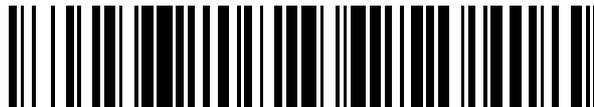


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 984**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10796365 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2513648**

54 Título: **Detección de la descomposición de enzimas en un elemento de ensayo por liberación controlada de un analito protegido**

30 Prioridad:

**16.12.2009 EP 09179500**

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

**07.09.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HORN, CARINA;  
HEINDL, DIETER;  
HAAR, HANS-PETER y  
STEINKE, NELLI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 544 984 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**

Detección de la descomposición de enzimas en un elemento de ensayo por liberación controlada de un analito protegido

5 La presente invención se refiere a un elemento diagnóstico para determinar al menos un analito, así como a un aparato de medición analítico que incluye este tipo de elemento diagnóstico. Además la presente invención se refiere a un método para determinar un analito, a un método para corregir una señal generada por un analito, así como a un método para comprobar la óptica de detección de un aparato de medición analítico mediante el empleo del elemento diagnóstico. Por último la presente invención se refiere a un sistema para controlar la liberación de un reactivo y también al uso de dicho sistema como elemento de conmutación.

15 Los elementos diagnósticos son componentes clínicamente importantes de los métodos analíticos relevantes. Ahí cabe destacar la medición de analitos, p.ej. de metabolitos o sustancias que se determinan directa o indirectamente con la ayuda de un enzima específico del enzima, por ejemplo. En tal caso los analitos se hacen reaccionar con la ayuda de un complejo enzima-coenzima y a continuación se cuantifican. Para ello el analito buscado se pone en contacto con un enzima y un coenzima adecuados y, si es preciso, con un mediador, con lo cual el coenzima se altera fisicoquímicamente por la reacción enzimática, p.ej. se oxida o se reduce. Si además se emplea un mediador, éste transfiere los electrones liberados por el coenzima reducido durante la reacción del analito, normalmente a un indicador óptico o a los componentes conductores de un electrodo, lo cual permite detectar el proceso fotométrico o electroquímicamente por ejemplo. Por calibración se puede obtener una relación directa del valor medido con la concentración del analito buscado.

25 Los elementos diagnósticos conocidos del estado técnico se caracterizan por tener una estabilidad limitada en el tiempo y requerir unas condiciones especiales del entorno, como por ejemplo refrigeración o almacenamiento en seco, para conseguir dicha estabilidad. Por tanto en ciertas formas de aplicación - p.ej. en ensayos realizables por el propio usuario final, tales como el autocontrol de glucosa en sangre - debido a un almacenamiento incorrecto e inadvertido del sistema de medición pueden obtenerse unos resultados falsos, apenas reconocibles por el usuario, que ocasionalmente pueden conducir a un tratamiento erróneo de la enfermedad correspondiente.

30 Los resultados falsos son debidos en primer lugar al hecho de que los enzimas, coenzimas y mediadores utilizados en estos elementos diagnósticos reaccionan generalmente de modo sensible a la humedad y al calor, inactivándose. Por ejemplo, en la detección de glucosa mediante el sistema glucosa-deshidrogenasa/NAD tanto la actividad del enzima glucosa-deshidrogenasa como el contenido del coenzima NAD disminuye con el tiempo en condiciones de calor húmedo ambiental, y en general la disminución de coenzima es más rápida que la pérdida de actividad del enzima.

35 Una medida conocida que se usa para aumentar la estabilidad de los elementos diagnósticos es el empleo de enzimas estables, p.ej. enzimas de organismos termófilos. Otra posibilidad es la estabilización de los enzimas por modificación química, p.ej. mediante gesticulación, o por muta génesis. Asimismo se pueden añadir estabilizadores de enzimas, como p.ej. tremalos, polivinilpirrolidona y albúmina de suero, o incluir los enzimas en redes poliméricas, p.ej. mediante fotopolimerización.

45 Otra posibilidad de mejorar la estabilidad de los elementos diagnósticos consiste en usar coenzimas estabilizados. Si bien los coenzimas naturales - como por ejemplo NAD y NADP o sus formas reducidas NADH y NADPH - son comparativamente inestables en condiciones básicas o ácidas por la labilidad del enlace de glicosilo entre la unidad de ribosa y la unidad de piridina, en los últimos años se han descrito en la literatura varios derivados de NAD/NADH y de NADP/NADPH que incrementan significativamente la estabilidad del coenzima por modificación del grupo nicotinamido o de la unidad de ribosa.

50 Por último la estabilidad de los elementos diagnósticos también se puede aumentar mediante el uso de mediadores estables. Así, el uso de mediadores con el potencial redox más bajo posible incrementa la especificidad del ensayo y elimina perturbaciones durante la reacción. No obstante los potenciales redox de los complejos enzima/coenzima constituyen un límite inferior para el potencial redox de los mediadores. Por debajo de ellos se ralentiza o incluso se inhibe la reacción con los mediadores.

60 Pero de hecho, en la práctica, no todos los componentes de los reactivos químicos de detección empleados en los elementos diagnósticos muestran la misma estabilidad, sino que sufren procesos de descomposición a velocidades más bien distintas. Así, por ejemplo, el uso de carba-NAD como coenzima tiene el efecto de mantenerlo muy estable durante largo tiempo gracias a la unidad carbacíclica de azúcar, incluso con humedad y temperaturas altas, mientras que la actividad de un enzima natural empleado en el elemento diagnóstico disminuye continuamente. Del mismo modo, usando por ejemplo una combinación de enzima estabilizado y coenzima natural se puede mantener durante largo tiempo la actividad del enzima, mientras que la cantidad de coenzima disminuye con mayor o menor rapidez debido a la descomposición térmica y/o hidrolítica.

65

Por consiguiente, a fin de evitar falsos resultados en la determinación de analitos se debería poder comprobar si los componentes individuales de un reactivo de detección empleado en los elementos diagnósticos aún se encuentra en forma funcional en el momento de la medición y si el reactivo de detección es adecuado para analizar cualitativa o/y cuantitativamente el analito. En relación con ello resulta especialmente problemática, por ejemplo, la determinación de la actividad enzimática, pues la inactivación de un enzima es provocada en primer lugar por una variación de la conformación de la proteína y entonces por falta de variación de la constitución no se forman partículas óptica o electroquímicamente activas.

Por consiguiente la presente invención tenía por objeto proporcionar un elemento diagnóstico estable, sobre todo para la determinación de glucosa, con el cual se eliminaran al menos en parte los inconvenientes del estado técnico. En concreto el elemento diagnóstico debería garantizar que en caso de funcionalidad muy disminuida o totalmente carente de los componentes individuales de un reactivo de detección se evitase la indicación de unos resultados de medición supuestamente correctos referidos a un analito objeto de determinación.

La presente invención resuelve este objetivo mediante un elemento diagnóstico para la determinación de al menos un analito, que comprende un reactivo de detección específico del analito y una cantidad definida del analito objeto de la determinación (analito indicador), de modo que el analito indicador se halla en una forma liberable inaccesible a una reacción con el reactivo de detección.

El reactivo de detección empleado en el elemento diagnóstico según la presente invención es preferentemente un reactivo de detección químico y puede incluir cualquier componente apto para determinar un analito, por ejemplo mediante el uso de medios ópticos o electroquímicos. El especialista conoce ejemplos de tales componentes, que pueden ser, sobre todo, enzimas, coenzimas, mediadores, indicadores ópticos y sustancias auxiliares y/o aditivos, pero no están limitados a dichos componentes.

En una forma de ejecución preferida el reactivo de detección comprende como mínimo un enzima o/y un coenzima que independientemente entre sí pueden ser de origen natural, semisintético o sintético y el especialista los puede elegir libremente según los requisitos del elemento diagnóstico. Según la presente invención se prefiere sobre todo una combinación formada por al menos un enzima y al menos un coenzima, de manera que el enzima sea con preferencia muy específico del analito buscado y por consiguiente minimice los falsos resultados en el marco de la determinación del analito.

El enzima incluido en el elemento diagnóstico según la presente invención es preferiblemente dependiente de un coenzima. Como ejemplos de tales 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), aminotransferasas como p.ej. aspartato- o alanina-amino transferasa, 5'-nucleotidasa, creatina-cinasa y diaforasa (EC 1.6.99.2). En una forma de ejecución más preferida se utiliza como enzima una deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP/NADPH), eligiendo especialmente el enzima del grupo formado 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-hidroxitirato 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 glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49).

Si se usa como enzima una glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), en el marco del método de la presente invención puede emplearse por ejemplo una glucosa deshidrogenasa mutada. Tal como se usa en el marco de la presente solicitud de patente, el término "mutante" designa una variante genéticamente modificada de un enzima natural que posee una secuencia de aminoácidos distinta del enzima de tipo natural, aunque igual número de ellos, es decir se distingue del enzima de tipo natural en al menos un aminoácido. La introducción de las mutaciones puede ser o no ser específica del sitio, preferiblemente específica del sitio, y tiene lugar mediante el uso de métodos recombinantes conocidos en el sector, dando como resultado el intercambio de al menos un aminoácido dentro de la secuencia del enzima natural según las correspondientes exigencias y condiciones. El mutante presenta con especial preferencia una mayor estabilidad térmica o hidrolítica respecto al enzima de tipo natural. En Baik (Appl. Environ. Microbiol. (2005), 71, 3285), Vásquez-Figueroa (ChemBioChem (2007), 8, 2295) y en la patente WO 2005/045016 A2, cuyas revelaciones se asumen aquí expresamente como referencia, se describen ejemplos de tales mutantes.

En principio la glucosa deshidrogenasa mutada puede contener en cualquier posición de su secuencia el o los aminoácidos cambiados respecto a la correspondiente glucosa deshidrogenasa de tipo natural. Preferiblemente la glucosa deshidrogenasa mutada incluye una mutación en al menos una de las posiciones 96, 170 y 252 de la secuencia de aminoácidos de la glucosa deshidrogenasa de tipo natural, prefiriéndose especialmente los mutantes con mutaciones en la posición 96 y en la posición 170 o con mutaciones en la posición 170 y en la posición 252. Ha resultado ser ventajoso que la glucosa deshidrogenasa mutada no contenga ninguna otra mutación además de estas mutaciones.

La mutación en las posiciones 96, 170 y 252 puede comprender en principio cualquier intercambio de aminoácidos que aumente la estabilidad - p.ej. térmica o hidrolítica - del enzima de tipo natural. La mutación en la posición 96

consiste preferiblemente en un intercambio de los aminoácidos ácido glutámico por glicina, mientras que en la posición 170 se prefiere el intercambio de ácido glutámico por arginina o lisina, sobre todo por lisina. Por lo que se refiere a la posición 252 el intercambio preferido de aminoácidos es el de lisina por leucina.

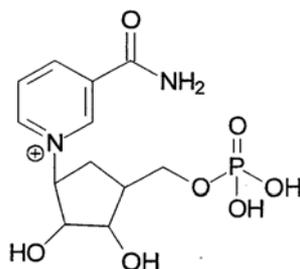
5 La glucosa deshidrogenasa mutada se puede obtener por mutación de una glucosa deshidrogenasa de tipo natural procedente de cualquier fuente biológica. Según la presente invención el término "fuente biológica" incluye tanto procariontas, por ejemplo bacterias, como eucariotas, por ejemplo mamíferos y otros animales. Preferentemente la glucosa deshidrogenasa de tipo natural proviene de una bacteria y con especial preferencia se trata de una glucosa deshidrogenasa procedente de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*, sobre todo de *Bacillus subtilis*.

10 En una forma de ejecución especialmente preferida la glucosa deshidrogenasa mutada se obtiene por mutación de la glucosa deshidrogenasa de tipo natural procedente de *Bacillus subtilis* y posee la secuencia de aminoácidos plasmada en la SEQ ID N°: 1 (GlucDH\_E96G\_E170K) o en la SEQ ID N°: 2 (GlucDH\_E170K\_K252L).

15 En una forma de ejecución de la presente invención los elementos diagnósticos aquí descritos comprenden además un coenzima preferiblemente estabilizado. Según la presente invención un coenzima estabilizado es un coenzima que está modificado químicamente respecto al coenzima de tipo natural y a presión atmosférica es más estable a la humedad en comparación con el coenzima natural.

20 Es estable a temperaturas comprendidas en un intervalo concreto de 0°C hasta 50°C, en medios ácidos y básicos, sobre todo en el intervalo de pH 4 a pH 10, o/y en nucleófilos como por ejemplo alcoholes o aminas, y en idénticas condiciones ambientales puede desplegar su efecto durante un periodo de tiempo más largo que el coenzima de tipo natural. El coenzima estabilizado muestra preferiblemente una mayor estabilidad hidrolítica que el coenzima natural y sobre todo se prefiere que en las condiciones de ensayo la estabilidad a la hidrólisis sea total. En comparación con el coenzima natural el coenzima estabilizado puede tener una menor constante de unión del enzima, por ejemplo una constante de unión reducida por un factor de 2 o más.

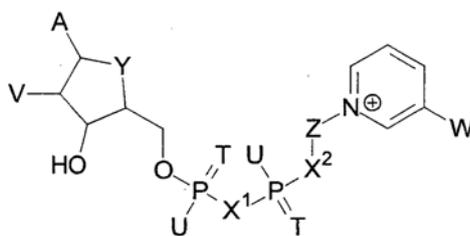
25 Los ejemplos preferidos de coenzimas estabilizados en el sentido de la presente invención son compuestos de NAD(P)/NAD(P)H estabilizados, es decir derivados químicos de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP/NADPH), o el compuesto de la fórmula (I)



(I)

35 Cuando el coenzima estabilizado es un compuesto de NAD(P)/NAD(P)H éste comprende preferiblemente un resto de 3-piridincarbonilo o de 3-piridintiocarbonilo que está unido sin enlace glicosídico con un resto fosforado, como por ejemplo un resto de fosfato, por medio de un resto orgánico lineal o cíclico, en concreto mediante un resto orgánico cíclico.

40 El compuesto de NAD(P)/NAD(P)H estabilizado se elige con especial preferencia entre los compuestos de la fórmula general (II):



(II)

donde

- A = adenina o un análogo de ella,  
 T = independientemente entre sí O, S,  
 5 U = independientemente entre sí OH, SH, BH<sub>3</sub><sup>-</sup>, BCNH<sub>2</sub><sup>-</sup>,  
 V = independientemente entre sí OH o un grupo fosfato, o dos grupos que forman un grupo fosfato cíclico;  
 W = COOR, CON(R)<sub>2</sub>, COR, CSN(R)<sub>2</sub> con R = independientemente entre sí H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>,  
 X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> = independientemente entre sí O, CH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH, NCH<sub>3</sub>,  
 Y = NH, S, O, CH<sub>2</sub>,  
 10 Z = un radical orgánico lineal o cíclico, con la condición de que Z y el radical piridino no estén unidos mediante un enlace glicosídico, o una sal u ocasionalmente una forma reducida de ella.

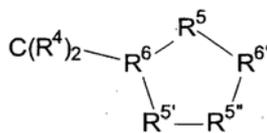
En una forma de ejecución preferida los compuestos de la fórmula general (II) contienen adenina o análogos de adenina, como p.ej. adenina sustituida en C<sub>8</sub> y N<sub>6</sub>, variantes deaza como 7-deaza, azavariantes como 8-aza o bien 15 combinaciones como 7-deaza u 8-aza o análogos carbocíclicos como formicina, de modo que las variantes 7-deaza pueden estar sustituidas en la posición 7 con halógeno, alquínilo-, alquénilo- o alquilo-C<sub>1-6</sub>.

En otra forma de ejecución preferida los compuestos de la fórmula general (II) contienen análogos de adenosina que en lugar de ribosa llevan p.ej. 2-metoxidesoxirribosa, 2'-fluorodesoxirribosa, hexitol, alritrol o análogos policíclicos como azúcares bicíclicos, azúcares de LNA y azúcares tricíclicos.

Asimismo, en los compuestos de la fórmula general (II) los oxígenos de los (di)fosfatos pueden estar sustituidos isotrópicamente, como p.ej. O<sup>-</sup> por S<sup>-</sup> o BH<sub>3</sub><sup>-</sup>, O por NH, NCH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub> y =O por =S. En los compuestos de la fórmula 25 (II) de la presente invención W es preferiblemente CONH<sub>2</sub> o COCH<sub>3</sub>.

En los compuestos de la fórmula general (II) Z es preferiblemente un radical lineal de 4-6 átomos de C, sobre todo de 4 átomos de C, en que 1 o 2 átomos de C pueden estar sustituidos con uno o más heteroátomos elegidos entre O, S y N, o un radical que comprende un grupo cíclico de 5 o 6 átomos de C y puede llevar un heteroátomo elegido entre O, S y N, así como uno o más sustituyentes y un radical CR<sup>4</sup><sub>2</sub>, de modo que CR<sup>4</sup><sub>2</sub> vaya unido al grupo cíclico y 30 a X<sup>2</sup>, siendo R<sup>4</sup> = H, F, Cl, CH<sub>3</sub> respectivamente independientes entre sí.

Z es con especial preferencia un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, sobre todo un grupo de la fórmula general (III),



(III)

en la cual puede haber un enlace simple o doble entre R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup>, y  
 R<sup>4</sup> = independientemente entre sí H, F, Cl, CH<sub>3</sub>,  
 R<sup>5</sup> = CR<sup>4</sup><sub>2</sub>,  
 40 R<sup>5'</sup> = O, S, NH, N-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, CR<sup>4</sup><sub>2</sub>, CHOH, CHOCH<sub>3</sub>, y R<sup>5'</sup> = CR<sup>4</sup><sub>2</sub>, CHOH, CHOCH<sub>3</sub>, cuando entre R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> hay un enlace simple,  
 R<sup>5</sup> = R<sup>5'</sup> = CR<sup>4</sup> cuando entre R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> hay un enlace doble, y  
 R<sup>6</sup>, R<sup>6'</sup> = independientemente entre sí CH o CCH<sub>3</sub>.

En los grupos de la fórmula general (III) R<sup>5</sup> es preferiblemente CH<sub>2</sub>. Además R<sup>5'</sup> se elige preferiblemente entre CH<sub>2</sub>, CHOH y NH. En una forma de ejecución especialmente preferida R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son cada uno CHOH. En otra forma de ejecución especialmente preferida R<sup>5</sup> es NH y R<sup>5'</sup> es CH<sub>2</sub>. Se prefiere sobre todo un grupo de la fórmula (III) en que R<sup>4</sup> = H, R<sup>5</sup> = CH<sub>2</sub>, R<sup>5'</sup> = R<sup>5'</sup> = CHOH y R<sup>6</sup> = R<sup>6'</sup> = CH.

En la forma de ejecución más preferida el coenzima estabilizado es carbaNAD (J.T. Slama, Biochemistry (1988), 27, 183 y Biochemistry (1989), 28, 7688) o carbaNADP. Otros coenzimas estables que se pueden emplear conforme a 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 la publicación de Blackburn y otros (Chem. Comm. (1996), 2765), cuyas revelaciones se asumen aquí expresamente como referencia.

En otra forma de ejecución preferida de la presente invención el reactivo de detección comprende al menos otro componente que sirve para la determinación cualitativa o/y cuantitativa del analito, por ejemplo un mediador o/y un indicador óptico. Tal como se usa en el marco de la presente solicitud de patente el término "mediador" designa un compuesto químico que aumenta la reactividad del coenzima reducido resultante de la reacción con el analito y

facilita la transferencia de electrones a un indicador o sistema indicador óptico adecuado. Como mediadores entran en consideración, entre otros, nitrosoanilinas como por ejemplo hidrocloreuro de [(4-nitrosfenil)imino]dimetanol, quinonas como por ejemplo fenantrenoquinonas, fenantrolinquinonas o benzo[h]-quinolinquinonas, fenazinas como por ejemplo trifluorometansulfonato de 1-(3-carboxipropoxi)-5-etilfenazinio, o/y diaforasa (EC 1.6.99.2).

Entre los ejemplos preferidos de fenantrolinquinonas según la presente invención cabe citar 1,10-fenantrolin-5,6-quinona, 1,7-fenantrolin-5,6-quinona, 4,7-fenantrolin-5,6-quinona, así como sus sales de N-alquilo o N,N'-dialquilo, de modo que en el caso de las sales de N-alquilo o N,N'-dialquilo se prefieren como contraión halogenuros, trifluorometansulfonato u otros aniones que aumenten la solubilidad. Las diaforasas especialmente adecuadas para los fines de la presente invención comprenden, por ejemplo, la diaforasa de corazón porcino, de *Clostridium kluyverii* y de *Bacillus stearothermophilus*, así como el mutante de diaforasa descrito en la patente US 2007/0196899 A1, que tiene una función catalítica y una estabilidad térmica mejoradas respecto a las diaforasas naturales. Las revelaciones de dicha patente US se asumen aquí expresamente como referencia.

Como indicador óptico se puede usar cualquier sustancia reducible que al reducirse experimente una variación detectable de sus propiedades ópticas, como por ejemplo color, fluorescencia, remisión, transmisión, polarización o/e índice de refracción. La presencia o/y la cantidad del analito en la muestra se puede determinar a simple vista o/y mediante un dispositivo de detección, empleando un método óptico apropiado para el especialista, en concreto de tipo fotométrico o fluorimétrico, o electroquímico.

Como indicadores ópticos se usan preferiblemente poliheteroácidos y sobre todo ácido 2,18-fosfomolibdico, que se reducen al correspondiente heteropoliazul. Como alternativa también se pueden usar quinonas, como por ejemplo resazurina, diclorofenol-indofenol o/y sales de tetrazolio. Las sales de tetrazolio, que son especialmente adecuadas para los fines de la presente invención, comprenden por ejemplo los productos comerciales WST-3, WST-4 y WST-5 (todos de la firma Dojindo), pero limitarse a ellos.

Los elementos diagnósticos de la presente invención aquí descritos llevan además una cantidad definida del analito buscado (analito indicador), que sirve para generar una señal definida óptica o electroquímicamente detectable. Si la magnitud de la señal generada por la reacción del analito indicador con el reactivo de detección corresponde a una señal prefijada (señal de referencia) relacionable con una cantidad suficiente de los componentes individuales del reactivo de detección presentes en forma funcional, que son necesarios para la determinación del analito (p.ej. con una cantidad suficiente de enzima activo), entonces el elemento diagnóstico libera el resultado de la auténtica medición del analito contenido en la muestra.

Tal como se usa aquí, la expresión "en forma funcional" significa que el respectivo componente del reactivo de detección se halla en forma químicamente activa y puede cumplir su función asignada en el elemento diagnóstico. La expresión "en forma no funcional" significa en cambio que el componente está en forma químicamente inactiva o que, a pesar de estar en una forma químicamente activa, no cumple su función prevista por diferir dicha forma de la necesaria para ejercer la función deseada.

El elemento diagnóstico descrito en el marco de la presente invención puede ser cualquier elemento de ensayo con una capa seca que contenga el reactivo de detección y pueda ser humectada por la muestra que lleva el analito. Los elementos de ensayo de la presente invención comprenden preferentemente una capa soporte y otra capa que lleva el reactivo de detección. En este caso la capa soporte puede ser de cualquier material sobre el que se pueda aplicar la capa de detección mediante técnicas adecuadas y que luego sirva de soporte del reactivo de detección usado para determinar el analito. Además del enzima, coenzima, mediador o/e indicador óptico el reactivo de detección puede incluir ocasionalmente otros reactivos adecuados según el especialista para los fines de la correspondiente aplicación o/y usualmente necesarios para elaborar elementos diagnósticos, como por ejemplo sustancias auxiliares o/y aditivos.

La colocación de los analitos indicadores en los elementos diagnósticos incluye diversas variantes seleccionables por el especialista en función de los respectivos requisitos y deseos. Según una forma de ejecución preferida los elementos de ensayo de la presente invención llevan los analitos indicadores en la capa de detección y por tanto el reactivo de detección y el analito indicador se encuentran en una capa común. En cambio en otra forma de ejecución preferida el analito indicador se halla en una capa de reserva separada de la capa de detección, sobre todo en una capa de reserva situada entre la capa soporte y la capa de detección, de manera que la capa de reserva puede estar en contacto directo con la capa de detección o separada de ella por una o más capas adicionales. Con especial preferencia, entre dicha capa de reserva y la capa de detección se dispone una capa de barrera disgregable, en concreto fotoquímica o electroquímicamente descomponible, que a su vez está preferiblemente en contacto directo con la capa de detección.

Para evitar una reacción incontrolada con el reactivo de detección del elemento diagnóstico y por consiguiente un falseamiento de la medición auténtica del analito, los elementos de ensayo de la presente invención contienen el analito indicador en una forma liberable, inaccesible a la reacción con el reactivo de detección. Tal como se usa en la presente solicitud de patente, la expresión "en una forma liberable, inaccesible a la reacción con el reactivo de detección" debe considerarse sinónima de la expresión "en forma protegida" y comprende cualquier posibilidad de

evitar selectivamente una reacción (prematura) entre el analito indicador y el reactivo de detección. Las medidas para proteger el analito indicador de una reacción química indeseada comprenden, entre otras, una modificación química del analito indicador mediante el uso de grupos protectores adecuados, una encapsulación del analito indicador en una matriz disgregable e inerte frente al reactivo de detección, así como una separación espacial del analito indicador respecto de la capa que contiene el reactivo de detección o/y de la capa de reserva.

En caso de modificación química el analito indicador, como queda inactivado, puede estar en contacto directo con el reactivo de detección del elemento diagnóstico, pero si no se usa un analito indicador dotado de grupos protectores hay que evitar el contacto directo con el reactivo de detección. Para ello el analito indicador puede ir encapsulado, por ejemplo en una matriz orgánica o inorgánica que sea inerte respecto al reactivo de detección y que se pueda disgregar en unas condiciones definidas liberando el analito indicador. Como alternativa, para evitar una reacción prematura con el reactivo de detección, el analito indicador se puede separar de la capa de detección mediante al menos una capa de barrera disgregable en unas condiciones definidas que permitan liberar el analito indicador, por ejemplo desde la capa de reserva hacia la capa de detección.

Para permitir que reaccione químicamente con el reactivo de detección, el analito indicador debe liberarse a su debido tiempo de la forma inaccesible a la reacción con el reactivo de detección en la que se encuentra dentro del elemento diagnóstico. La liberación puede tener lugar con el uso de medios adecuados, sobre todo fotoquímicos, por irradiación con luz de longitud de onda idónea, o electroquímicos, aplicando una tensión, y en cualquier momento, en concreto antes o después de la reacción del reactivo de detección con el analito contenido en la muestra, ya sea por disociación de un grupo protector ocasionalmente unido al analito indicador, por disgregación al menos parcial de una matriz que contenga el analito indicador o/y por descomposición al menos parcial de una capa de barrera disgregable situada entre la capa de reserva y la capa de detección. La descomposición parcial o total de la matriz o capa de barrera disgregable puede tener lugar, por ejemplo, utilizando el método de formación espectral de huecos por combustión ("hole burning"), que puede usarse en cuerpos sólidos cristalinos y amorfos y especialmente en el procesamiento óptico de información, en electrónica molecular, en óptica y optoelectrónica integrada (C. Bräuchle, *Angewandte Chemie* (1992), 104(4), 431-435).

Para aplicar el método de formación espectral de huecos en el marco de la presente invención son de especial interés las matrices que contienen absorbentes de energía. Éstos absorben energía según su espectro de absorción y la ceden a su entorno local, siempre que no haya disponible ninguna otra vía de disipación de energía como por ejemplo la radiación fluorescente. Según la duración e intensidad de la irradiación la matriz polimérica envolvente se dilata por efecto del calor, se derrite, revienta o/y se altera por reacciones químicas. En este sentido se puede usar una matriz polimérica que contenga al menos un absorbente de energía, por ejemplo para encapsular el analito indicador o/y como capa de barrera que lo proteja de una reacción no deseada con el reactivo de detección del elemento diagnóstico.

Por descomposición o generación de huecos en la matriz polimérica mediante irradiación con una luz de longitud de onda adecuada - sobre todo de una longitud de onda que difiera en al menos 50 nm de la longitud de onda de medición del analito - el analito indicador se puede poner en contacto con el reactivo de detección en condiciones definidas y en cualquier momento, generando preferiblemente una señal óptica o electroquímicamente medible. Si la medición del analito tiene lugar, por ejemplo, en la región ultravioleta (es decir a una longitud de onda por debajo de 400 nm), sobre todo a una longitud de onda comprendida aproximadamente entre 150 nm y 400 nm, para excitar el absorbente de energía se puede irradiar por ejemplo con luz de longitud de onda > 400 nm, sobre todo con una luz de longitud de onda comprendida aproximadamente entre 450 nm y 800 nm.

En este sentido el método arriba descrito permite preparar en general sistemas de liberación controlada de reactivos en los cuales la liberación se puede realizar independientemente de otras reacciones que transcurran en el sistema y también permite controlar selectivamente el desarrollo de dichas reacciones. Por consiguiente, un sistema que comprenda un soporte con un reactivo en forma protegida, liberable en condiciones definidas, y un sistema reactivo separado de aquél, así como medios para liberar el reactivo sobre el soporte, se puede emplear por ejemplo como elemento de conmutación, especialmente en el marco de cascadas de reacción. La protección del reactivo antes de reaccionar con el sistema de reacción se puede obtener, en concreto, encapsulando el reactivo en una matriz disgregable, separando espacialmente el reactivo del sistema de reacción mediante una capa de barrera disgregable o/y usando grupos químicos protectores, tal como se describe detalladamente en el marco de la presente solicitud de patente.

En una forma de ejecución preferida la capa de detección, la capa de barrera o/y la capa de reserva del elemento de ensayo de la presente invención comprende pues una matriz polimérica que contiene al menos un absorbente de energía, con lo cual el analito indicador puede protegerse de un contacto directo con el reactivo de detección antes de irradiar el elemento diagnóstico con luz de longitud de onda adecuada, tal como se ha definido anteriormente. Según la presente invención la matriz polimérica que contiene el absorbente de energía puede estar concretamente incluida en la capa de detección del elemento diagnóstico aquí descrito o en forma de capa separada, por ejemplo como capa de barrera. En la presente invención el espesor de esta capa de barrera está comprendido en el intervalo de 0,05 µm hasta 5 µm, preferiblemente de 1 µm hasta 3 µm. Cuando la matriz polimérica no es una capa de barrera para separar de la capa de detección, por ejemplo, un analito indicador que no lleva ningún grupo químico protector,

entonces la matriz polimérica, además del absorbente de energía, contiene también preferiblemente el analito indicador, el cual según una variante especialmente preferida de la presente invención está encapsulado en la matriz polimérica.

5 La matriz polimérica está formada preferiblemente por al menos un polímero hidrófobo que impide la aparición de una disolución incipiente del analito indicador en caso de contacto del elemento diagnóstico con la humedad. En concreto se trata de un polímero orgánico hidrófobo que favorece la formación térmica de huecos y es estable a temperaturas de 5°C hasta 50°C, es decir que no muestra signos de descomposición. Como polímero adecuado para formar una matriz polimérica en el sentido de la presente invención se puede utilizar en principio cualquier polímero hidrófobo que no sea soluble en o mediante agua. La matriz polimérica arriba descrita está formada con especial preferencia por un polímero hidrófobo escogido del grupo constituido por un poli(metacrilato de metilo) (PMMA), un poli(metacrilato de etilo) (PEMA), un policarbonato y derivados químicos de los mismos, pero también se pueden emplear otros polímeros hidrófobos conocidos del especialista.

15 Según la presente invención el absorbente de energía contenido como mínimo en la matriz polimérica puede estar en distintas formas, por ejemplo unido covalentemente o/y en forma libre, prefiriéndose una unión covalente del absorbente de energía dentro de la matriz polimérica. Cuando la matriz polimérica contiene el absorbente de energía unido covalentemente, éste es preferiblemente un componente directo del polímero hidrófobo y sobre todo está integrado en su cadena polimérica, lo cual se puede lograr mediante la polimerización de monómeros adecuados del absorbente de energía. De este modo se puede asegurar que, independientemente de la solubilidad del absorbente de energía seleccionado en una disolución de polímero utilizada para preparar la matriz polimérica, haya una gran cantidad de moléculas del absorbente de energía en la matriz polimérica resultante, lo cual permite absorber mucha energía y por tanto favorece que la matriz polimérica se descomponga para liberar el analito indicador. En cambio, si el absorbente de energía está en forma libre o no unida dentro de la matriz polimérica, es decir una matriz polimérica dotada con el absorbente de energía, esto se puede conseguir mezclando simplemente precursores adecuados del polímero con el absorbente de energía y polimerizando a continuación la mezcla.

Como absorbente de energía contenido en la matriz polimérica se puede usar, según las respectivas exigencias, cualquier absorbente de energía que ceda en su entorno local, al menos parcialmente, la energía absorbida por radiación y produzca con ello una alteración de la matriz polimérica. Para favorecer la formación de huecos la matriz polimérica o/y el polímero hidrófobo, además de al menos un absorbente de energía, puede contener compuestos o grupos funcionales térmicamente inestables que por aporte apropiado de calor desprendan compuestos volátiles como por ejemplo nitrógeno, dióxido de carbono u otros compuestos gaseosos a temperatura ambiente. Ejemplos de tales compuestos o grupos funcionales son en concreto los derivados azoicos, los derivados del dióxido de carbono y los alquenos cíclicos, aunque no están limitados a ellos.

El absorbente de energía empleado en la presente invención es preferentemente un colorante hidrófobo que tiene preferiblemente una gran solubilidad en la matriz polimérica o/y emite muy poca o ninguna radiación fluorescente tras la excitación y por lo tanto posee un rendimiento cuántico bajo o, sobre todo, nulo. En el marco de la presente invención se usan con mayor preferencia colorantes hidrófobos que tienen una absorción nula o baja a la longitud de onda de la auténtica medición del analito (por ejemplo a  $\lambda = 375 \text{ nm}$ ), pero que a longitudes de onda ortogonales (p.ej. a  $\lambda > 500 \text{ nm}$ ) poseen elevados coeficientes de extinción, evitando así el peligro de una liberación indeseada del analito indicador durante la medición auténtica. En este sentido han resultado especialmente convenientes los colorantes de cianina tales como p.ej. criptocianina, indotricarbocianina (C7), oxacarbocianina (C3), yoduro de pinacianol, tiacarbocianina (C3), tiadicarbocianina (C5) o colorantes de escuarilio, p.ej. el colorante de escuarilio III.

En otra variante de la presente invención el analito indicador existente en una forma liberable, inaccesible para la reacción con el reactivo de detección, lleva un grupo protector fotométrico o/y electroquímicamente dissociable que en caso necesario se puede separar liberando el analito indicador en unas condiciones definidas. Como ejemplos de grupos protectores fotométricamente dissociables que se pueden usar por ejemplo para modificar glucosa cabe citar en concreto derivados de antraquinona, derivados de ácido benzoico, derivados de cumarina, derivados de nitrobenzofenona, derivados de tioxanteno, derivados de tioxantenona, derivados de xanteno y derivados de veratrilol, aunque no están limitados a ellos. Como ejemplos de grupos protectores electroquímicamente dissociables que se pueden usar en el marco de la presente invención cabe citar entre otros los derivados de antrona. En T.W. Greene, "Protecting Groups in Organic Synthesis", 2ª edición, John Wiley and Sons, Nueva York, 1991, se encuentra un resumen general de grupos protectores empleados en síntesis orgánica.

La liberación del analito indicador tiene lugar preferiblemente según la presente invención antes o después de la reacción del reactivo de detección con el analito contenido en la muestra. Como inmediatamente (p.ej. dentro de los primeros segundos) después de humectar el elemento diagnóstico con la muestra del analito aún no se produce ninguna reacción del reactivo de detección con el analito buscado y por tanto puede tener lugar sin perturbaciones una reacción con el analito indicador presente en cantidad definida, aproximadamente un segundo después de la humectación del elemento diagnóstico se observa la reacción inicial del analito disuelto en la muestra. Entonces, desde el inicio de la reacción del analito contenido en la muestra hasta su completa transformación no es deseable una liberación del analito indicador en el elemento diagnóstico, porque en general no se puede distinguir entre la señal producida por el analito de la muestra y la señal producida por el analito indicador. Por consiguiente resulta

ventajoso como alternativa no liberar el analito indicador hasta la completa transformación del analito de la muestra por el reactivo de detección y medir la señal generada en el marco de un control total del sistema.

5 En el marco de la presente invención se usan preferiblemente elementos diagnósticos sobre los cuales se pueda aplicar el analito en forma de una solución acuosa o no acuosa. En una forma de ejecución especialmente preferida el elemento diagnóstico es una cinta de ensayo, un disco de ensayo, una pastilla de ensayo, una tira de ensayo, una bobina de tiras de ensayo o los elementos diagnósticos citados en la patente WO 2005/084530 A2, los cuales se toman aquí expresamente como referencia. Los elementos diagnósticos descritos en la presente solicitud de patente comprenden al menos una zona de ensayo que se puede poner en contacto con la muestra que contiene el analito y  
10 que permiten determinarlo cualitativa o/y cuantitativamente con el uso de medios adecuados.

Tal como se emplea aquí el término "cinta de ensayo" designa un elemento diagnóstico en forma de cinta que suele llevar más de una zona individual de ensayo, preferiblemente 10 zonas individuales de ensayo como mínimo, con mayor preferencia 25 zonas individuales de ensayo como mínimo y sobre todo 50 zonas individuales de ensayo como mínimo. Las zonas individuales de ensayo están preferiblemente separadas entre sí por una distancia de hasta unos pocos centímetros, por ejemplo < 2,5 cm, y la cinta de ensayo puede incluir partes marcadas entre las sucesivas zonas de ensayo para registrar el recorrido de la cinta o/y para calibración. Este tipo de cintas de ensayo está descrito por ejemplo en la patente EP 1 739 432 A1, cuya revelación se asume expresamente como referencia.

20 Tal como se usa aquí el término "disco de ensayo" designa un elemento diagnóstico en forma de disco que puede tener una o más zonas individuales de ensayo, por ejemplo al menos 10 zonas individuales de ensayo. En una forma de ejecución el disco de ensayo va cubierto con una capa delgada del sistema químico de ensayo, sobre la cual se puede aplicar una muestra del analito de manera que, dependiendo del volumen de muestra, se moja una zona más o menos grande del disco, que se puede usar para la determinación del analito. La zona no humectada  
25 del disco de ensayo, que debido a la penetración de humedad a través de la capa del sistema químico de ensayo puede estar parcial o totalmente húmeda, queda por tanto disponible para posteriores determinaciones del analito.

Los elementos de ensayo de la presente invención se pueden usar para determinar cualquier sustancia biológica o química que pueda detectarse fotoquímica o electroquímicamente. El analito se escoge 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. El analito puede proceder de cualquier fuente, pero preferiblemente de un fluido corporal, incluyendo sin limitaciones sangre entera, plasma, suero, líquido linfático, líquido biliar, líquido cerebroespinal, líquido de tejido extracelular, orina, así como secreciones glandulares, como por ejemplo saliva o sudor. Mediante los elementos  
30 diagnósticos aquí descritos se determina preferentemente la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra de sangre entera, plasma, suero o líquido de tejido extracelular.

En una forma de ejecución preferida la presente invención prevé que los elementos diagnósticos aquí descritos estén formados para determinar varios analitos, de manera que el término "varios", tal como se usa aquí, significa cualquier número > 1, preferiblemente entre 2 y 10, con mayor preferencia entre 2 y 5, sobre todo 2 o 3. Cuando hay que determinar varios analitos contenidos en una sola o en distintas muestras mediante los elementos de ensayo de la presente invención, la determinación de los diferentes analitos puede tener lugar en principio en una misma zona de ensayo o en distintas zonas de ensayo; se considera ventajosa una determinación de varios analitos en una misma zona de ensayo. Para ello los elementos de ensayo de la presente invención pueden contener por ejemplo un reactivo de detección específico de cada analito analizado, así como una cantidad definida del correspondiente analito, y estar estructurados especialmente para la determinación sucesiva de cada analito, por ejemplo mediante la liberación en el elemento diagnóstico de los respectivos analitos indicadores de diferentes capas o/y en momentos distintos.

50 La determinación cualitativa o/y cuantitativa del analito se puede realizar por cualquier método. Para ello se pueden emplear en principio todos los métodos conocidos del estado técnico para la detección de reacciones enzimáticas que generan una señal medible que se puede valorar o leer manualmente o con medios adecuados. En el marco de la presente invención se usan preferiblemente métodos ópticos de detección, incluyendo por ejemplo la medición de la absorción, la fluorescencia, el dicroísmo circular (DC), la dispersión óptica rotatoria (DOR), la refractometría, etc., así como técnicas electroquímicas. Con especial preferencia el analito se detecta fotométrica o fluorométricamente, por ejemplo de manera indirecta mediante una alteración fluorométrica detectable del coenzima.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un aparato de medición analítico que comprende un elemento diagnóstico según la presente invención y que sirve para determinar cualitativa o/y cuantitativamente el analito. Como ejemplos de estos aparatos de medición analíticos cabe mencionar entre otros los productos comerciales Accu-Chek<sup>®</sup> Active, Accu-Chek<sup>®</sup> Compact y Accu-Chek<sup>®</sup> Mobile (todos de la firma Roche), pero no están limitados a ellos.

65 En otro aspecto más la presente invención se refiere a un método para determinar un analito que comprende las etapas siguientes:

- (a) poner en contacto el analito con un elemento diagnóstico de la presente invención, y
- (b) determinar la presencia o/y la cantidad del analito.

5 En otro aspecto más la presente invención se refiere a un método para corregir una señal generada por un analito, que comprende las etapas siguientes:

- (a) introducir un elemento diagnóstico de la presente invención en un aparato de medición analítico,
- (b) generar una primera señal detectable en el aparato de medición analítico poniendo en contacto el analito con el elemento diagnóstico,
- 10 (c) generar una segunda señal detectable en el aparato de medición analítico liberando el analito indicador en el elemento diagnóstico, y
- (d) corregir la señal generada en (b) con el uso de la señal generada en (c).

15 En el marco del método arriba descrito primero se introduce un elemento diagnóstico de la presente invención en un aparato de medición analítico, como por el ejemplo el descrito anteriormente. A continuación, el analito que debe determinarse se pone en contacto con el elemento diagnóstico, con lo cual el analito reacciona con su reactivo de detección específico y en el aparato de medición analítico se genera una primera señal detectable, preferiblemente óptica o electroquímica.

20 Para evaluar hasta qué punto la primera señal medida representa correctamente la concentración del analito en la muestra, en una etapa siguiente el analito indicador se libera en el elemento diagnóstico de su forma inaccesible a la reacción con el reactivo de detección, preferiblemente mediante métodos como los mencionados en relación con la descripción del elemento diagnóstico de la presente invención. Luego el analito indicador así liberado se puede poner en contacto con su reactivo de detección específico, con lo cual se genera en el aparato de medición analítico una segunda señal detectable, preferiblemente óptica o electroquímica, que suele ser más intensa que la primera señal medida debido a la detección simultánea del analito y del analito indicador liberado.

25 Usando medios apropiados, como por ejemplo una curva de calibración, la primera y la segunda señal de medición, detectadas preferiblemente mediante dos canales de medición distintos de un aparato medidor analítico adecuado, se pueden relacionar respectivamente con una determinada concentración del analito. Si la concentración del analito calculada a partir de la primera señal de medición no coincide con la concentración del analito calculada a partir de la segunda señal de medición, entonces la concentración del analito calculada a partir de la primera señal de medición se corrige con el resultado de la segunda medición, por ejemplo mediante un algoritmo adecuado. De este modo existe la posibilidad de minimizar las potenciales oscilaciones de los valores de medición - que pueden ser debidas entre otras cosas a factores ambientales (p.ej. temperatura, humedad del aire), a irregularidades durante la producción de los elementos diagnósticos o/y a la presencia de sustancias interferentes en la muestra - y mejorar por tanto la exactitud de la determinación analítica.

30 En otro aspecto más la presente invención se refiere a un método de comprobación de la óptica de detección de un aparato de medición analítico, que comprende las etapas siguientes:

- (a) introducción de un elemento diagnóstico de la presente invención en el aparato de medición analítico,
- (b) generación de una señal detectable en el aparato de medición analítico por liberación del analito indicador en el elemento diagnóstico, y
- 45 (c) correlación de la señal generada en (b) con una señal de referencia.

50 El método sirve especialmente para comprobar si la óptica de detección de un aparato de medición analítico está ensuciada. Después de introducir un elemento diagnóstico de la presente invención en el aparato de medición analítico y liberar el analito indicador en el elemento diagnóstico, por ejemplo mediante métodos como los citados en relación con la descripción del elemento diagnóstico de la presente invención, en el aparato de medición analítico se genera por reacción entre el analito indicador liberado y su reactivo de detección específico una señal definida - detectable preferiblemente de forma óptica o electroquímica - que se puede relacionar con una señal de referencia.

55 Cuando la óptica de detección del aparato de medición analítico está sucia, al reaccionar el analito indicador con el reactivo de detección se detecta una señal más débil que la señal de referencia y en consecuencia el usuario recibe un aviso, por ejemplo óptico o acústico, de la alteración del aparato de medición analítico y entonces puede rechazar el valor medido.

60 En otro aspecto más la presente invención se refiere a un sistema para controlar la liberación de un reactivo, que comprende

- (a) un soporte que lleva el reactivo y un sistema de reacción separado del reactivo, de modo que éste se halla en una forma inaccesible para reaccionar con el sistema de reacción, pero se puede liberar en unas condiciones definidas, y
- (b) medios para liberar el reactivo sobre el soporte.

65

En otro aspecto más la presente invención se refiere al uso de un sistema de liberación según presente invención como elemento de conmutación.

La presente invención se explica con mayor detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos:

- 5 Descripción de las figuras
- Figura 1: sección de una forma de ejecución de un elemento diagnóstico según la presente invención que consta de una capa de detección, una capa fotométrica de barrera separable, una capa de reserva que contiene el analito indicador y una capa soporte.
- 10 Figura 2: sección de una forma de ejecución alternativa de un elemento diagnóstico según la presente invención que consta de una capa de detección, una capa fotométrica de barrera separable que contiene el analito indicador y una capa soporte.
- 15 Figura 3: sección de la capa protectora de un elemento diagnóstico según la presente invención que contiene el analito indicador (en este caso glucosa) en forma encapsulada.
- Figura 4: sección de la capa de detección de un elemento diagnóstico según la presente invención que contiene el analito indicador (en este caso glucosa) en forma encapsulada.
- Figura 5: cinética de la reacción del analito indicador o del analito de la muestra mediante el sistema enzimático de un elemento diagnóstico según la presente invención.
- 20 5A: liberación del analito indicador antes del inicio de la reacción del analito de la muestra mediante el sistema enzimático.
- 5B: liberación del analito indicador tras el final de la reacción del analito de la muestra mediante el sistema enzimático.
- Figura 6: detección fluorimétrica del analito indicador mediante liberación fotométrica y la subsiguiente reacción enzimática.
- 25 6A: fluorescencia de un elemento diagnóstico, que contiene el analito indicador en forma modificada, irradiado con luz de longitud de onda adecuada antes y después de ponerlo en contacto con una solución de enzima (GlucDH) y coenzima (NAD).
- 6B: fluorescencia de un elemento diagnóstico que no contiene el analito indicador, en ausencia o en presencia de una solución de enzima (GlucDH) y coenzima (NAD).
- 30 Figura 7: detección fluorimétrica del analito indicador mediante formación térmica de huecos y la subsiguiente reacción enzimática.
- 7A: fotografía digital de una capa polimérica dotada de colorante (criptocianina) tras 20 minutos de irradiación con luz de longitud de onda adecuada.
- 35 7B: fotografía digital de una capa polimérica dotada de colorante (criptocianina) tras 20 minutos de irradiación con luz de longitud de onda adecuada y subsiguiente puesta en contacto con una solución de enzima (GlucDH) y coenzima (NAD).
- 7C: fotografía digital de una capa polimérica dotada de colorante (criptocianina) tras la puesta en contacto con una solución de enzima (GlucDH) y coenzima (NAD), sin irradiación previa.
- 40 Figura 8: representación de las secuencias de aminoácidos de los dobles mutantes de glucosa deshidrogenasa GlucDH\_E96G\_E170K y GlucDH\_E170K\_K252L.

## EJEMPLOS

45 Ejemplo 1: preparación y empleo de un elemento diagnóstico con analito indicador en forma modificada

Sobre una lámina soporte de Pokalon (de la firma Lonza) se aplicó conjuntamente glucosa modificada (derivado de tris-veratrilo) y poliacrilamida (de la firma Aldrich). A continuación el elemento de ensayo bicapa así obtenido se colocó sobre un aparato medidor de luminiscencia (de propia construcción de la firma Roche) y se irradió durante 2 minutos con luz de una longitud de onda de 375 nm. Entonces, para detectar la liberación de glucosa a partir del derivado de glucosa utilizado en el elemento de ensayo se aplicó una solución de 10 mg de glucosa deshidrogenasa (GlucDH, de la firma Roche) y 10 mg de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, de la firma Roche) en 10 ml de tampón de fosfato pH 7 (de la firma Merck) sobre el elemento diagnóstico y se hizo el seguimiento fluorimétrico de la formación de NADH (véase la figura 6A).

55 Como referencia se midieron respectivamente por fluorimetría las láminas de Pokalon vacías o en combinación con la solución de GlucDH y NAD arriba descrita (véase la figura 6B).

60 Ejemplo 2: preparación y empleo de un elemento diagnóstico con analito indicador libre y matriz polimérica dotada de colorante

Para elaborar un elemento diagnóstico con matriz polimérica dotada de colorante se prepararon dos disoluciones parciales 1 y 2 que tenían las siguientes composiciones:

Disolución parcial 1:

	Pesada (g)	Contenido de sólidos (%)	Sólidos (g)	% sobre sólidos totales
--	------------	--------------------------	-------------	-------------------------

## ES 2 544 984 T3

Disolución parcial 1	100,00			
PAA 1500 (poliacrilamida)	60,00	50	30,00	33,33
Glucosa	40,00	100	40,00	44,44

Disolución parcial 2:

	Pesada (g)	Contenido de sólidos (%)	Sólidos (g)	% sobre sólidos totales
Disolución parcial 2	4,41			
PEMA al 10% en cloroformo	4,00	10	0,4	49,57
Criptocianina	0,11	100	0,107	13,26
Azo-bis(ciclohexil)- carbodiimida	0,30	100	0,30	37,17

- 5 Una vez preparadas ambas disoluciones parciales se creó una capa de glucosa aplicando con cuchilla disolución parcial 1 (30 µm de espesor de capa húmeda) y secando a continuación. Sobre la capa seca resultante que contenía el analito indicador se aplicó seguidamente con cuchilla disolución parcial 2 (60 µm de espesor de capa húmeda) y se secó.
- 10 La capa polimérica dotada de colorante así obtenida se irradió con un láser manual (longitud de onda 650 nm, < 5 vatios) y al cabo de unos 20 minutos se pudieron observar huecos en la capa irradiada (véase figura 7A). En los huecos producidos por la radiación se aplicó a continuación una solución de 10 mg de glucosa deshidrogenasa (GlucDH, de la firma Roche) y 10 mg de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, de la firma Roche) en 10 ml de tampón de fosfato pH 7 (de la firma Merck), con lo cual la glucosa liberada de la capa inferior se oxidó por reacción
- 15 con el sistema enzimático formándose NADH fluorescente de color azul verdoso (véase figura 7B).

Como referencia, la solución anterior de glucosa deshidrogenasa (GlucDH) y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en tampón de fosfato pH 7 se aplicó sobre la última capa, sin irradiación previa de la capa polimérica dotada de colorante. En este caso, por falta de formación de huecos inducida térmicamente no se liberó glucosa de la capa inferior y no se formó NADH (véase figura 7C).

20

### LISTA DE SECUENCIAS

- 25 <110> F. Hoffmann - La Roche AG Roche Diagnostics GmbH  
 <120> Detección de la descomposición de enzimas en un elemento de ensayo mediante la liberación controlada de un analito protegido  
 <130> 43826P WO  
 <150> EP 09 179 500.5  
 <151> 2009-12-16
- 30 <160> 2  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 261  
 <212> PRT
- 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Mutante de glucosa deshidrogenasa procedente de Bacillus subtilis  
 <220>  
 <221> MUTÁGENO
- 40 <222> (96)..(96)  
 <220>  
 <221> MUTÁGENO  
 <222> (170)..(170)  
 <400> 1

ES 2 544 984 T3

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala  
1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala  
20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val  
35 40 45

Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly  
50 55 60

Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile  
65 70 75 80

Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Gly  
85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val  
100 105 110

Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile  
115 120 125

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser  
130 135 140

Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala  
145 150 155 160

Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr  
165 170 175

Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn  
180 185 190

Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp  
195 200 205

Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile  
210 215 220

Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr  
225 230 235 240

Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Lys Tyr Pro Ser Phe  
245 250 255

Gln Ala Gly Arg Gly  
260

ES 2 544 984 T3

<210> 2  
<211> 261  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5 <220>  
<223> Mutante de glucosa deshidrogenasa procedente de Bacillus subtilis  
<220>  
<221> MUTÁGENO  
10 <222> (170)..(170)  
<220>  
<221> MUTÁGENO  
<222> (252)..(252)  
<400> 2

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala  
1 5 10 15

15 Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala  
20 25 30

ES 2 544 984 T3

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val  
 35 40 45

Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly  
 50 55 60

Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile  
 65 70 75 80

Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu  
 85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val  
 100 105 110

Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile  
 115 120 125

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser  
 130 135 140

Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala  
 145 150 155 160

Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr  
 165 170 175

Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn  
 180 185 190

Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp  
 195 200 205

Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile  
 210 215 220

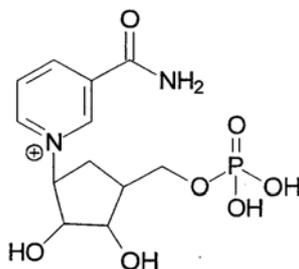
Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr  
 225 230 235 240

Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Leu Tyr Pro Ser Phe  
 245 250 255

Gln Ala Gly Arg Gly  
 260

## REIVINDICACIONES

1. Elemento diagnóstico para determinar al menos un analito, que comprende  
 (a) un reactivo de detección específico del analito, y  
 (b) una cantidad definida del analito buscado (analito indicador), el cual se encuentra en una forma inaccesible, pero liberable, para reaccionar con el reactivo de detección.
2. Elemento diagnóstico según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo de detección comprende un enzima o/y un coenzima, siendo el enzima preferentemente una deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP/NADPH), sobre todo una glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) o una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) o/y el coenzima un compuesto estabilizado de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD/NADH) o de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP/NADPH), sobre todo carbaNAD o carbaNADP, o un compuesto de la fórmula (I)



(I)

3. Elemento diagnóstico según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el reactivo de detección incluye además un mediador o/y un indicador óptico, o/y porque el analito indicador lleva un grupo protector fotoquímica o/y electroquímicamente disociable.
4. Elemento diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende una capa soporte y una capa de detección que contiene el reactivo detector, o/y está estructurado para la determinación de varios analitos.
5. Elemento diagnóstico según la reivindicación 4, caracterizado porque contiene el analito indicador en la capa de detección o en una capa de reserva separada de aquella, de manera que entre la capa de reserva y la capa de detección hay preferiblemente una capa de barrera disgregable.
6. Elemento diagnóstico según la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque la capa de detección, la capa de barrera o/y la capa de reserva comprende una matriz polimérica que contiene al menos un absorbente de energía, el cual es preferiblemente un colorante hidrófobo escogido entre los colorantes de cianina, sobre todo criptocianina, indotricarbocianina (C7), oxacarbocianina (C3), yoduro de pinacianol, tiacarbocianina (C3), tiadcarbocianina (C5) y un colorante de escurililo, en particular el colorante de escurililo III.
7. Elemento diagnóstico según la reivindicación 6, caracterizado porque la matriz polimérica está formada por al menos un polímero hidrófobo, seleccionado en concreto del grupo constituido por un poli(metacrilato de metilo), un poli(metacrilato de etilo), un policarbonato y derivados químicos de los mismos, o/y porque contiene al menos un absorbente de energía unido covalentemente o/y en forma libre.
8. Elemento diagnóstico según la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque el analito indicador se encuentra encapsulado en la matriz polimérica.
9. Elemento diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque está configurado como cinta de ensayo, disco de ensayo, pastilla de ensayo, tira de ensayo o bobina de tiras de ensayo.
10. Aparato de medición analítico que lleva un elemento diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Método para determinar un analito que comprende las siguientes etapas:  
 (a) poner en contacto el analito con un elemento diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 9, y  
 (b) determinar la presencia o/y la cantidad del analito.
12. Método para corregir una señal generada por un analito, que comprende las siguientes etapas:

- (a) introducir un elemento diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 hasta 9 en un aparato de medición analítico,  
(b) generar una primera señal detectable en el aparato de medición analítico poniendo en contacto el analito con el elemento diagnóstico,  
5 (c) generar una segunda señal detectable en el aparato de medición analítico liberando el analito indicador en el elemento diagnóstico, y  
(d) corregir la señal generada en (b) con el uso de la señal generada en (c).
13. Método para comprobar la óptica de detección de un aparato de medición analítico, que incluye las etapas  
10 siguientes:
- (a) introducción de un elemento diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 9 en el aparato de medición analítico,  
(b) generación de una señal detectable en el aparato de medición analítico por liberación del analito indicador en  
15 el elemento diagnóstico, y  
(c) correlación de la señal generada en (b) con una señal de referencia.
14. Sistema de liberación controlada de un reactivo para la detección específica de un analito, que comprende  
20 (a) un soporte que lleva el reactivo y un sistema de reacción separado del reactivo, de modo que éste se halla en una forma inaccesible para reaccionar con el sistema de reacción, pero se puede liberar en unas condiciones definidas,  
(b) medios para liberar el reactivo sobre el soporte.
15. Sistema según la reivindicación 14, caracterizado porque el reactivo se halla encapsulado en una matriz disgregable y está separado del sistema de reacción por una capa de barrera disgregable o/y lleva un grupo químico protector.  
25
16. Uso de un sistema según la reivindicación 14 o 15 como elemento de conmutación.

Figura 1

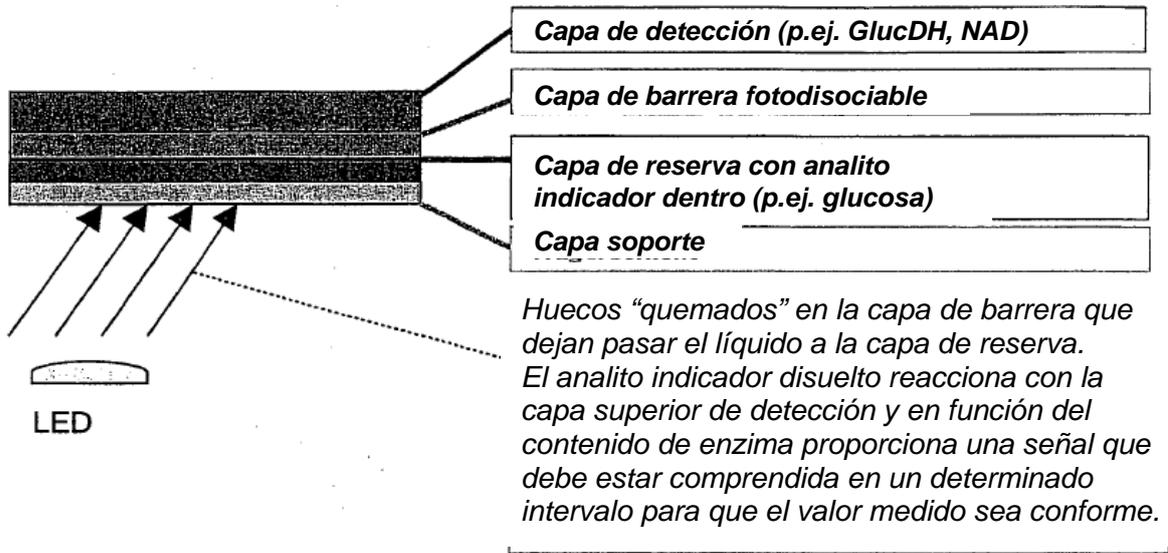


Figura 2

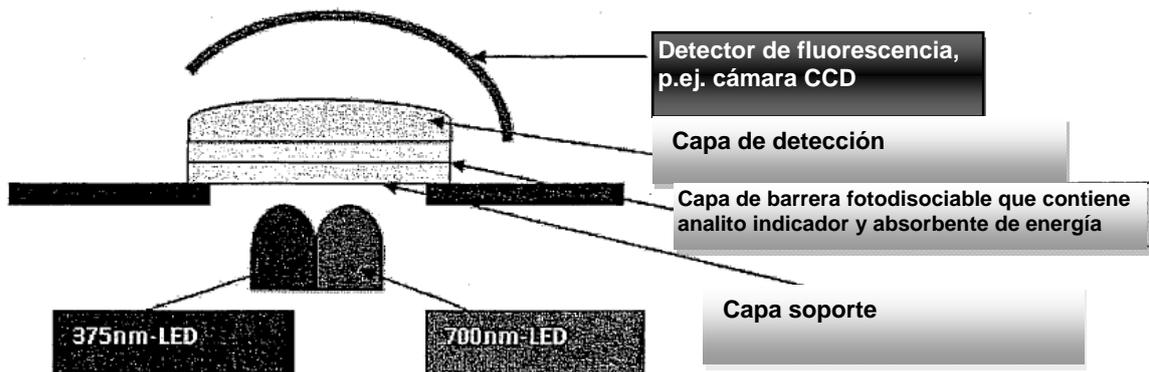


Figura 3

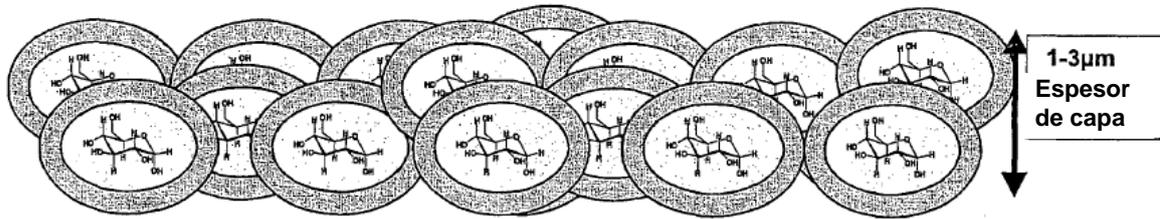


Figura 4

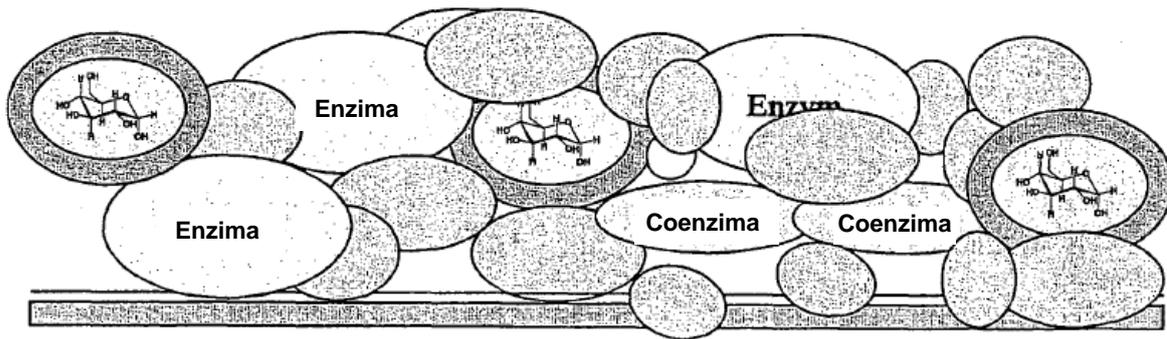
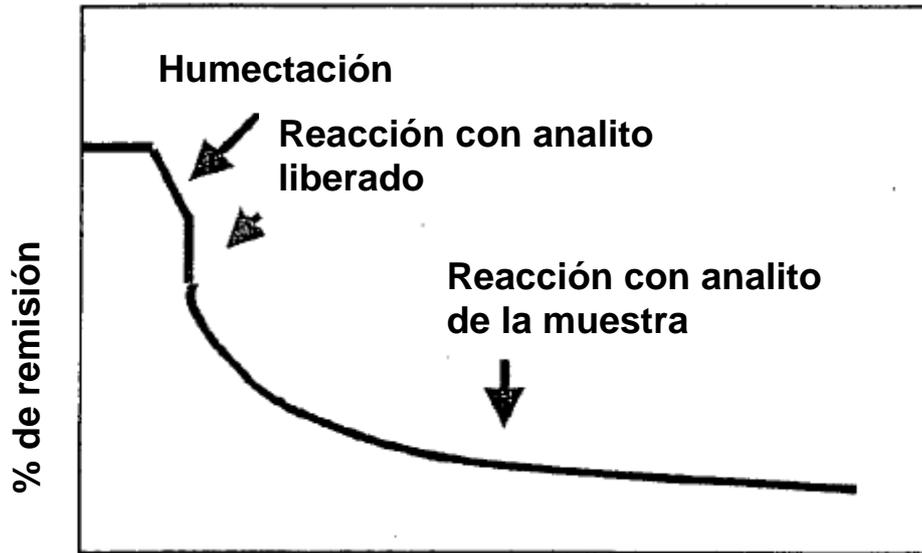


Figura 5

5A



5B

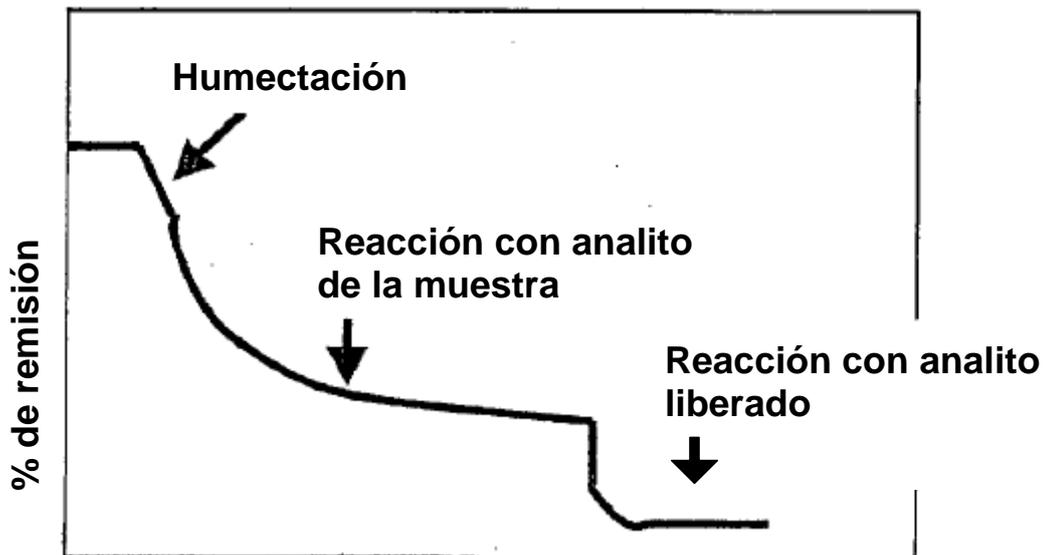
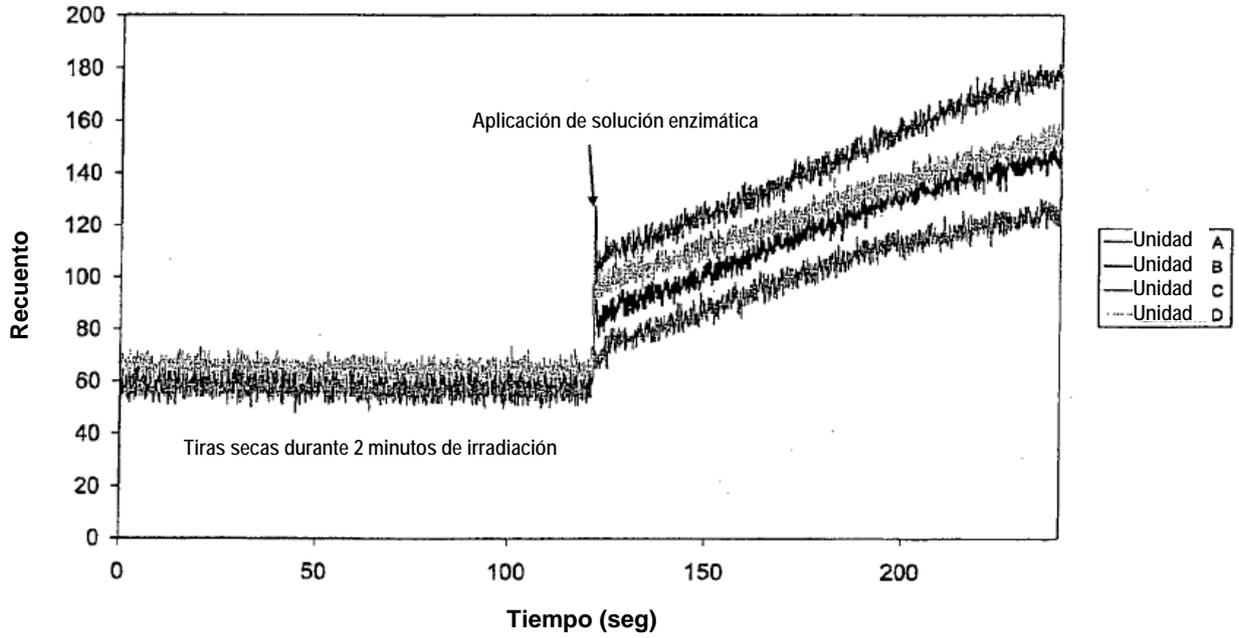


Figura 6

6A



6B

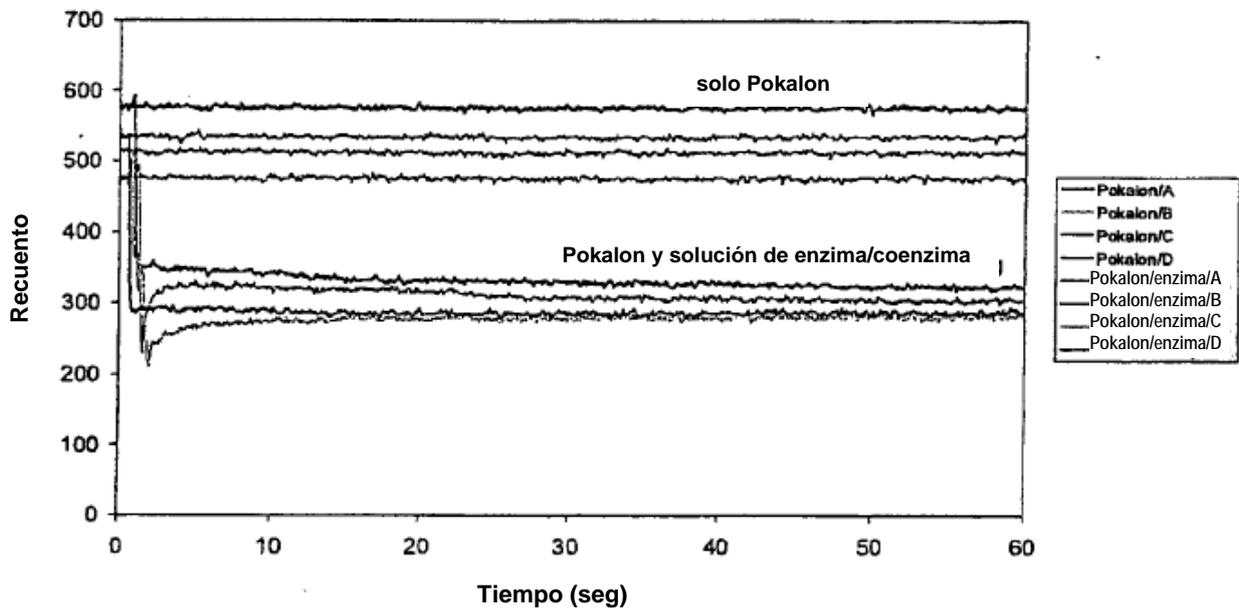
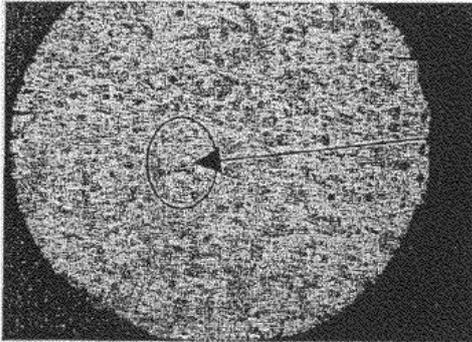


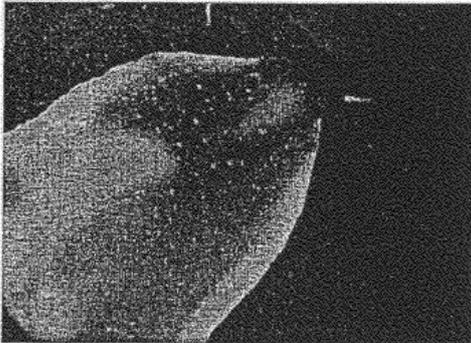
Figura 7

7A



Pequeña mancha clara en el recubrimiento azul claro = material eliminado por combustión

7B



7C

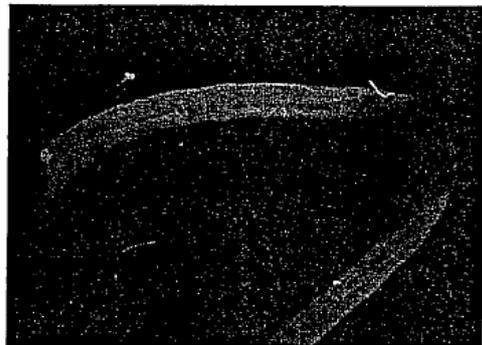


Figura 8

GlucDH\_E96G\_E170K

M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R F G K E  
 Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I K A G G E A V  
 V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I K E F G T L D I M I  
 N N A G L G N P V P S H E M P L K D W D K V I G T N L T G A  
 F L G S R E A I K Y F V E N D I K G N V I N M S S V H E V I  
 P W P L F V H Y A A S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G  
 I R V N N I G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E  
 S M I P M G Y I G E P E E I A V A V W L A S K E S S Y V T  
 G I T L F A D G G M T K Y P S F Q A G R G

GlucDH\_E170K\_K252L

M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R F G K E  
 Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I K A G G E A V  
 V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I K E F G T L D I M I  
 N N A G L E N P V P S H E M P L K D W D K V I G T N L T G A  
 F L G S R E A I K Y F V E N D I K G N V I N M S S V H E V I  
 P W P L F V H Y A A S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G  
 I R V N N I G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E  
 S M I P M G Y I G E P E E I A V A V W L A S K E S S Y V T  
 G I T L F A D G G M T L Y P S F Q A G R G