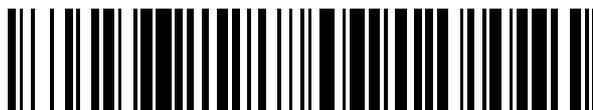


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 801**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

C07D 265/38 (2006.01)

C07D 279/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2008 PCT/US2008/085810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2009 WO09076268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008 E 08860408 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2229590**

54 Título: **Proceso de fabricación de un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o de 3-fenilimino-3H-fenoxazina**

30 Prioridad:
10.12.2007 US 7178

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2019

73 Titular/es:
**ASCENSIA DIABETES CARE HOLDINGS AG
(100.0%)
Peter-Merian Strasse 90
4052 Basel, CH**

72 Inventor/es:
**MARFURT, KAREN, L. y
ARNDT, HENRY, C.**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 711 801 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

Proceso de fabricación de un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o de 3-fenilimino-3H-fenoxazina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a un procedimiento de formación de un mediador. Más específicamente, la presente invención se refiere en general a un procedimiento de formación de un mediador para su utilización en un sensor de análisis electroquímico que está adaptado para ayudar a determinar información relacionada con un analito.

10

Antecedentes de la invención

La determinación cuantitativa de analitos en fluidos corporales es de gran importancia en el diagnóstico y el mantenimiento de determinadas condiciones físicas. Por ejemplo, en determinados individuos deben supervisarse el lactato, el colesterol y la bilirrubina. En particular, es importante que los individuos con diabetes comprueben con frecuencia el nivel de glucosa en sus fluidos corporales para regular la ingesta de glucosa en sus dietas. Los resultados de dichos análisis pueden usarse para determinar, si es necesario, qué insulina, u otra medicación, debe administrarse. En un tipo de sistema de análisis de glucosa en la sangre, los sensores de análisis se utilizan para analizar una muestra de sangre.

15
20

Un sensor de análisis contiene material de biodetección o reactivo que reacciona con, por ejemplo, la glucosa de la sangre. Un tipo de sensor de análisis electroquímico es un sensor de análisis multicapa que incluye una base o un sustrato y una cubierta. Otro tipo de sensor de análisis electroquímico incluye una base, un espaciador y una cubierta. Los sensores de análisis electroquímicos existentes incluyen al menos dos electrodos en forma de patrón de electrodo. Se aplica un potencial a través de estos electrodos y se mide una corriente en el electrodo de trabajo. La medición de la corriente es directamente proporcional al tamaño del electrodo de trabajo.

25

Los sensores de análisis electroquímicos se basan en reacciones químicas catalizadas por enzimas que involucran el analito de interés. En caso de realizar un seguimiento de la glucosa, la reacción química relevante es la oxidación de la glucosa a gluconolactona o su ácido correspondiente. Esta oxidación está catalizada por una diversidad de enzimas, algunas de las cuales pueden utilizar coenzimas tales como (fosfato de) nicotinamida adenina dinucleótido (NAD(P)), mientras que otras pueden utilizar coenzimas tales como flavina adenina dinucleótido (FAD) o pirroloquinolina quinona (PQQ).

30
35

En las aplicaciones de sensores de análisis, los equivalentes rédox generados en el transcurso de la oxidación de la glucosa se transportan a la superficie de un electrodo, generándose una señal eléctrica. La magnitud de la señal eléctrica se correlaciona después con la concentración de glucosa. La transferencia de equivalentes rédox del sitio de reacción química de la enzima a la superficie del electrodo se realiza mediante mediadores de transferencia de electrones.

40

Muchos mediadores tales como, por ejemplo, el ferricianuro tienen una corriente de fondo elevada, de forma que la relación señal-ruido cuando se formula en un sensor de análisis de glucosa es baja. Típicamente, una relación señal-ruido baja tiene como consecuencia una mayor imprecisión en el análisis, particularmente a niveles más bajos de glucosa y niveles de muestra de hematocrito elevados. Con análisis de muestra más rápidos (por ejemplo, tiempos de análisis inferiores a 10 segundos), puede ser difícil eliminar la elevada corriente de fondo en el tiempo asignado para realizar el análisis. Debido a los tiempos de análisis de muestra más rápidos, esto requiere que los ingredientes activos interactúen rápidamente cuando la muestra se aplica para dar una respuesta rápida.

45

Por lo tanto, sería deseable formar un mediador que tenga una corriente de fondo baja, y que simultáneamente posea aún otros atributos deseables de un mediador, incluyendo estabilidad.

50

En la técnica anterior, la reacción de fenotiazina y una anilina es la ruta más práctica para formar un derivado de 3-fenilimino-3H-fenotiazina, al igual que la divulgación en Journal of Heterocyclic Chemistry, vol. 28, 1991, páginas 295-299, así como los documentos EP 0177317A y EP0775699A. Sin embargo, estos procedimientos de la técnica anterior no son aún suficientes para lograr obtener un mediador satisfactorio con una corriente de fondo reducida y una buena estabilidad.

55

Sumario de la invención

60

A fin de lograr el objetivo de la presente invención, se proporciona un procedimiento de formación de un mediador tal como se describe en nuestra reivindicación 1.

65

En las reivindicaciones dependientes se describen algunas formas de realización ventajosas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1a es un sensor de análisis según una forma de realización.

5 La figura 1b es una vista lateral del sensor de análisis de la figura 1a.

La figura 2 es un gráfico de la corriente de fondo frente a varios lotes de mediadores de la invención y comparativos.

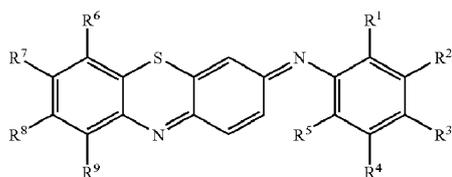
10 La figura 3a es un gráfico de la corriente de fondo utilizando varios procesos de neutralización o de tamponamiento y algunos procesos sin neutralización ni tamponamiento.

La figura 3b es un gráfico de cambio en la corriente de fondo entre una línea de base y la corriente de fondo medida en la figura 3a.

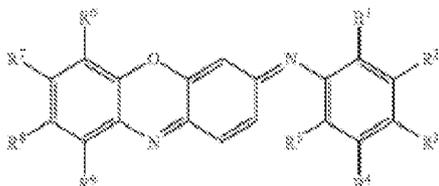
15 Descripción detallada de formas de realización ilustradas

En un proceso, la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para producir un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina de corriente de fondo reducida. En otro proceso, la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para estabilizar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina de corriente de fondo reducida. Los mediadores de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o los mediadores de 3-fenilimino-3H-fenoxazina son mediadores útiles para sensores de análisis electroquímicos y en un ejemplo son útiles en la regeneración electroquímica (oxidación) de NADH.

25 Los mediadores que se van a formar en la presente invención incluyen fenotiazinas que tienen la fórmula



y fenoxazinas que tienen la fórmula



30 en las que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, resto cíclico, resto heterocíclico, halógeno, haloalquilo, carboxi, carboxialquilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, resto ceto aromático, resto ceto alifático, alcoxi, ariloxi, nitro, dialquilamino, aminoalquilo, sulfo, dihidroxiboro y combinaciones de los mismos. Se contempla que también se puedan formar isómeros de los mismos.

35 El mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina está adaptado para su utilización con sensores de análisis electroquímicos. Los sensores de análisis electroquímicos están adaptados para recibir una muestra de fluido y analizarla utilizando un instrumento o medidor. El sensor de análisis ayuda a determinar la información relacionada con los analitos, tal como las concentraciones de analito. Los analitos que pueden medirse incluyen glucosa, colesterol, perfiles lipídicos, microalbúmina, urea, creatinina, creatina, fructosa, lactato o bilirrubina. Se contempla que se puedan determinar otras concentraciones de analito. Los analitos pueden encontrarse en, por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de suero sanguíneo, una muestra de plasma sanguíneo, otros fluidos corporales tales como ISF (líquido intersticial) y orina, y fluidos no corporales.

40 Los sensores de análisis descritos en el presente documento son sensores de análisis electroquímicos. Los medidores utilizados con los sensores de análisis electroquímicos pueden tener aspectos ópticos para detectar la información de calibración y aspectos electroquímicos para determinar la información relacionada con el analito (por ejemplo, la concentración de analito en la muestra de fluido). Un ejemplo no limitante de un sensor de análisis electroquímico se muestra en la figura 1a. La figura 1a representa un sensor de análisis 10 que incluye una base 11, un canal capilar y una pluralidad de electrodos 16 y 18. Una región 12 muestra un área que define el canal capilar (por ejemplo, después de disponer una cubierta sobre la base 11). La pluralidad de electrodos incluye un contraelectrodo 16 y un electrodo de trabajo (de medición) 18. El sensor de análisis electroquímico también puede
45 contener al menos tres electrodos, tales como un electrodo de trabajo, un contraelectrodo, un electrodo de disparo o

un electrodo de hematocrito. El electrodo de trabajo que se emplea en sensores electroquímicos según las formas de realización de la presente invención puede variar, con electrodos adecuados que incluyen, pero sin limitación, carbono, platino, paladio, oro, rutenio, rodio y combinaciones de los mismos.

5 Los electrodos 16, 18 están acoplados a una pluralidad de cables conductores 15a, b, que, en la forma de realización ilustrada, terminan con áreas más grandes denominadas contactos del sensor de análisis 14a, b. El canal capilar generalmente se ubica en un área de recepción de fluido 19. Se contempla que se puedan emplear otros sensores de análisis electroquímicos con los mediadores de la presente invención.

10 El área de recepción de fluido 19 incluye al menos un reactivo para convertir el analito de interés (por ejemplo, glucosa) presente en la muestra de fluido (por ejemplo, sangre) en una especie química que se puede medir electroquímicamente, en términos de la corriente eléctrica que produce, mediante los componentes del patrón de electrodo. El reactivo típicamente incluye una enzima específica de analito que reacciona con el analito y con un aceptor de electrones para producir una especie medible electroquímicamente que puede detectarse por medio de los electrodos. El reactivo incluye un mediador que ayuda a transferir electrones entre el analito y los electrodos. El reactivo puede incluir aglutinantes que mantienen la enzima y el mediador juntos, otros ingredientes inertes o combinaciones de los mismos.

20 Se puede aplicar una muestra de fluido (por ejemplo, sangre) al área de recepción de fluido 19. La muestra de fluido reacciona con el, al menos un, reactivo. Después de reaccionar con el reactivo y junto con la pluralidad de electrodos, la muestra de fluido produce señales eléctricas que ayudan a determinar la concentración del analito. Los cables conductores 15a, b llevan la señal eléctrica de vuelta hacia un segundo extremo opuesto 42 del sensor de análisis 10, en el que los contactos del sensor de análisis 14a, b transfieren las señales eléctricas al medidor.

25 Con referencia a la figura 1b, se muestra una vista lateral del sensor de análisis 10 de la figura 1a. Tal como se muestra en la figura 1b, el sensor de análisis 10 de la figura 1b incluye además una cubierta 20 y un espaciador 22. La base 11, la cubierta 20 y el espaciador 22 pueden estar fabricados de una diversidad de materiales tales como materiales poliméricos. Los ejemplos no limitantes de materiales poliméricos que se pueden utilizar para formar la base 11, la cubierta 20 y el espaciador 22 incluyen policarbonato, poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(naftalato de etileno) (PEN), poliimida y combinaciones de los mismos. Se contempla que se puedan utilizar otros materiales para formar la base 11, la cubierta 20 y/o el espaciador 22.

35 Para formar el sensor de análisis 10 de las figuras 1a, 1b, la base 11, el espaciador 22 y la cubierta 20 se unen, por ejemplo, por medio de un adhesivo o termosellado. Cuando la base 11, la cubierta 20 y el espaciador 22 están unidos, se forma el área de recepción de fluido 19. El área de recepción de fluido 19 proporciona una vía de flujo para introducir la muestra de fluido en el sensor de análisis 10. El área de recepción de fluido 19 se forma en un primer extremo o extremo de análisis 40 del sensor de análisis 10. Los sensores de análisis de las formas de realización de la presente invención pueden formarse con una base y una cubierta en ausencia de un espaciador, formándose el área de recepción de fluido directamente en la base y/o la cubierta.

40 También se contempla que el sensor de análisis electroquímico pueda formarse en ausencia de un espaciador. Por ejemplo, el sensor de análisis electroquímico puede incluir una base y una cubierta de modo que se forme un canal (por ejemplo, un canal capilar) cuando la base y la cubierta están unidas entre sí.

45 La base, el espaciador y la cubierta pueden estar fabricados de una diversidad de materiales tales como materiales poliméricos. Los ejemplos no limitantes de materiales poliméricos que se pueden utilizar para formar la base, el espaciador y la cubierta incluyen policarbonato, poli(tereftalato de etileno) (PET), poliestireno, poliimida y combinaciones de los mismos. Se contempla que la base, el espaciador y la cubierta puedan estar fabricados independientemente de otros materiales. El patrón de electrodo puede estar fabricado de una diversidad de materiales conductores que incluyen, pero sin limitación, oro, platino, rodio, paladio, rutenio, carbono o combinaciones de los mismos.

55 En otra forma de realización, el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-feniliminio-3H-fenoxazina se puede utilizar en un sensor de análisis óptico. El mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-feniliminio-3H-fenoxazina sería un mediador estable en dicho sistema.

60 En un procedimiento, se forma un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina e incluye proporcionar un primer reactivo que incluye fenotiazina. Se proporciona un primer disolvente en el que la fenotiazina tenga una solubilidad deseada. Se proporciona un segundo reactivo para ayudar a formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina. Se proporciona un segundo disolvente en el que el segundo reactivo tenga una solubilidad deseada. El primer reactivo y el primer disolvente se combinan entre sí para formar una primera solución de reactivo. El segundo reactivo y el segundo disolvente se combinan entre sí para formar una segunda solución de reactivo. La primera y la segunda soluciones de reactivo se combinan entre sí para formar una solución de reactivos. Se prepara una solución de persulfato de sodio y se añade a la solución de reactivos. La solución de persulfato de sodio se forma típicamente utilizando el segundo disolvente (el mismo disolvente que se utiliza en la formación de la segunda solución de

reactivo). El persulfato de sodio provoca el acoplamiento de los primer y segundo reactivos, dando como resultado una solución de reacción con el producto formado.

5 En este procedimiento, se produce un procesamiento adicional de la solución de reacción para aislar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina. En una forma de realización, el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina se encuentra en forma de una sal. En otra forma de realización, el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina se encuentra en forma de un ácido. Algunos mediadores de 3-fenilimino-3H-fenotiazina pueden no encontrarse en forma de sal ni de ácido.

10 Se selecciona un segundo reactivo para formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina deseado. Por ejemplo, el segundo reactivo puede ser ácido anilina-2,5-disulfónico. Cuando se usa ácido anilina-2,5-disulfónico, el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina específico formado es el mediador (3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina.

15 Se contempla que puedan utilizarse otros segundos reactivos para formar diferentes mediadores de 3-fenilimino-3H-fenotiazina. Por ejemplo, el segundo reactivo para formar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina se puede seleccionar de entre los siguientes: 4-dietilaminoanilina; 4-cloroanilina; 4-etilanilina; 4-trifluorometilanilina; 4-aminobenzoato de metilo; 4-nitroanilina; 4-metoxianilina; ácido 4-(4'-aminofenil)butírico; 4-aminobencilamina; 4-(2'-aminoetil)anilina; ácido 5-amino-1,3-bencenodicarboxílico; ácido 4-aminobenzoico; 2,5-(4'-aminofenil)-1,3,4-oxadiazol; 4-[2'-(2'-etanoxi)etoxi]etoxianilina y 2,5-disulfoanilina. Se contempla que pueden usarse otros segundos reactivos para formar otros mediadores de 3-fenilimino-3H-fenotiazina.

20 Se selecciona un primer disolvente que sea compatible con el primer reactivo. Es deseable que el primer reactivo tenga una solubilidad generalmente alta en el primer disolvente. En un procedimiento, el primer disolvente es tetrahidrofurano (THF). El primer disolvente es, de forma deseable, tetrahidrofurano (THF) debido a que la fenotiazina tiene una solubilidad generalmente alta en el mismo. El primer disolvente también es, de forma deseable, miscible con el segundo disolvente a fin de formar una solución generalmente o sustancialmente uniforme.

25 Se contempla que se puedan usar otros primeros disolventes en lugar de tetrahidrofurano (THF) tales como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida, metanol, etanol, 1,4-dioxano y sulfolano. También se contempla que se puedan usar otros primeros disolventes.

30 Se selecciona un segundo disolvente que es compatible con el segundo reactivo. Es deseable que el segundo reactivo tenga una solubilidad generalmente alta en el segundo disolvente. En un procedimiento, el segundo disolvente es agua. En otro procedimiento, el segundo disolvente es una combinación de agua e hidróxido de sodio (NaOH). El hidróxido de sodio es deseable porque la solubilidad de al menos algunos segundos reactivos se mejora al ser más básica. Se contempla que se puedan añadir otras soluciones básicas con el segundo disolvente para lograr una solubilidad mejorada del segundo reactivo en el mismo. Se contempla que se puedan usar otros segundos disolventes en lugar de agua.

35 El persulfato de sodio promueve el acoplamiento entre el primer y el segundo reactivo. El persulfato de sodio es un agente de acoplamiento deseable porque se cree que evita la formación de subproductos no deseados. El uso de persulfato de sodio como agente de acoplamiento ayuda a obtener una corriente de fondo baja constante, lo que significa que se está formando una cantidad generalmente baja de subproductos no deseados que permanecen en la solución. Además, el uso de persulfato de sodio ayuda a aislar más fácilmente el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina deseado de la reacción al facilitar la precipitación de material orgánico.

40 Para formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina, se realiza un procesamiento adicional después de que el agente de acoplamiento se añada a la solución de reactivos que incluye el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente. El primer disolvente (por ejemplo, tetrahidrofurano) se puede eliminar o extraer de la solución. El primer disolvente puede eliminarse, por ejemplo, con acetato de etilo. El acetato de etilo ayuda a extraer el primer disolvente y también puede ayudar a eliminar otros materiales orgánicos residuales no deseados (por ejemplo, materiales orgánicos hidrosolubles) de la solución de reacción.

45 Se contempla que se puedan utilizar otros compuestos para eliminar el primer disolvente tales como, por ejemplo, dietiléter, cloroformo y diclorometano.

50 El segundo disolvente (por ejemplo, agua) se elimina del producto mediante enfriamiento y filtración. La eliminación del segundo solvente también ayuda a prevenir o inhibir la descomposición. Al prevenir o inhibir la descomposición, la corriente de fondo normalmente se encontrará a un nivel inferior más deseado. El segundo disolvente residual (por ejemplo, agua residual) no eliminado mediante, por ejemplo, enfriamiento y filtración puede eliminarse del producto mediante diversos procedimientos. Por ejemplo, el segundo disolvente residual se puede eliminar mediante (a) un secado en un horno de vacío, (b) la adición de un compuesto al producto o (c) la liofilización de una solución del producto.

55 En un proceso se añade acetonitrilo al segundo disolvente residual para ayudar a eliminar el segundo disolvente residual de la solución. Se contempla que se puedan utilizar otros compuestos para eliminar el segundo disolvente residual tales como, por ejemplo, acetona y tolueno.

Se contempla que pueda realizarse otro procesamiento en la formación del mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina. Por ejemplo, un acto de procesamiento antes de la eliminación del segundo disolvente puede incluir la reconstitución del mediador en agua, enfriamiento y a continuación filtración a temperatura ambiente para eliminar algo del exceso de sales. También se contempla que pueden realizarse otros actos de procesamiento.

En otro procedimiento, se forma un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina e incluye proporcionar un primer reactivo que incluye fenoxazina. Se proporciona un primer disolvente en el que la fenoxazina tiene una solubilidad deseada. Se proporciona un segundo reactivo para ayudar a formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina. Se proporciona un segundo disolvente en el que el segundo reactivo tiene una solubilidad deseada. El primer reactivo y el primer disolvente se combinan entre sí para formar una primera solución de reactivo. El segundo reactivo y el segundo disolvente se combinan entre sí para formar una segunda solución de reactivo. La primera y la segunda soluciones de reactivo se combinan entre sí para formar una solución de reactivos. Se prepara una solución de persulfato de sodio y se añade a la solución de reactivos. La solución de persulfato de sodio se forma típicamente utilizando el segundo disolvente (el mismo disolvente que se usa en la formación de la segunda solución de reactivo). El persulfato de sodio provoca el acoplamiento de los primer y segundo reactivos, dando como resultado una solución de reacción con el producto formado.

En este procedimiento, se realiza un procesamiento adicional de la solución de reacción para aislar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina. En una forma de realización, el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina se encuentra en forma de una sal. En otra forma de realización, el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina se encuentra en forma de un ácido. Algunos mediadores de 3-fenilimino-3H-fenoxazina pueden no estar en forma de sal ni de ácido.

En este procedimiento, si se forma el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina, se pueden utilizar segundos reactivos, primeros disolventes, segundos disolventes iguales o similares a los descritos anteriormente con respecto al procedimiento de formación del mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina. Además, el procesamiento de aislamiento del mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina mediante la eliminación sustancial de al menos el primer y el segundo disolventes se puede realizar de una forma similar o igual a la descrita anteriormente con respecto al mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina.

Se contempla que puedan formarse muchos mediadores de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o mediadores de 3-fenilimino-3H-fenoxazina diferentes utilizando los procedimientos de la invención. Un ejemplo deseable de una fenotiazina que se ha preparado y se ha encontrado que tiene propiedades adecuadas como mediador para NADH es el mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina. Otro ejemplo deseable es el mediador 3-(3',5'-dicarboxifenilimino)-3H-fenotiazina que se ha preparado y se ha descubierto que tiene propiedades adecuadas como mediador para NADH.

Entre las fenotiazinas y fenoxazinas que se han preparado y se ha descubierto que tienen propiedades adecuadas como mediadores para NADH se encuentran 3-(4'-cloro-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-dietilamino-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-etil-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-trifluorometil-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-metoxicarbonil-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-nitro-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-metoxi-fenilimino)-3H-fenotiazina; 7-acetil-3-(4'-metoxicarbonilfenilimino)-3H-fenotiazina; 7-trifluorometil-3-(4'-metoxicarbonilfenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'- ω -carboxi-n-butyl-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-aminometil-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-(2''-(5''-(p-aminofenil)-1,3,4-oxadiazolil)fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'- β -aminoetil-fenilimino)-3H-fenotiazina; 6-(4'-etilfenil)amino-3-(4'-etilfenilimino)-3H-fenotiazina; 6-(4'-[2-(2-etanoloxi)etoxi]-etoxifenil)amino-3-(4'-[2-(2-etanoloxi)etoxi]etoxifenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-[2-(2-etanoloxi)etoxi]etoxi-fenilimino)-3H-fenotiazina; ácido 3-(4'-fenilimino)-3H-fenotiazina-borónico, 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(4'-carboxifenilimino)-3H-fenotiazina; 3-(3',5'-dicarboxi-fenilimino)-3H-fenoxazina; ácido 3-(2',5'-fenilimino)-3H-fenotiazina-disulfónico y ácido 3-(3'-fenilimino)-3H-fenotiazina-sulfónico.

Se contempla que las fenotiazinas y fenoxazinas que se han preparado y que se ha encontrado que tienen propiedades adecuadas se puedan usar con flavoproteínas tales como FAD-glucosa oxidasa, flavina-hexosa oxidasa y FAD-glucosa deshidrogenasa. También se contempla que las fenotiazinas y fenoxazinas puedan prepararse para su uso, y para que tengan propiedades adecuadas, con quionoproteínas tales como, por ejemplo, PQQ-glucosa deshidrogenasa.

En otra divulgación, la estabilización del mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina también puede mejorarse mediante neutralización o tamponamiento. La acción de neutralización o tamponamiento ayuda a estabilizar el mediador para que sea robusto durante las condiciones de almacenamiento que se va a encontrar. Se contempla que la acción de neutralización o tamponamiento puede realizarse antes o después de que se haya realizado un procesamiento adicional para aislar al mediador. Por ejemplo, la acción de neutralización o de tamponamiento puede realizarse antes de que el mediador se seque en forma de polvo. En otro ejemplo, la acción de neutralización o de tamponamiento puede realizarse después de que el mediador se haya secado en forma de polvo.

El agente neutralizante o de tamponamiento puede seleccionarse de entre materiales que incluyen, pero sin limitación, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, hidróxido de tetrabutilamonio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, fosfato de potasio, bicarbonato de potasio y combinaciones de los mismos. Se contempla que se puedan usar otros materiales como agente neutralizante o de tamponamiento.

Después de añadir el agente neutralizante o de tamponamiento a la solución de mediador, el pH generalmente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8. Más típicamente, después de añadir el agente neutralizante o de tamponamiento a la solución de mediador, el pH es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7 y de forma incluso más deseable de aproximadamente 6 a aproximadamente 7.

EJEMPLOS

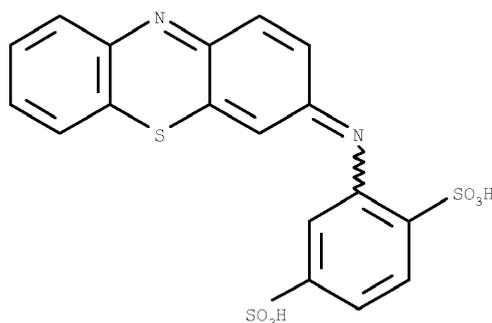
Ejemplo 1

Preparación del mediador (3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina

Se disolvió fenotiazina (1,53 moles, 1,1 equivalentes, 306 g) con agitación en 6,0 l de tetrahidrofurano (THF) y después se enfrió a 0 °C. Se disolvió ácido anilina-2,5-disulfónico (1,38 moles, 350 g) en 7,0 l de agua y se añadió hidróxido de sodio 1 M (NaOH) (128 ml) durante la agitación. La solución de ácido anilina-2,5-disulfónico se añadió lentamente, en el transcurso de aproximadamente 2 horas, a la solución de fenotiazina, para proporcionar una suspensión blanca turbia. La suspensión de fenotiazina/anilina se encontraba a una temperatura de aproximadamente 0 °C - 4 °C. Se disolvió persulfato de sodio (5,52 moles, 4 equivalentes, 1314 g) en 4,0 l de agua para formar una solución de persulfato de sodio.

La solución de persulfato de sodio se añadió gota a gota a lo largo de un periodo de 3 horas a la suspensión de fenotiazina/anilina a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y 3 °C y dio como resultado una solución muy oscura. La solución muy oscura se mantuvo fría utilizando un baño de hielo y se agitó durante la noche. El contenido se transfirió después a un evaporador rotatorio Buchi y el tetrahidrofurano se eliminó en el transcurso de aproximadamente 2 horas a una temperatura inferior a 35 °C. Después de la acción de evaporación, la solución restante se transfirió a un separador de 25 l y se volvió a lavar con acetato de etilo. La solución restante se retrolavó 3 veces utilizando 2 l de acetato de etilo cada vez. Los fluidos de reacción se enfriaron mientras se agitaba a -3 °C en un baño de acetona/CO₂. El sólido precipitado se filtró a través de dos paños en dos embudos Buchner de 24 cm el mismo día. El sólido precipitado se dejó durante la noche en los embudos para que se secase y después se transfirió a un matraz que contenía 2 l de acetonitrilo y se agitó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, para eliminar el agua residual, la muestra se filtró y se lavó con más acetonitrilo. El mediador se secó hasta un peso constante en un horno de vacío a 35 °C.

El mediador formado usando este proceso fue ácido 3-(2',5'-fenilimino)-3H-fenotiazina-sulfónico o 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina. El mediador se muestra a continuación:



Ejemplo 2

Corriente de fondo de los procesos de la invención y comparativos

Se compararon las corrientes de fondo de mediadores 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina preparados mediante dos procesos diferentes. El proceso de la invención para formar el mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina utilizó persulfato de sodio como agente de acoplamiento y fue sustancialmente el mismo que el proceso descrito anteriormente en el ejemplo 1. Este mediador se denominará el mediador de la invención. El proceso comparativo para formar el mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina utilizó persulfato de amonio como agente de acoplamiento. El proceso comparativo fue sustancialmente el mismo que el proceso de la invención, excepto por el uso de persulfato de sodio como agente de acoplamiento. Este mediador se denominará el mediador comparativo.

Cada uno de los mediadores de la invención y comparativo se añadieron por separado a una solución tamponada. Cada una de las soluciones tamponadas incluía 100 mM de fosfato de sodio. Después de añadir los mediadores de

la invención y comparativos a las soluciones tamponadas, se ajustó el pH en ambas soluciones a 7,2. Las soluciones de mediador de la invención y comparativo se dispusieron individualmente en electrodos de carbono. Después de tres segundos, se aplicó un potencial de 250 mV durante cinco segundos a los electrodos de carbono y después se registraron las lecturas de las corrientes de fondo del mediador respectivo.

Con referencia a la figura 2, las corrientes de fondo (en nA) de los mediadores 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina se representaron para diferentes lotes de mediadores formados mediante los procesos de la invención y comparativo. Específicamente, se evaluaron cinco mediadores comparativos diferentes (denominados mediadores comparativos 1-5) y cuatro mediadores de la invención diferentes (denominados mediadores de la invención 1-4) de diferentes lotes.

Tal como se muestra en la figura 2, había tres lotes de mediadores comparativos que tenían corrientes de fondo muy altas. Véanse los mediadores comparativos 1, 4 y 5 de la figura 2 que presentan unas corrientes de fondo, respectivamente, de 2687, 1158 y 1971 nA. El mediador comparativo 2 presentaba una corriente de fondo de 75 nA, mientras que el mediador comparativo 3 presentaba una corriente de fondo de 221 nA. Todos los mediadores de la invención 1-4 presentaban una corriente de fondo deseable inferior a aproximadamente 100 nA. Específicamente, los mediadores de la invención 1-4 presentaban unas corrientes de fondo, respectivamente, de 88, 93, 106 y 99 nA.

Ejemplo 3

Comparación de las estabildades de 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina utilizando diferentes procesos

Se compararon las estabildades de la 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina preparada mediante dos procesos diferentes. El proceso de la invención para formar el mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina utilizó persulfato de sodio como agente de acoplamiento y fue sustancialmente el mismo que el proceso descrito anteriormente en el ejemplo 1. Este mediador se denominará el mediador de la invención. El proceso comparativo para formar el mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina utilizó persulfato de amonio como agente de acoplamiento. El proceso comparativo fue sustancialmente el mismo que el proceso de la invención, excepto por el uso de persulfato de sodio como agente de acoplamiento. Este mediador se denominará el mediador comparativo.

Se compararon las estabildades de los mediadores de la invención y comparativos. Los mediadores de los procesos de la invención y comparativo se formularon en mezclas de reactivos respectivas. Las mezclas de reactivos incluyen adicionalmente tampón de fosfato, Fad-GDH, polímero de celulosa y tensioactivo. Las mezclas de reactivos se dispusieron en electrodos de oro para formar un sensor de análisis de glucosa. Las muestras de los sensores de análisis con mediadores de la invención y comparativos se expusieron a una temperatura de -20 °C durante un periodo de dos semanas. Los sensores de análisis formulados con mediadores del mismo lote de los procesos de la invención y comparativo también se expusieron a una temperatura de 50 °C durante un periodo de dos semanas.

Las mezclas de reactivos incluían el mediador de la invención o el mediador comparativo expuestos. La respuesta de los electrodos se midió a un potencial aplicado de 250 mV utilizando cuatro concentraciones diferentes (0 mg/dl, 50 mg/dl, 100 mg/dl y 400 mg/dl) de muestras de glucosa en sangre completa con un analizador de glucosa de Yellow Springs (YSI, Inc., Yellow Springs, Ohio). Las respuestas eléctricas se convirtieron en concentraciones de glucosa utilizando la pendiente y la intersección de los reactivos respectivos con referencia a las mediciones de glucosa del YSI. Las concentraciones de glucosa se determinaron y se compararon para los reactivos que incluyen el mediador de la invención o comparativo expuestos entre las temperaturas de -20 °C y 50 °C y se compararon para determinar si existía alguna variación o sesgo entre los mismos. Por ejemplo, utilizando 50 mg/dl de glucosa, el reactivo que incluye el mediador de la invención se comparó entre las temperaturas de -20 °C y 50 °C para ver si había alguna variación entre las lecturas. Se determinó el % de sesgo entre estas lecturas.

El % de sesgo se muestra para cada una de las diferentes concentraciones de glucosa y los mediadores de la invención y comparativos en la tabla 1 de la forma siguiente:

Tabla 1

	Proceso de la invención	Proceso comparativo
0 mg/dl	-0,7%	7,1%
50 mg/dl	-1,8%	5,9%
100 mg/dl	0,2%	4,9%
400 mg/dl	2,4%	-8,2%

Por lo tanto, tal como se muestra en la tabla 1, la 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina formada utilizando el proceso de la invención tuvo una estabilidad mucho mayor después de haber estado expuesta a 50 °C durante dos semanas que la 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina formada utilizando el proceso comparativo. El proceso de la invención presentó una mayor estabilidad porque las concentraciones de glucosa medidas no variaron mucho

después de la exposición a la temperatura de 50 °C, tal como se muestra mediante los reducidos % de sesgo. El proceso comparativo, por otra parte, presentó una estabilidad mucho menor debido a que las concentraciones de glucosa medidas variaron mucho más que en el proceso de la invención después de la exposición a la temperatura de 50 °C, tal como se muestra por medio de los % de sesgo más elevados.

Ejemplo ilustrativo 4

Efecto de neutralización o de tamponamiento sobre la 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina con respecto a la estabilidad

En cada uno de las análisis de neutralización o tamponamiento del ejemplo 4, se usó el mismo mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina. Se utilizó también el mismo mediador en los análisis que no incluyeron un análisis de neutralización o de tamponamiento. El mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina se formó utilizando persulfato de sodio como agente de acoplamiento y fue sustancialmente el mismo que en el proceso descrito anteriormente en el ejemplo 1.

El ejemplo 4 analizó tres procesos utilizando diferentes agentes de neutralización o de tamponamiento y los comparó con dos procesos que no incluían un agente de neutralización o de tamponamiento. Con referencia a las figuras 3a, 3b, los procesos para formar los mediadores 1 y 2 no incluyeron ninguna acción de neutralización o de tamponamiento. El proceso para formar el mediador 1 incluía el secado del mediador en un horno de vacío. El proceso para formar el mediador 2 incluía liofilización, que se controló a un pH de 2,4.

Cada uno de los procesos de formación de los mediadores 3-5 incluía una acción de neutralización o de tamponamiento. Cada una de las acciones de neutralización o de tamponamiento dio como resultado un pH de 6,1. Específicamente, el mediador 3 usó 20 mM de fosfato de sodio. Esta solución se formó tomando 5 gramos de mediador 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina y disolviendo los mismos en un tampón de fosfato de sodio 20 mM con un pH de 7,2. El pH se ajustó a 6,1 con NaOH 1 M. El uso de tampón de fosfato de sodio generalmente se denomina ajuste del pH.

El mediador 4 utilizó 1 M de hidróxido de sodio. Esta solución se formó tomando 5 gramos de 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina y disolviendo los mismos en 100 ml de agua fría. Se añadió gota a gota una solución de hidróxido de sodio 1 M mientras se agitaba hasta obtener un pH medido de 6,1. El uso de hidróxido de sodio en este procedimiento neutraliza la solución y, por lo tanto, se denominará agente neutralizante.

El mediador 5 utiliza 1 M de bicarbonato de sodio. Esta solución se formó tomando 5 gramos de 3-(2',5'-disulfofenilimino)-3H-fenotiazina y disolviendo los mismos en 100 ml de agua fría. Se añadió gota a gota una solución de bicarbonato de sodio 1 M mientras se agitaba hasta obtener un pH medido de 6,1. El uso de bicarbonato de sodio en este procedimiento neutraliza la solución y, por lo tanto, se denominará agente neutralizante.

Cada uno de los mediadores 3-5 se congeló después en un baño de isopropanol/hielo seco y se liofilizó hasta obtener un polvo seco utilizando un modelo de liofilizador 4K de sobremesa VirTis® modelo N° 4KBTXL (Gardiner, N.Y.).

La forma de polvo seco de los mediadores 1-5 se sometió a tensiones durante dos semanas en diversas condiciones de almacenamiento. Específicamente, se analizaron nueve condiciones diferentes en las que las temperaturas variaron entre -40 °C y 50 °C. Antes de exponerlas a las condiciones de temperatura, las muestras secas se dispusieron en viales de vidrio, se sellaron con tapas y después se almacenaron. Se realizaron dos análisis a -40 °C y 30 °C en los que se añadió un componente de "uso". Específicamente, el componente de "uso" incluyó exponer los mediadores 1-5 a la temperatura ambiente durante un período de 30 minutos antes de sellar la tapa y abrir la tapa después de una semana y volver a exponerlos a la temperatura ambiente durante otro período de 30 minutos. Esta exposición de "uso" se realizó solo a las temperaturas respectivas de -40 °C y 30 °C. En el análisis "inicial" se realizó el análisis sin condiciones de almacenamiento.

Cada una de las muestras de mediador se analizó para determinar la corriente de fondo utilizando un ensayo de detección de la corriente de fondo. Las muestras de mediador se prepararon como en el ejemplo 1 y con un ajuste de pH a 7,2 usando fosfato de sodio 100 mM tal como se describe en el ejemplo 2. Estas muestras de mediador se añadieron a un electrodo de carbono. Después de tres segundos, se aplicó un potencial de 250 mV durante un período de cinco segundos y después se midió la corriente de fondo.

Tal como se muestra en la figura 3a, la corriente de fondo (en nA) fue mucho menor en los mediadores que incluían la acción de neutralización o de tamponamiento cuando se expusieron a temperaturas más altas durante este período de tiempo. Compárense las corrientes de fondo a temperaturas superiores a 25 °C para los mediadores 1-5. Este fue el caso, en particular, a la temperatura de exposición más alta de 50 °C.

La figura 3b representa el cambio en la corriente de fondo (%) entre la corriente de fondo medida de la figura 3a a partir de la línea de base que se midió antes de las diferentes exposiciones. De forma similar, la corriente de fondo

(%) fue mucho menor en los mediadores que incluyeron la acción de neutralización o de tamponamiento cuando se expusieron a temperaturas más altas durante este período de tiempo. Compárese el % de cambio en las corrientes de fondo a temperaturas superiores a 25 °C para los mediadores 1-5. Este fue el caso, en particular, a la temperatura de exposición más alta de 50 °C.

5 La presente divulgación se refiere a los procesos siguientes:

Proceso A

10 Un procedimiento para formar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina, comprendiendo el procedimiento las acciones de:

proporcionar un primer reactivo que incluye fenotiazina;

15 proporcionar un primer disolvente en el que la fenotiazina tiene una solubilidad deseada;

proporcionar un segundo reactivo para ayudar a formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina;

20 proporcionar un segundo disolvente en el que el segundo reactivo tiene una solubilidad deseada;

combinar el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una solución de reactivos;

25 añadir persulfato de sodio a la solución de reactivos para acoplar el primer y el segundo reactivos, dando como resultado una solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina; y

después de añadir el persulfato de sodio, procesar adicionalmente la solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina para aislar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina.

30 Proceso B

El procedimiento del proceso alternativo A en el que el primer disolvente incluye tetrahidrofurano (THF).

Proceso C

35 El procedimiento del proceso alternativo A en el que el segundo disolvente incluye agua.

Proceso D

40 El procedimiento del proceso alternativo C, en el que el segundo disolvente incluye adicionalmente hidróxido de sodio.

Proceso E

45 El procedimiento del proceso alternativo A en el que se combinan el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente que incluye las acciones de combinar el primer reactivo y el primer disolvente para formar una primera solución de reactivo, y de combinar el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una segunda solución de reactivo antes de combinar entre sí el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar la solución de reactivos.

50 Proceso F

El procedimiento del proceso alternativo A, en el que el procesamiento adicional incluye generalmente eliminar el segundo disolvente mediante la adición de acetonitrilo.

55 Proceso G

El procedimiento del proceso alternativo A, en el que el procesamiento adicional incluye eliminar generalmente el primer disolvente mediante la adición de acetato de etilo.

60 Proceso H

El procedimiento del proceso alternativo A en el que el segundo reactivo incluye ácido anilina-2,5-disulfónico.

65

Proceso I

5 El procedimiento del proceso alternativo A en el que el procesamiento adicional incluye eliminar sustancialmente al menos el primer disolvente y el segundo disolvente de la segunda solución a fin de aislar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina.

Proceso J

10 El procedimiento del proceso alternativo A en el que el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina se encuentra en forma de una sal.

Proceso K

15 El procedimiento del proceso alternativo A en el que el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina se encuentra en forma de un ácido.

Proceso L

20 Un procedimiento para formar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina, comprendiendo el procedimiento las acciones de:

proporcionar un primer reactivo que incluye fenoxazina;

25 proporcionar un primer disolvente en el que la fenoxazina tiene una solubilidad deseada;

proporcionar un segundo reactivo para ayudar a formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina;

proporcionar un segundo disolvente en el que el segundo reactivo tiene una solubilidad deseada;

30 combinar el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una solución de reactivos;

35 añadir persulfato de sodio a la solución de reactivos para acoplar el primer y el segundo reactivos, dando como resultado una solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina; y

después de añadir el persulfato de sodio, procesar adicionalmente la solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina a fin de aislar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina.

Proceso M

40 El procedimiento del proceso alternativo L en el que el primer disolvente incluye tetrahidrofurano (THF).

Proceso N

45 El procedimiento del proceso alternativo L en el que el segundo disolvente incluye agua.

Proceso O

50 El procedimiento del procedimiento alternativo N en el que el segundo disolvente incluye adicionalmente hidróxido de sodio.

Proceso P

55 El procedimiento del proceso alternativo L en el que se combinan el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente, que incluye las acciones de combinar el primer reactivo y el primer disolvente para formar una primera solución de reactivo, y de combinar el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una segunda solución de reactivo antes de combinar entre sí el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar la solución de reactivos.

60 Proceso Q

El procedimiento del proceso alternativo L, en el que el procesamiento adicional incluye generalmente la eliminación del segundo disolvente residual mediante la adición de acetónitrilo.

65

Proceso R

El procedimiento del proceso alternativo L, en el que el procesamiento adicional incluye generalmente la eliminación del primer disolvente mediante la adición de acetato de etilo.

5

Proceso S

El procedimiento del proceso alternativo L en el que el procesamiento adicional incluye eliminar sustancialmente al menos el primer disolvente y el segundo disolvente de la segunda solución a fin de aislar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina.

10

Proceso T

El procedimiento del proceso alternativo L en el que el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina se encuentra en forma de una sal.

15

Proceso U

El procedimiento del proceso alternativo L en el que el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina se encuentra en forma de un ácido.

20

Proceso V

Un procedimiento para formar y estabilizar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina, comprendiendo el procedimiento las acciones de:

25

proporcionar un primer reactivo que incluye fenotiazina o fenoxazina;

proporcionar un primer disolvente en el que la fenotiazina o la fenoxazina tienen una solubilidad deseada;

30

proporcionar un segundo reactivo para ayudar a formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina;

proporcionar un segundo disolvente en el que el segundo reactivo tiene una solubilidad deseada;

35

combinar el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una solución de reactivos;

añadir un agente de acoplamiento a la solución de reactivos para acoplar el primer y el segundo reactivos, dando como resultado una solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina; y

40

después de añadir el agente de acoplamiento, procesar adicionalmente la solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina para aislar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina; y

45

estabilizar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

50

Proceso W

El procedimiento del proceso alternativo V en el que el pH es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7.

Proceso X

El procedimiento del proceso alternativo W en el que el pH es de aproximadamente 6 a aproximadamente 7.

55

Proceso Y

El procedimiento del proceso alternativo W en el que la estabilización del mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina incluye la adición de hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, hidróxido de tetrabutamonio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, fosfato de potasio, bicarbonato de potasio o combinaciones de los mismos.

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para formar un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina, comprendiendo el procedimiento las acciones de:

proporcionar un primer reactivo que incluye fenotiazina o una fenoxazina;

proporcionar un primer disolvente en el que la fenotiazina o la fenoxazina presentan una solubilidad en el mismo;

proporcionar un segundo reactivo para ayudar a formar el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina;

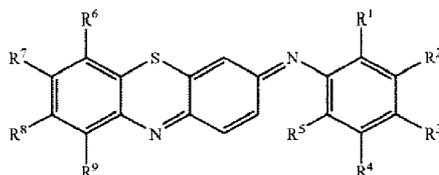
proporcionar un segundo disolvente en el que el segundo reactivo presenta una solubilidad en el mismo;

combinar el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una solución de reactivos;

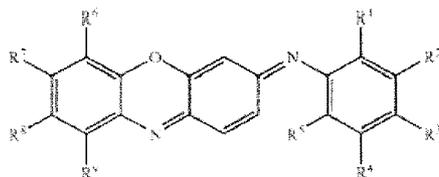
añadir persulfato de sodio a la solución de reactivos para acoplar el primer y el segundo reactivos, dando como resultado una solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina; y

después de añadir el persulfato de sodio, procesar adicionalmente la solución de reacción que incluye el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina a fin de aislar al mediador que comprende el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina o el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina,

en el que el mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina tiene la fórmula



en el que el mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina tiene la fórmula



y en las que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, resto cíclico, resto heterocíclico, halógeno, haloalquilo, carboxi, carboxialquilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, resto ceto aromático, resto ceto alifático, alcoxi, ariloxi, nitro, dialquilamino, aminoalquilo, sulfo, dihidroxiboro y combinaciones de los mismos.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se forma un mediador de 3-fenilimino-3H-fenotiazina y el primer reactivo incluye fenotiazina.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se forma un mediador de 3-fenilimino-3H-fenoxazina y el primer reactivo incluye fenoxazina.

4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer disolvente incluye tetrahidrofurano (THF).

5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo disolvente incluye agua.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se combina el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente, que incluye las acciones de combinar el primer reactivo y el primer disolvente para formar una primera solución de reactivo, y de combinar el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar una segunda solución de reactivo antes de combinar entre sí el primer reactivo, el primer disolvente, el segundo reactivo y el segundo disolvente para formar la solución de reactivos.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el segundo reactivo incluye ácido anilina-2,5-disulfónico.
- 5 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el mediador se encuentra en forma de una sal.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el mediador se encuentra en forma de un ácido.

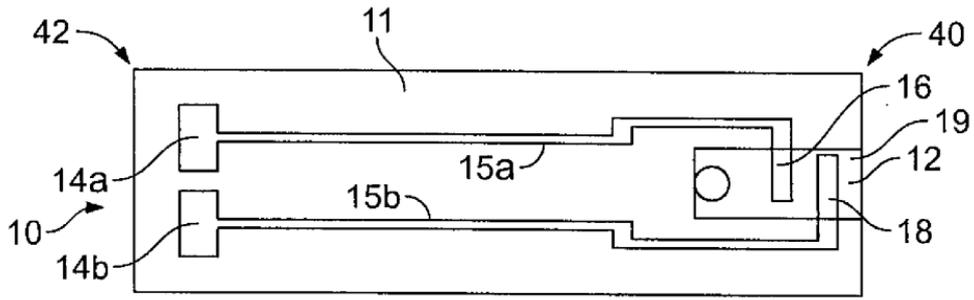


FIG. 1A

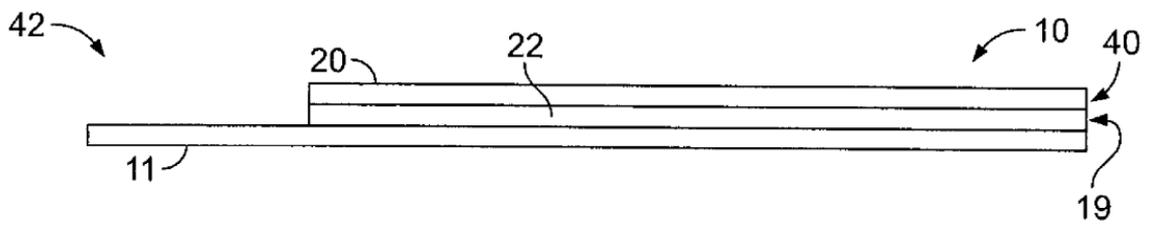


FIG. 1B

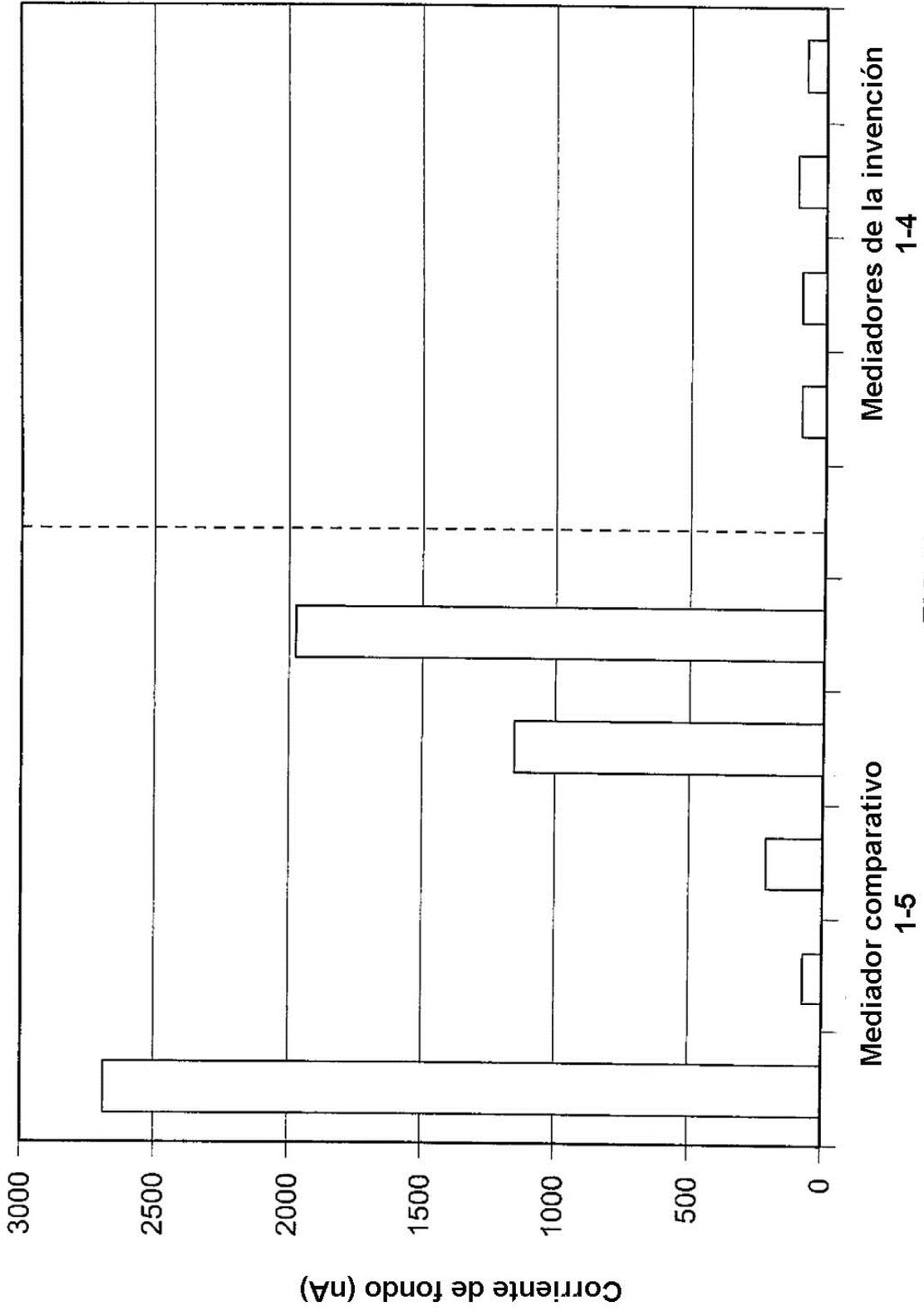


FIG. 2

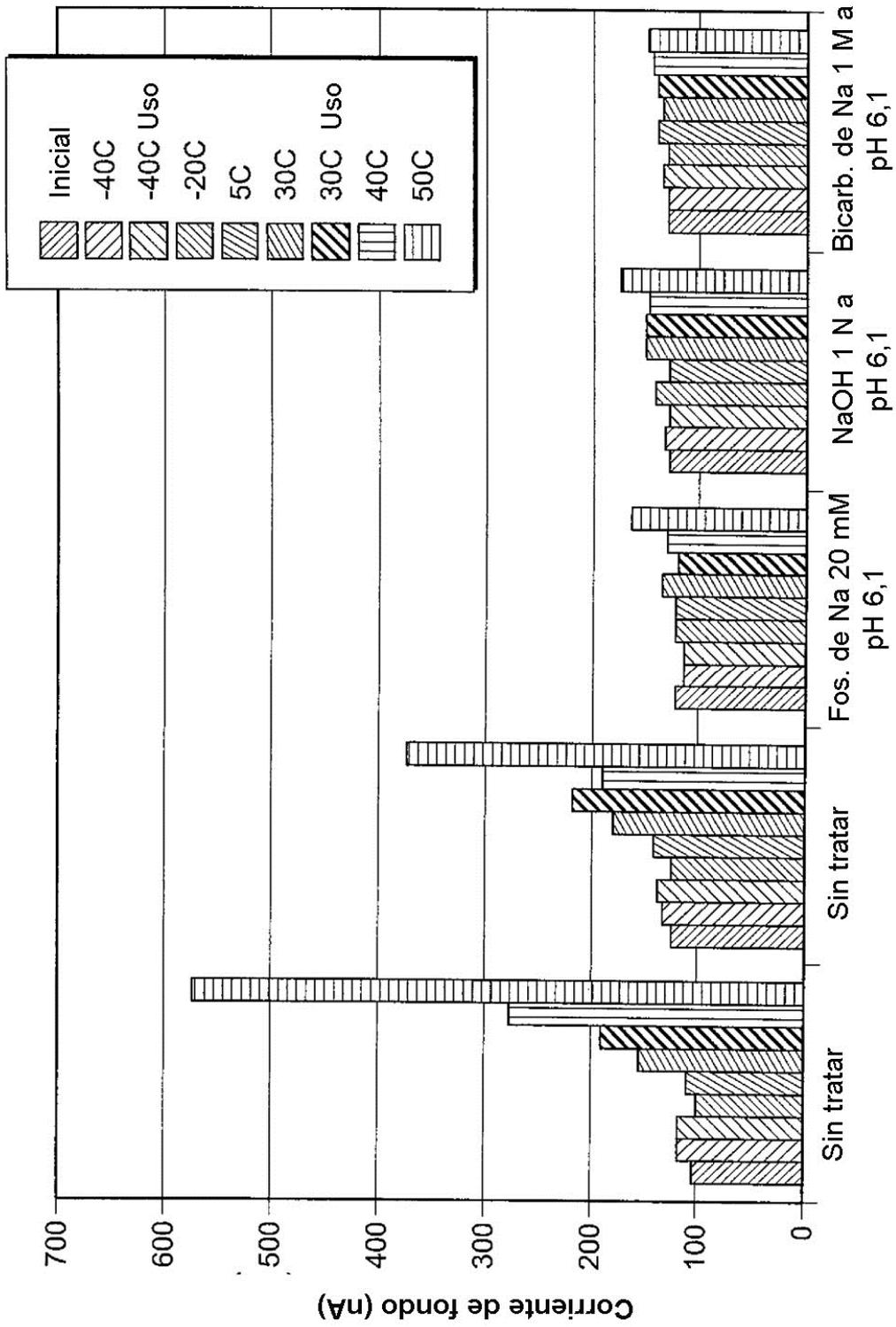


FIG. 3A

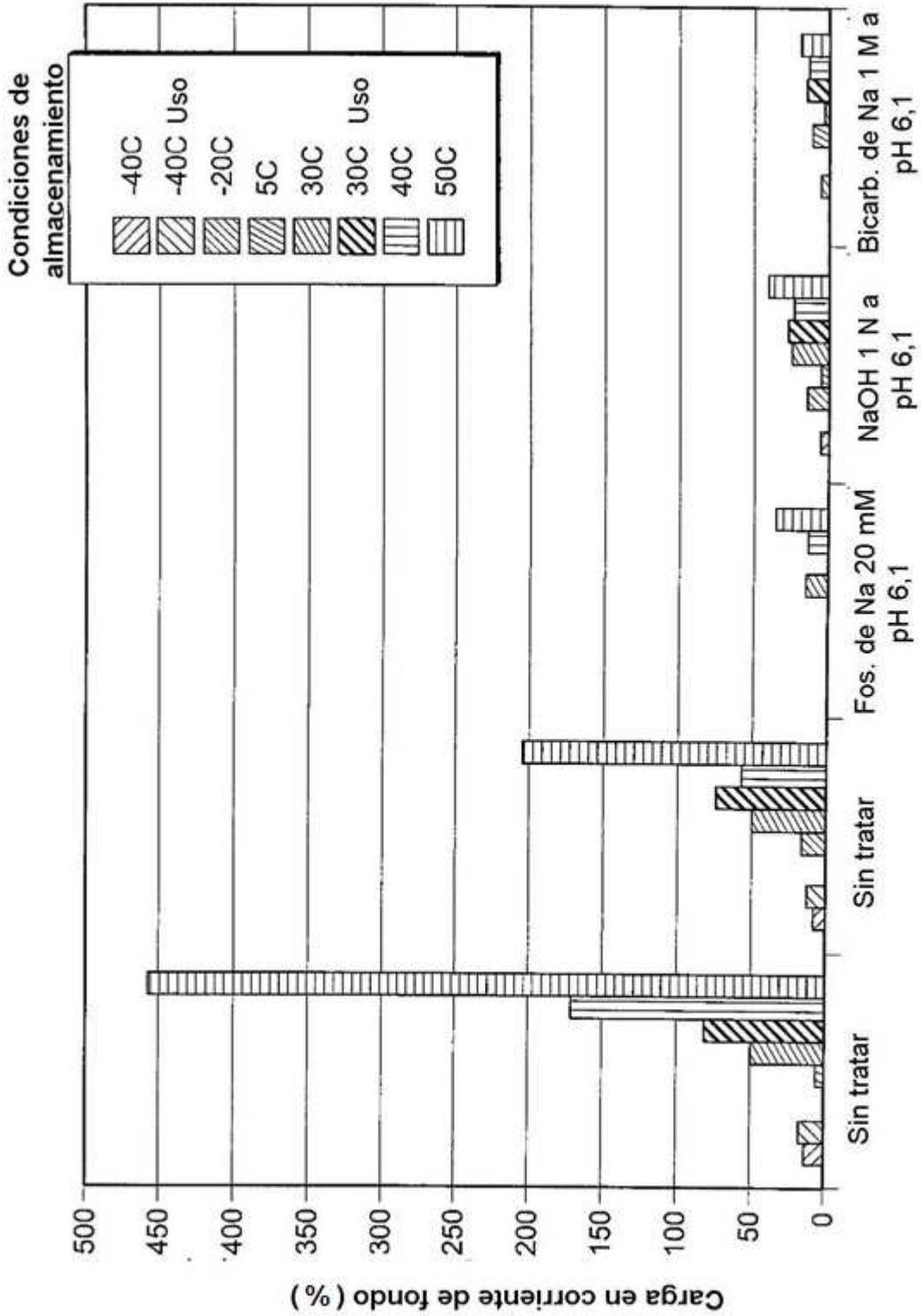


FIG. 3B