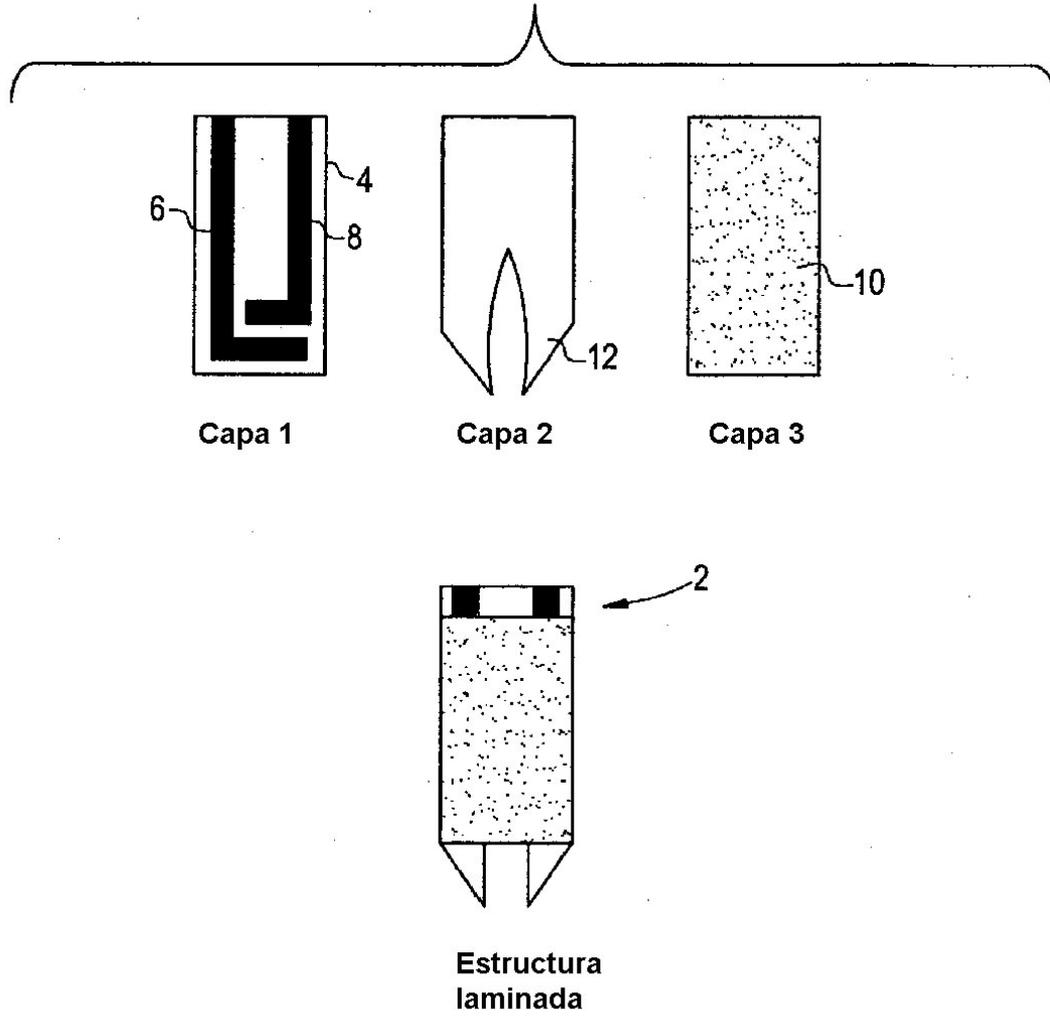


FIG. 2

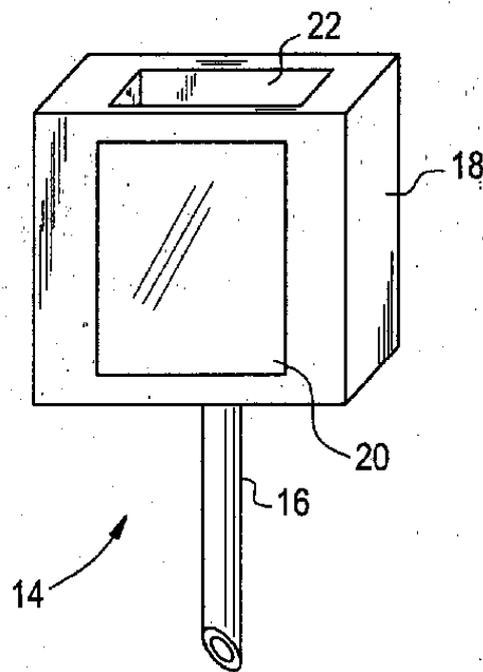


FIG. 3

Corriente de fondo después de la irradiación

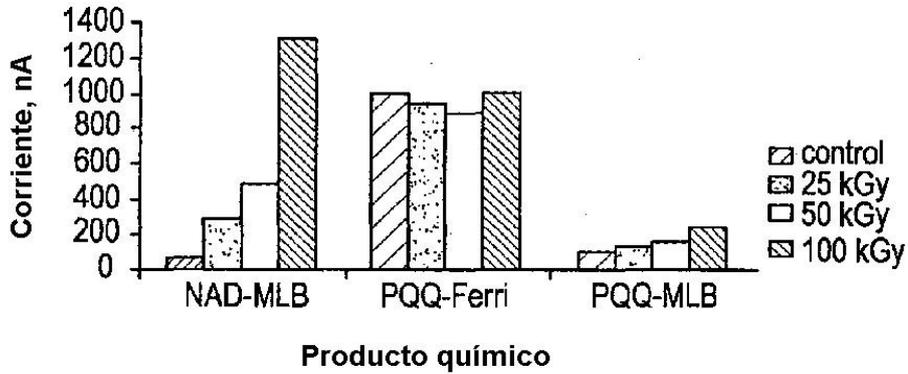


FIG. 4

Respuesta de 600 mg/dl de glucosa después de la irradiación

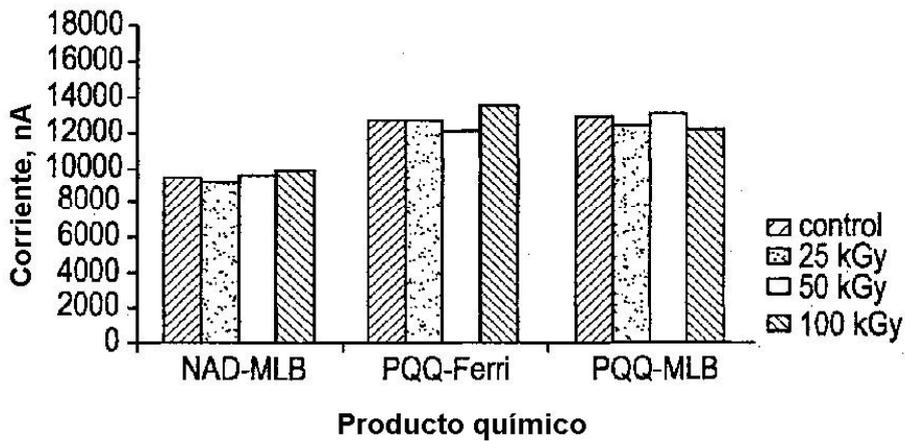


FIG. 5

Curva dosis-respuesta de PQQ-GDH/MLB

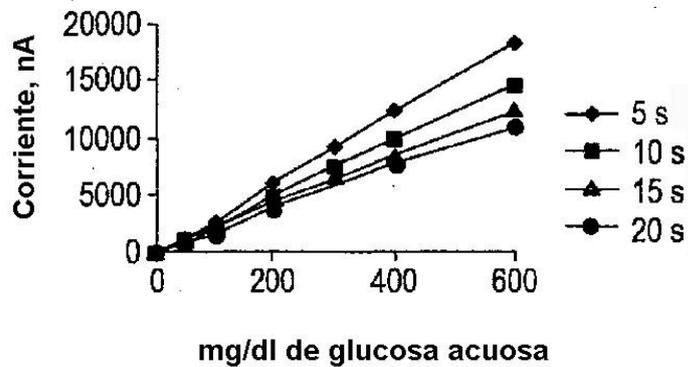


FIG. 6

MLB 92 con glucosa oxidasa

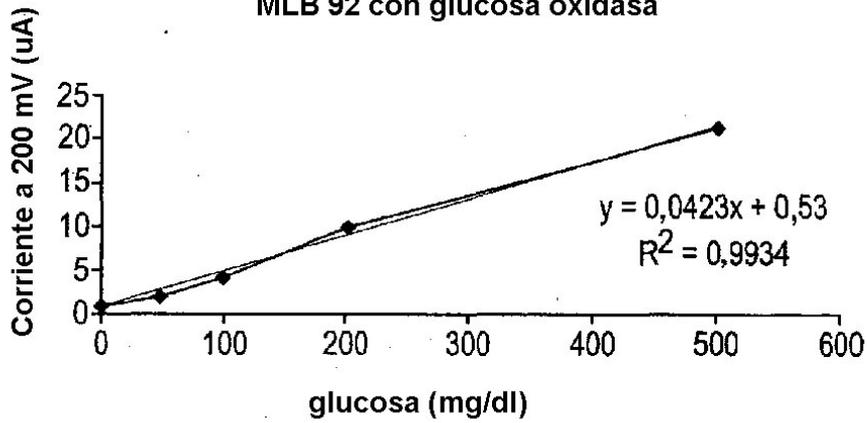


FIG. 7

GHD-PQQ con MLB 92

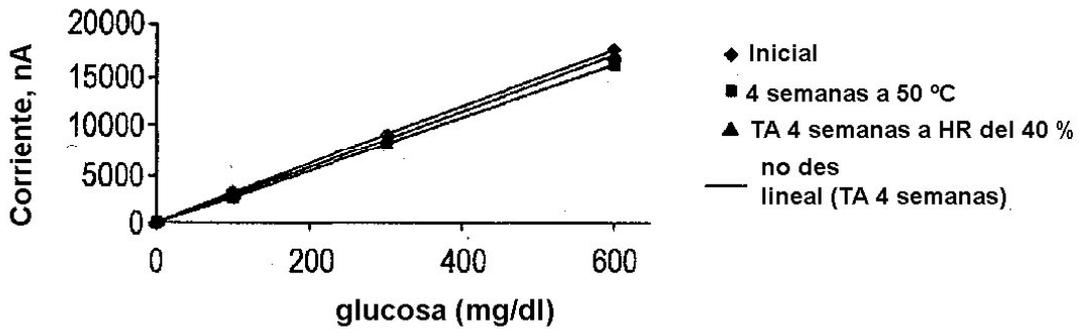


FIG. 8

Estudio de estabilidad a la irradiación
del producto químico PQQ-GDH
Formulación I

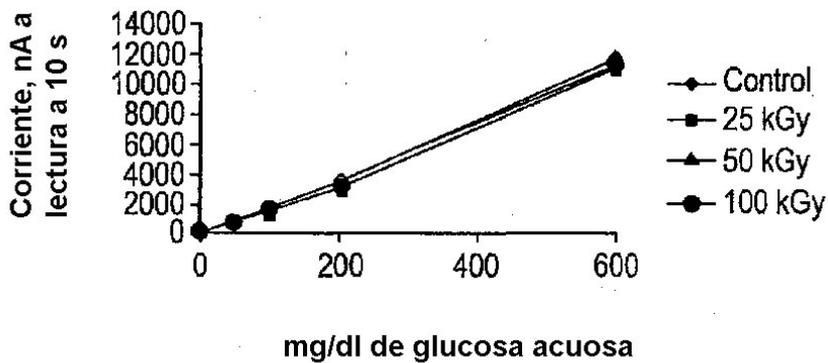


FIG. 9

Estudio de estabilidad a la irradiación del producto químico PQQ-GDH

Formulación II

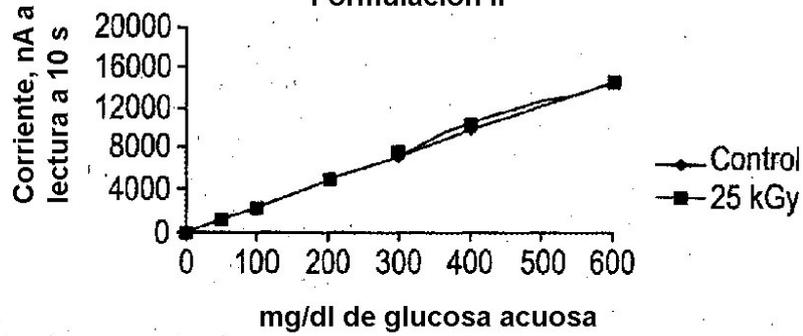


FIG. 10

Estudio de estabilidad a la irradiación del producto químico PQQ-GDH

Formulación III

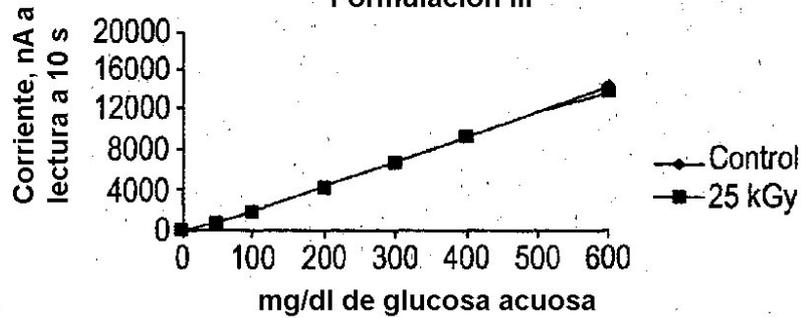


FIG. 11

Estudio de estabilidad a la irradiación del producto químico PQQ-GDH

Formulación IV

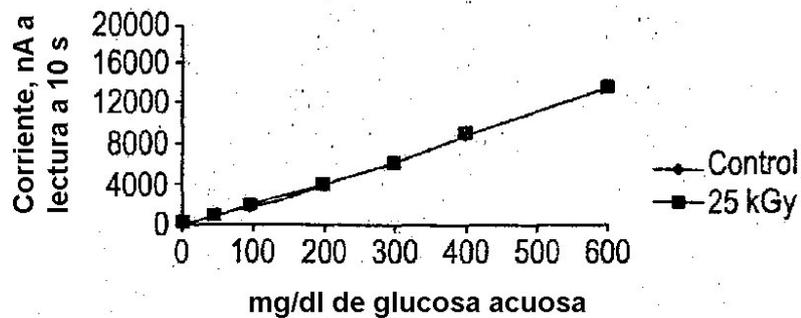


FIG. 12

Estudio de estabilidad a la irradiación
del producto químico PQQ-GDH

Formulación V

