



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 787**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98953571 .1**

86 Fecha de presentación : **16.10.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1023455**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2000**

54

Título: **Electrodos biosensores mediadores para el reciclado de cofactores.**

30

Prioridad: **16.10.1997 US 61982 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73

Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72

Inventor/es: **Forrow, Nigel, J.;**
Sanghera, Gurdial, S.;
Watkin, Jared, L. y
Walters, Stephen

74

Agente: **Ungría López, Javier**

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

Electrodos biosensores mediadores para el reciclado de cofactores.

5 Antecedentes de la invención

La invención está en el campo general de los electrodos para biosensores amperométricos. Más específicamente, la invención está en el campo de los compuestos para su uso como mediadores para el reciclado de cofactores utilizados en estos electrodos.

Las enzimas dependientes de NAD y NADP son de gran interés con tal que tengan muchos sustratos de valor clínico, tales como glucosa, D-3-hidroxiacetato, lactato, etanol y colesterol. Los electrodos amperométricos para la detección de estos sustratos y otros analitos pueden ser diseñados incorporando esta clase de enzimas, y estableciendo una comunicación eléctrica con el electrodo vía la oxidación mediada de los cofactores reducidos NADH y NADPH.

Las enzimas dependientes de NAD y NADP son, generalmente, oxidorreductasas intracelulares (EC 1.x.x.x). Las oxidorreductasas son clasificadas además según la identidad del grupo donante de un sustrato en el que actúan. Por ejemplo, las oxidorreductasas que actúan en un grupo CH-OH dentro de un sustrato están clasificadas como EC 1.1.x.x, mientras que aquellas que actúan en un grupo aldehído o ceto de un sustrato están clasificadas como EC 1.2.x.x. Algunos analitos importantes (por ejemplo, glucosa, D-3-hidroxiacetato, lactato, etanol y colesterol) son sustratos de las enzimas EC 1.1.x.x.

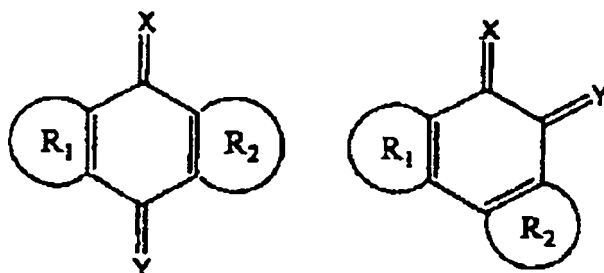
La categoría de las oxidorreductasas también está clasificada conforme al tipo de aceptor utilizado por la enzima. Las enzimas de aplicabilidad para la presente invención tienen NAD⁺ o NADP⁺ como aceptores, y están clasificadas como EC 1.x.1.x. Estas enzimas poseen generalmente grupos sulfhidrilo dentro de sus sitios activos, y por lo tanto, pueden ser inhibidos irreversiblemente mediante sustancias reactivas a los tioles, tales como iodoacetato. Un inhibidor irreversible forma un compuesto estable, a menudo mediante la formación de un enlace covalente con un residuo aminoácido concreto (por ejemplo, cisteína, o Cys) que es esencial para la actividad enzimática. Por ejemplo, la gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa (EC 1.2.1.9) es estequiométricamente alquilada por iodoacetato en Cys 149, con pérdida concomitante de actividad catalítica. Además, las enzimas glucosa deshidrogenasa, D-3-hidroxiacetato deshidrogenasa (HBDH), y lactato deshidrogenasa son conocidas por ser inhibidas irreversiblemente por reactivos tiol. De este modo, buscando desarrollar biosensores estables conteniendo deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP, es imperativa la evitación de compuestos que sean reactivos hacia tioles, ya que pueden actuar como inhibidores enzimáticos.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de compuestos mediadores de NAD⁺ y NADP⁺ que no se unan irreversiblemente a grupos tiol en los sitios activos de enzimas deshidrogenasas intramoleculares. Tales compuestos mediadores evitan un modo frecuente de inhibición enzimática. Los mediadores pueden, por lo tanto, incrementar la estabilidad y exactitud de la respuesta eléctrica en electrodos amperométricos construidos a partir de enzimas dependientes de NAD o NADP.

En una forma de realización, la invención presenta un elemento de ensayo para un biosensor amperométrico. El elemento incluye un electrodo, el cual tiene reactivos de ensayo distribuidos sobre él. El elemento de ensayo de la invención es una tira electrodo desechable de un solo uso, para su sujeción a la circuitería de salida de señales de un sistema sensor para detectar una corriente representativa de un analito en una muestra acuosa, la tira comprendiendo:

- a) un soporte alargado teniendo una superficie plana, sustancialmente lisa, adaptada para su sujeción liberable a dicha circuitería de salida de lectura;
- b) un primer conductor que se extiende a lo largo de dicha superficie, y comprendiendo un elemento conductor para su conexión a dicha circuitería de salida de lectura; un electrodo activo sobre dicha superficie, en contacto con dicho primer conductor, dicho electrodo activo constando de una enzima dependiente del cofactor nicotinamida, un cofactor nicotinamida, y un compuesto mediador teniendo una de las fórmulas siguientes:



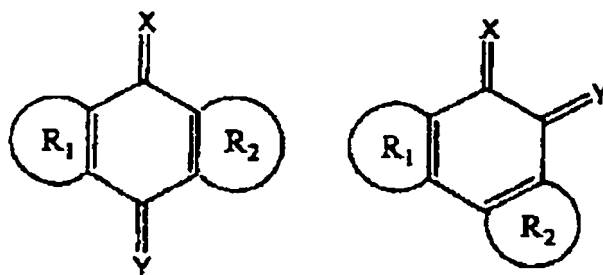
o un complejo o quelato metálico del mismo,

donde X e Y pueden ser, independientemente, oxígeno, azufre, CR^3R^4 , NR^3 , o NR^3R^{4+} o el grupo funcional CZ^1Z^2 , donde Z^1 y Z^2 son grupos captadores de electrones; R_1 y R_2 pueden ser, independientemente, un grupo aromático o heteroaromático sustituido o no sustituido; y R^3 y R^4 pueden ser, independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alquilo, arilo, heteroarilo, amino, alcoxilo o ariloxilo, sustituido o no sustituido, en donde dicho electrodo activo está formulado con ingredientes rellenos y aglutinantes de manera que dicho electrodo dé una respuesta monotónica, a concentraciones de dicho analito entre aproximadamente 1 y 8 mM, cuando la medición se haga de una manera cinética en la que ocurre la oxidación y reducción simultáneas del mediador durante la medición, dicho ingrediente aglutinante incluyendo materias que aumenten fácilmente la viscosidad de los medios acuosos y favorezcan la formación de películas o capas, y dicho ingrediente relleno siendo una materia particulada que es químicamente inerte a las reacciones de oxidación-reducción implicadas en la medición, e insoluble en medios acuosos;

- c) un segundo conductor que se extiende a lo largo de dicha superficie, constando de un elemento conductor para su conexión a dicha circuitería de salida de lectura;
- d) un electrodo de referencia/contraelectrodo en contacto con dicho segundo conductor;
- e) dichos conductores estando espaciados separadamente para que no estén en contacto eléctrico, y estando configurados a fin de que no entren en contacto eléctrico cuando dicha muestra acuosa sea colocada en dicha tira;
- f) dicho electrodo activo y dicho electrodo de referencia/contraelectrodo estando configurados para que ambos puedan ser cubiertos simultáneamente por una pequeña gota de dicha muestra acuosa y proporcionar una vía de conducción eléctrica entre dichos electrodos.

La presente invención también proporciona un proceso para medir la concentración, en una muestra acuosa, de un analito sometido a oxidación mediante una enzima dependiente de NAD(P)^+ , comprendiendo

- a) oxidar el analito con la enzima dependiente de NAD(P)^+ , en presencia de NAD(P)^+ ; oxidar la NAD(P)H generada por reacción con el analito y la enzima dependiente de NAD(P)^+ con un compuesto mediador teniendo una de las dos fórmulas siguientes:



o un complejo o quelato metálico del mismo,

donde X e Y pueden ser, independientemente, oxígeno, azufre, CR^3R^4 , NR^3 , o NR^3R^{4+} o el grupo funcional CZ^1Z^2 , donde Z^1 y Z^2 son grupos captadores de electrones; R_1 y R_2 pueden ser, independientemente, un grupo aromático o heteroaromático sustituido o no sustituido; y R^3 y R^4 pueden ser, independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alquilo, arilo, heteroarilo, amino, alcoxilo o ariloxilo, sustituido o no sustituido; dichos enzima dependiente de NAD(P)^+ , NAD(P)^+ y compuesto mediador habiendo sido aplicados a la superficie de dicho electrodo en combinación con un aglutinante y un relleno;

- b) aplicar un potencial eléctrico en un electrodo para reoxidar el compuesto mediador reducido al oxidar la NAD(P)H , y observar la corriente resultante, en donde algo de compuesto mediador está siendo reducido por reacción con NAD(P)H mientras que algo de compuesto mediador está siendo oxidado por transferencia de electrones hacia dicho electrodo, durante un periodo de medición, y la velocidad de oxidación del compuesto mediador durante dicho periodo de medición, y por consiguiente, la corriente resultante observada está monotónicamente relacionada con la concentración de analito en la muestra.

Preferentemente, la corriente observada durante el periodo de medición está relacionada linealmente con la concentración de analito en la muestra. Preferentemente, el potencial aplicado es 200 mV o inferior.

Cualquier grupo alquilo, a menos que se especifique lo contrario, puede ser lineal o ramificado y puede contener hasta 12, preferentemente hasta 6, y especialmente hasta 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo preferidos son

metilo, etilo, propilo y butilo. Cuando una porción alquilo forma parte de otro grupo, por ejemplo la porción alquilo de un grupo alcoxilo, se prefiere que contenga hasta 6, especialmente hasta 4, átomos de carbono. Porciones alquilo preferidas son metilo y etilo.

5 Un grupo aromático o arilo puede ser cualquier grupo hidrocarburo aromático, y puede contener desde 6 a 24, preferentemente 6 a 18, más preferentemente 6 a 16, y especialmente 6 a 14, átomos de carbono. Los grupos arilo preferidos incluyen los grupos fenilo, naftilo, antrilo, fenantriilo y pirilo, especialmente un grupo fenilo o naftilo, y particularmente un fenilo. Cuando una porción arilo forma parte de otro grupo, por ejemplo la porción arilo de un grupo ariloxilo, se prefiere que sea una porción fenilo, naftilo, antrilo, fenantriilo o pirilo, especialmente fenilo o naftilo, y particularmente un fenilo.

10 Un grupo heteroaromático o heteroarilo puede ser cualquier sistema de anillos aromáticos monocíclicos o policíclicos, el cual contenga al menos un heteroátomo. Preferentemente, un grupo heteroarilo es un sistema de anillos aromáticos de 5 a 18 miembros, particularmente de 5 a 14 miembros, y especialmente de 5 a 10 miembros, conteniendo al menos un heteroátomo seleccionado de átomos de oxígeno, azufre y nitrógeno. Son particularmente preferidos los grupos heteroarilo de 5 y 6 miembros, especialmente los grupos de 6 miembros. Se prefieren especialmente los grupos heteroarilo conteniendo al menos un átomo de nitrógeno. Los grupos heteroarilo preferidos abarcan los grupos piridilo, pirililo, tiopiridilo, pirrolilo, furilo, tienilo, indolinilo, isoindolinilo, indolizínilo, imidazolilo, piridonilo, pironilo, pirimidinilo, pirazinilo, oxazolilo, tiazolilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, piridazinilo, benzofuranilo, benzoxazolilo y acridinilo.

15 Cuando alguno de los anteriores sustituyentes es designado para ser sustituido, los grupos sustituyentes que pueden estar presentes pueden ser uno o más de aquellos empleados de costumbre en el desarrollo de compuestos para su uso en reacciones electroquímicas y/o en la modificación de tales compuestos para influir en su estructura/actividad, solubilidad, estabilidad, capacidad mediadora, potencial formal (E°) u otra propiedad. Los ejemplos específicos de tales sustituyentes incluyen, por ejemplo, átomos de halógeno, grupos oxo, nitro, ciano, hidroxilo, cicloalquilo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, formilo, alcóxicarbonilo, carboxilo, alcanóilo, alquiltio, alquilsulfínilo, alquilsulfonilo, arilsulfínilo, arilsulfonilo, carbamóilo, alquilamido, arilo o ariloxi. Cuando alguno de los sustituyentes anteriores representa o contiene un grupo sustituyente alquilo, este puede ser lineal o ramificado y puede contener hasta 12, preferentemente hasta 6, y especialmente hasta 4, átomos de carbono. Un grupo cicloalquilo puede contener desde 3 a 8, preferentemente de 3 a 6, átomos de carbono. Un grupo o porción arilo puede contener de 6 a 10 átomos de carbono, siendo especialmente preferidos los grupos fenilo. Un átomo de halógeno puede ser un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, y cualquier grupo que contenga una porción halo, tal como un grupo haloalquilo; de este modo puede contener uno o más de estos átomos de halógeno.

20 Un grupo captador de electrones puede ser cualquier grupo que forme un grupo metileno CZ^1Z^2 estable. Tales grupos captadores de electrones pueden incluir átomos de halógeno, grupos nitro, ciano, formilo, alcanóilo, caboxilo y ácido sulfónico.

40 Preferentemente, X e Y son átomos de oxígeno ambos.

También se prefiere que R_1 y R_2 sean seleccionados, independientemente, de grupos fenilo, naftilo, piridilo y pirrolilo, siendo especialmente preferidos los grupos piridilo. El término "grupo piridilo" incluye también el N-óxido del mismo, así como grupos piridinio y piridinio N-sustituídos.

45 Preferentemente, R_1 y R_2 están no sustituidos o sustituidos únicamente por uno o más, preferentemente uno o dos, grupos alquilo, especialmente grupos metilo. Es especialmente preferido que R_1 y R_2 estén no sustituidos.

50 R_3 y R_4 , si estuviesen presentes, son preferentemente seleccionados, por separado, de átomos de hidrógeno y grupos alquilo.

Los complejos y quelatos metálicos incluyen complejos y quelatos con metales de transición, especialmente elementos de transición de la primera, segunda y tercera filas tales como rutenio, cromo, cobalto, hierro, níquel y renio, siendo particularmente preferido el rutenio. También se pueden incluir en tales complejos y quelatos, como parte de un ión metálico del complejo, otros grupos tales como grupos 4-vinil-4'-metil-2,2'-bipiridilo (v-bpy) y bipiridilo (bpy). Típicamente, se formarán tales complejos y quelatos a consecuencia de los heteroátomos en R_1 y R_2 coordinando con un ión metálico o complejo de ión metálico.

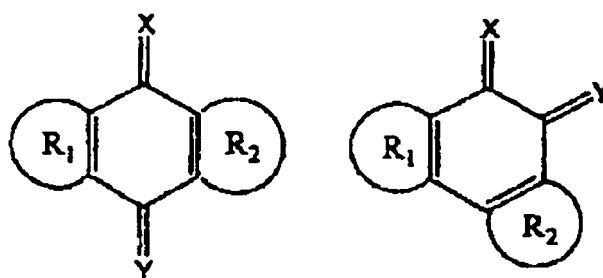
60 Los reactivos de ensayo pueden ser depositados sobre el electrodo, en una o más capas basada en tinta. Los reactivos de ensayo pueden ser impresos con retícula sobre el electrodo de trabajo, en una única capa.

El elemento de ensayo como se definió antes puede ser un sensor amperométrico de tira seca que incluye un soporte alargado, eléctricamente aislante, teniendo en ese un par de pistas longitudinales eléctricamente conductoras, sustancialmente paralelas, y un par de electrodos. Los electrodos están cada uno conectados eléctricamente a una pista diferente; uno de los electrodos es un electrodo de referencia/contraelectrodo, mientras que el otro electrodo es un electrodo de trabajo. El elemento también puede incluir un electrodo falso. Además, el elemento puede incluir una membrana colocada para filtrar las muestras antes de su introducción en los electrodos.

El sensor puede incluir adicionalmente una tira soporte de material de apoyo eléctricamente aislante (por ejemplo, un polímero sintético tal como cloruro de polivinilo, o una mezcla de polímeros sintéticos).

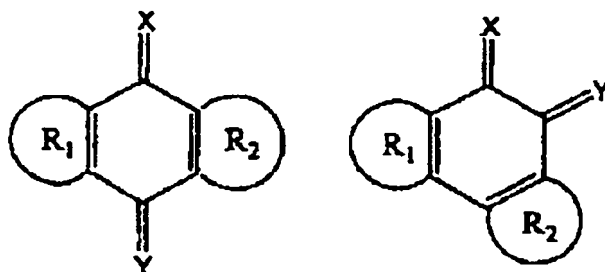
El compuesto mediador puede ser una quinona. Ejemplos de quinonas apropiadas incluyen 1,10-fenantrolina quinona, 1,7-fenantrolina quinona y 4,7-fenantrolina quinona.

En otra forma de realización, la invención presenta una tira electrodo para un sensor amperométrico teniendo una salida de lectura. La tira incluye un soporte adaptado para su sujeción liberable a la salida de lectura, un primer conductor que se extiende a lo largo del soporte y comprendiendo un elemento conductor para su conexión a la salida de lectura; un electrodo de trabajo en contacto con el primer conductor y colocado para contactar con una mezcla de muestra; un segundo conductor que se extiende a lo largo del soporte y comprendiendo un elemento conductor para su conexión a la salida de lectura; y un electrodo de referencia/contraelectrodo en contacto con el segundo conductor y colocado para que contacte con la muestra y el segundo conductor. El electrodo activo de la tira incluye un compuesto mediador que tiene una de las fórmulas:



en donde X, Y, R₁ y R₂ son como se definieron previamente.

Todavía otra forma de realización de la invención presenta un método para medir la concentración de un analito en una muestra acuosa, utilizando transferencia de electrones mediada entre un electrodo y un cofactor nicotinamida. El método incluye las etapas de utilizar un compuesto mediador en presencia de una enzima dependiente del cofactor nicotinamida, donde el compuesto mediador es un compuesto quinoide que es incapaz de unirse irreversiblemente a los grupos tiol. El compuesto mediador puede tener, por ejemplo, enlaces insaturados reactivos en un anillo aromático adyacente. Los compuestos mediadores apropiados incluyen aquellos que tienen las fórmulas:



en donde X, Y, R₁ y R₂ son como se definieron previamente.

Por ejemplo, el compuesto mediador puede ser 1,10-fenantrolina quinona, 1,7-fenantrolina quinona ó 4,7-fenantrolina quinona.

La enzima dependiente del cofactor nicotinamida puede ser, por ejemplo, alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, 3-hidroxibutirato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, malato deshidrogenasa ó 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Ejemplos de enzimas dependientes del cofactor nicotinamida apropiadas cuando el compuesto mediador es 1,10-fenantrolina quinona son la glucosa deshidrogenasa y la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado comprendido generalmente por un especializado en la técnica a la que pertenece esta invención.

Una ventaja de los mediadores revelados aquí, para su uso en la invención, es su no reactividad con respecto a los grupos tiol sitio-activos en enzimas. Esto mejora la estabilidad y la vida media de los electrodos de los biosensores hasta un grado inesperado. Las enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD y NADP son generalmente caras y lábiles, y por lo tanto, es sumamente deseable la mejora de su estabilidad.

Ventajosamente, los compuestos revelados aquí requieren bajos potenciales de oxidación para la reoxidación siguiente a la reacción con NADH o NADPH. Esto es una ventaja particular cuando se ensaya en sangre completa, en la que el potencial para interferencia de especies electroactivas exógenas (por ejemplo, ácido ascórbico, ácido úrico) es particularmente alto. El potencial bajo puede ser ventajoso porque se puede obviar la necesidad de un electrodo falso para eliminar las especies electroactivas en la muestra. También, la forma nativa oxidada del mediador puede disminuir la corriente de fondo que estaría presente con un mediador reducido.

A partir de la descripción detallada siguiente, serán evidentes otras características y ventajas de la invención.

10 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una vista despiezada de una tira electrodo conforme a una forma de realización de la invención.

La Fig. 2 es una representación de una tira electrodo ensamblada.

La Fig. 3 es un diagrama gráfico de corriente en μA frente a la concentración de NADH en mM, para electrodos impresos conteniendo 1,10-fenantrolina quinona.

La Fig. 4 es un diagrama gráfico de corriente en μA frente a la concentración de NADH en mM, para electrodos impresos conteniendo azul de Meldola.

La Fig. 5 es un cuadro de barras que muestra la actividad enzimática residual (esto es, como porcentaje de la actividad inicial) después de la incubación de HBDH con diversos mediadores.

La Fig. 6 es un diagrama gráfico de corriente en mA frente a la concentración de D-3-hidroxibutirato en mM, para electrodos impresos conteniendo 1,10-fenantrolina quinona, D-3-hidroxibutirato deshidrogenasa y NAD^+ ensayados después de 4, 14 y 26 semanas.

La Fig. 7 es un diagrama gráfico de corriente en mA frente a la concentración de D-3-hidroxibutirato en mM, para electrodos impresos conteniendo azul de Meldola, D-3-hidroxibutirato deshidrogenasa y NAD^+ ensayados después de 2 y 14 semanas, respectivamente.

La Fig. 8 es diagrama gráfico de la respuesta calibrada a la glucosa en sangre completa, para electrodos impresos conteniendo 1,10-fenantrolina quinona, glucosa deshidrogenasa y NAD^+ .

35 Descripción detallada de la invención

Se revela una clase de compuestos, seleccionados por su incapacidad para combinarse irreversiblemente con tioles, para su uso como mediadores para NADH o NADPH. Las características estructurales, electrónicas y estéricas de estos mediadores les hacen casi incapaces de reaccionar con tioles. Debido a que estos mediadores están virtualmente imposibilitados para unirse irreversiblemente a los grupos sulfhidrilo sitio-activos de las deshidrogenasas dependientes de NAD y NADP, se burla la inactivación de la enzima y la consiguiente pérdida de estabilidad del biosensor.

Los mediadores para NADH y NADPH se pueden utilizar en la fabricación de sensores enzimáticos amperométricos para un análisis donde el analito sea un sustrato de una enzima dependiente de NAD o NADP presente en el sensor, tal como aquellos de la clase descrita en EP 125867-A. Por consiguiente, se pueden fabricar sensores enzimáticos amperométricos para su uso en ensayar la presencia de un analito en una muestra, especialmente una muestra acuosa. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra biológica compleja tal como un fluido biológico (por ejemplo, sangre completa, plasma, o suero), y el analito puede ser un metabolito de origen natural (por ejemplo, glucosa, D-3-hidroxibutirato, etanol, lactato, o colesterol) o una sustancia introducida tal como un fármaco.

De particular utilidad para la fabricación de sensores enzimáticos amperométricos de la presente invención son las tintas descritas aquí.

También se puede transformar *in situ* una forma precursora, aducto o reducida (leuco) de los mediadores anteriores mediante oxidación o descomposición en los correspondientes mediadores activos. Tales precursores o aductos pueden incluir hemiacetales, hemitioacetales, acetales cíclicos, complejos metálicos de o-quinona, formas protonadas, aductos de acetona, etc.

En la Tabla 1 se proporciona una lista no limitante de enzimas que se pueden utilizar conjuntamente con los mediadores.

TABLA 1

1.1.1.1	Alcohol deshidrogenasa
1.1.1.27	Lactato deshidrogenasa
1.1.1.31	3-Hidroxibutirato deshidrogenasa
1.1.1.49	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
1.1.1.47	Glucosa deshidrogenasa
1.2.1.46	Formaldehído deshidrogenasa
1.1.1.37	Malato deshidrogenasa
1.1.1.209	3-Hidroxiesteroide deshidrogenasa

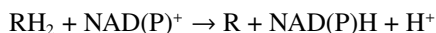
Los sensores enzimáticos amperométricos que adoptan los mediadores utilizan un elemento de ensayo que es una tira de un solo uso. Un elemento de ensayo desechable lleva un electrodo de trabajo con los reactivos de ensayo incluyendo la enzima, el cofactor nicotinamida (esto es, NAD^+ o NADP^+) y los mediadores para la generación de una corriente indicativa del nivel de analito, y un electrodo de referencia/contraelectrodo. Por consiguiente, los electrodos del sensor pueden incluir, por ejemplo, un área de los electrodos formada mediante impresión, pulverización u otra técnica de deposición apropiada.

Con respecto a las Figs. 1 y 2, un soporte del electrodo 1, típicamente fabricado en PVC, policarbonato o poliéster, o una mezcla de polímeros (por ejemplo Valox, una mezcla de policarbonato y poliéster) sostiene tres pistas impresas 2, 3 y 4 de tinta de carbono eléctricamente conductora. Las pistas impresas definen la posición del electrodo de trabajo 5 sobre el que se deposita la tinta 16 del electrodo de trabajo, el electrodo de referencia/contraelectrodo 6, el electrodo indicador de llenado 7, y contacta con 8, 9 y 10.

Las porciones alargadas de las pistas conductoras están cubiertas, respectivamente, con las pistas de partículas de plata/cloruro de plata 11, 12 y 13 (con el área alargada expuesta 14 de la pista 12 cubriendo el electrodo de referencia 6), y cubiertas además con una capa de material hidrófobo eléctricamente aislante 15 que deja expuestas únicamente posiciones del electrodo de referencia/contraelectrodo 14, el electrodo de trabajo 5, el electrodo indicador de llenado 7, y las áreas de contacto 8, 9 y 10. Este material hidrófobo aislante sirve para evitar los cortocircuitos. Debido a que este material aislante es hidrófobo, puede servir para confinar la muestra en los electrodos expuestos. Un material aislante adecuado es Sericard, disponible comercialmente por Sericol Ltd. (Broadstairs, Kent, G.B.). Opcionalmente, una primera capa de malla 17, una segunda capa aisladora 18, una segunda capa de malla 19, una tercera capa aisladora 20, y una cinta 21 pueden cubrir el material aislante hidrófobo.

Las mezclas de tintas respectivas se pueden aplicar sobre una pista conductora en un soporte cercano, próximo al electrodo de referencia 14 conectado a una segunda pista. De esta forma, se puede producir un sensor que sea capaz de funcionar con una pequeña muestra de sangre u otro líquido, cubriendo el área eficaz 5 del electrodo. Las mezclas son preferentemente aplicadas al soporte, pero no exclusivamente, mediante impresión con retícula.

En general, las deshidrogenasas dependientes de NAD(P) catalizan las reacciones conforme a la ecuación:



donde RH_2 representa el sustrato (analito) y R el producto. En el proceso de la reacción directa, la NAD(P)^+ (esto es, NAD^+ o NADP^+) es reducida a NAD(P)H . Los biosensores amperométricos apropiados proporcionan un mediador electroquímico que puede reoxidar la NAD(P)H , regenerando de ese modo la NAD(P)^+ . La reoxidación sucede en un electrodo para generar una corriente que es indicativa de la concentración del sustrato.

En una forma de realización, se proporciona un sensor seco. El sensor incluye un soporte alargado, eléctricamente aislante, teniendo en ese un par de pistas longitudinales eléctricamente conductoras, paralelas sustancialmente, cada pista siendo suministrada en el extremo mismo con medios para su conexión eléctrica a una salida de lectura y proporcionada con un electrodo, uno de los electrodos siendo el electrodo de referencia/contraelectrodo y el otro siendo el electrodo de trabajo, conjuntamente con los reactivos de ensayo. El sensor puede estar configurado en forma de una tira soporte de material de apoyo eléctricamente aislante, tal como un polímero sintético (por ejemplo, PVC, policarbonato o poliéster, o una mezcla de polímeros tal como Valox) portando los dos electrodos sostenidos en pistas conductoras eléctricamente entre sus extremos. Por ejemplo, los electrodos pueden tener la forma de dos áreas rectangulares frente a frente en la tira de apoyo, como se muestra en la Fig. 2 (esto es, los electrodos 14 y 16). Tales áreas pueden ser diseñadas como áreas diana a ser cubiertas mediante una única gota de muestra, tal como sangre completa, para ensayar el analito. Si se desea, se pueden emplear áreas no rectangulares (por ejemplo, áreas con forma de diamante, semicirculares, circulares o triangulares) para proporcionar un área diana para el contacto optimizado por una muestra de líquido.

El soporte incluye al menos dos electrodos, a saber, un electrodo de referencia/contraelectrodo y un electrodo de trabajo. También pueden estar incluidos otros electrodos tales como un electrodo falso. Estos otros electrodos pueden ser de formulación similar al electrodo de trabajo (esto es, con los reactivos de ensayo asociados), pero careciendo de uno o más de los componentes activos del electrodo de trabajo. Un electrodo falso, por ejemplo, puede proporcionar resultados más exactos porque, si la carga pasada en el electrodo falso es restada de la carga pasada en el electrodo de trabajo, entonces la carga resultante puede terminarse por ser debida a la reacción de interés.

Se puede suministrar una membrana en, o por encima de, la diana para llevar a cabo una función de filtración. Por ejemplo, una membrana puede filtrar células sanguíneas de una muestra antes de que la muestra entre en la tira de ensayo. Ejemplos de membranas disponibles comercialmente, que se puedan utilizar, incluyen la Hemasep V, Cytosep, y Hemadyne (Pall Biosupport, Fort Washington, NY 11050). Como alternativa, se puede fundir y moldear *in situ* una membrana de filtración o separación celular. Esto se puede lograr fundiendo y moldeando polímeros hidrófobos tales como acetato de celulosa, polivinilbutiral y poliestireno y/o polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y acetato de polivinilo.

Como se definió antes, se proporciona una tira electrodo desechable de un solo uso, para su sujeción a la circuitería de salida de señales de un sistema sensor. La tira puede detectar una corriente representativa de un analito en una mezcla líquida. La tira incluye un soporte alargado, adaptado para su sujeción liberable a la circuitería de salida de lectura; un primer conductor que extiende a lo largo del soporte e incluyendo un elemento conductor para su conexión a la circuitería de salida de lectura; un electrodo de trabajo en la tira, en contacto con el primer conductor y colocado para que contacte con la mezcla; un segundo conductor que se extiende a lo largo del soporte, constando de un elemento conductor para su conexión a la circuitería de salida de lectura; y un electrodo de referencia/contraelectrodo en contacto con el segundo elemento conductor y colocado para que contacte con la mezcla y el segundo conductor, como se representa en la Fig. 1.

El electrodo de trabajo puede incluir una capa impresa en el soporte, y la capa impresa misma incluye una enzima deshidrogenasa dependiente de NAD o NADP, capaz de catalizar una reacción que implique un sustrato para la enzima. Esta capa también incluye el correspondiente cofactor nicotinamida y un mediador revelado aquí capaz de transferir electrones entre la reacción catalizada enzimáticamente y el primer conductor, vía NADH o NADPH, para crear una corriente representativa de la actividad de la enzima y el analito.

El primer elemento conductor y el electrodo activo están espaciados separadamente del segundo elemento conductor y el electrodo de referencia/contraelectrodo, y los electrodos dimensionados y colocados para que presenten un área eficaz combinada lo suficientemente pequeña para que sea cubierta completamente por una gota de sangre u otra muestra de ensayo; típicamente la zona de reacción es de 5 mm², pero puede ser tan grande como 25 mm². La muestra de ensayo completa un circuito eléctrico a través del electrodo activo y el electrodo de referencia/contraelectrodo, para la detección amperométrica de la actividad de la enzima.

Conforme a la presente invención, se produce un electrodo de trabajo utilizando una formulación que no solamente incluye la enzima, el cofactor nicotinamida y el mediador, sino también los ingredientes rellenos y aglutinantes que originan que el electrodo de trabajo dé una respuesta monotónica creciente a las concentraciones de interés para el analito a ser percibido, cuando se miden de un modo cinético en el que la oxidación y reducción del mediador suceden ambas durante la medición. El concepto es proporcionar una capa de reacción estable en la superficie del electrodo de trabajo, cuando se aplica la muestra. Esto permite el empleo de mediadores que son escasamente solubles en la muestra. A medida que se reduce el mediador mediante reacción con la enzima, cofactor y analito, es retenido cerca, próximo a la superficie del electrodo, a fin de que pueda ser fácilmente reoxidado sin pérdida significativa en precipitación. El mantenimiento de esta delgada capa de reacción permite también que suceda la reacción analítica total en un pequeño volumen de la muestra global, de modo que, en realidad, lo que se mide es el flujo de analito desde la muestra a granel hacia esta capa de reacción.

Esta capa de reacción necesita permanecer estable durante al menos el tiempo para conducir una medición cinética reproducible. Los tiempos típicos para tal medición oscilan entre unos 5 y 60 segundos, aunque se prefiere una estabilidad durante tiempos más largos. Típicamente, las tiras electrodo desechables de interés son producidas en serie y, por lo tanto, es conveniente tener un margen de seguridad con respecto a cualquier propiedad necesaria para explicar la variabilidad inherente en cualquier proceso de fabricación en serie.

La estabilidad de la capa de reacción puede ser mejorada mediante una combinación adecuada de rellenos y aglutinantes. Preferentemente, la capa es suficientemente estable para dar una respuesta reproducible, aproximadamente lineal, en una medición cinética por encima del intervalo de concentración de interés para un analito dado. Por ejemplo, para cuerpos cetónicos (medidos como hidroxibutirato) este estaría entre aproximadamente 1 y 8 mM, mientras que para la glucosa estaría entre aproximadamente 2 y 40 mM.

La medición cinética implica el reciclado del mediador entre un estado oxidado y un estado reducido. La velocidad de este reciclado, que se refleja en la corriente observada durante el transcurso del ensayo, depende de la concentración de analito en la muestra. Cuanto mayor es la concentración de analito, se reducirá más cofactor enzimático en el transcurso de oxidar enzimáticamente el analito. A su vez, el mediador se reduce al reoxidar el cofactor, y después se reoxida en la superficie del electrodo. Sin embargo, debido a su muy baja solubilidad, únicamente está inmediatamente disponible una cantidad pequeña de mediador para reaccionar con el cofactor reducido. Por consiguiente, el mediador

que reacciona con el cofactor reducido y se reoxida en el electrodo reaccionará después con cofactor reducido adicional, y esto continua durante el transcurso de una medición cinética. De este modo, cuanto mayor es la concentración de cofactor reducido (reflejo de una mayor concentración de analito en la muestra), mayor será la fuerza directriz para el reciclado del mediador y, de este modo, mayor la velocidad de reciclado.

En algunos casos, el cofactor también puede estar ocupado en reciclarse entre un estado oxidado y un estado reducido durante la medición cinética. Esto depende de si hay inicialmente presente suficiente cantidad de cofactor para transformar todo el analito presente en la capa de reacción. Si hay inicialmente presente una cantidad insuficiente de cofactor como cofactor oxidado, es regenerado para que favorezca la oxidación de cualquier analito que permanezca en la capa de reacción, llegando a ser reducido nuevamente.

Sin embargo, lo que es crítico es que una concentración dada de analito reproducible se traduzca en la producción de la misma señal en el ensayo cinético para un diseño concreto de tira electrodo, y que la señal aumente monotónicamente, preferentemente linealmente, con la concentración de analito (en otras palabras, que la señal sea una auténtica función de la concentración de analito) durante el intervalo de concentración de interés. Esto permite que el fabricante de las tiras electrodo establezca una calibración universal para un lote dado de tiras electrodo, de manera que cualquier señal dada, obtenida a partir de una tira dada bajo condiciones de ensayo estándar, se correlacione únicamente con una concentración concreta de analito. De este modo, es importante que dentro del intervalo de concentración de interés no exista ninguna variable incontrolable, que no sea la concentración de analito, que efectuase sustancialmente la señal.

La señal puede ser la corriente observada a tiempo fijo después de que se inicie el ensayo, o puede ser la corriente integrada durante algún periodo sucediendo a un tiempo fijo después de que se inicie el ensayo (en esencia, la carga transferida durante tal periodo). El ensayo es conducido cubriendo el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia/contraelectrodo con muestra, y aplicando después un potencial entre ellos. Luego, se observa la corriente que fluye durante un periodo de tiempo. Se impone el potencial tan pronto como la muestra cubra los electrodos, o se puede imponer después de una corta demora, típicamente unos 3 segundos, para asegurar la buena humectación de los electrodos por la muestra. El tiempo fijo hasta que se tome la corriente o integración de la corriente como señal debería ser lo suficientemente largo para asegurar que la variable principal, que afecte a la corriente observada, sea la concentración de analito.

El electrodo de referencia/contraelectrodo puede ser un clásico electrodo de plata/cloruro de plata, pero también puede ser idéntico al electrodo de trabajo en construcción. En una forma de realización, las dos pistas conductoras independientes pueden estar revestidas ambas con una formulación apropiada de enzima, cofactor y mediador, en un vehículo acuoso conteniendo relleno y aglutinante, para producir un revestimiento. En aquellos casos en los que el revestimiento no sea conductor, por ejemplo cuando el relleno no es conductor, un revestimiento común puede cubrir ambos electrodos. Cuando se aplica un potencial, uno de los electrodos funcionará como electrodo de referencia/contraelectrodo absorbiendo los electrones liberados en el otro electrodo, el de trabajo. El mediador en el electrodo de referencia/contraelectrodo llegará a ser reducido sencillamente a consecuencia de la interacción con el flujo de electrones en su electrodo.

La capa de reacción que produce el comportamiento deseado se obtiene formulando el electrodo de trabajo con ingredientes rellenos y aglutinantes. El objeto es permitir que la muestra interactúe con la enzima, el cofactor y el mediador pero asegurando también que estos ingredientes activos químicamente permanezcan en la proximidad de la superficie del electrodo. El ingrediente aglutinante debería incluir materias que aumenten fácilmente la viscosidad de medios acuosos y favorezcan la formación de películas o capas. Típicos de tales materias son los polisacáridos tales como la goma guar, alginato, goma de algarrobo, carragenina y xantana. Útiles también son las materias conocidas comúnmente como formadores de película, tales como alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrol, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa y poli(vinil oxazolidinona). El ingrediente relleno debería ser una materia particulada que sea químicamente inerte a las reacciones de oxidación-reducción implicadas en la medición, e insoluble en medios acuosos. Puede ser eléctricamente conductor o no conductor. Las materias típicas incluyen el carbono, comúnmente en forma de grafito, dióxido de titanio, sílice y alúmina.

El electrodo activo puede ser convenientemente producido formulando la enzima, cofactor, mediador e ingredientes aglutinantes y rellenos en un vehículo acuoso, y aplicándolo al soporte alargado, eléctricamente aislante, que tiene pistas conductoras. La formulación se puede aplicar por impresión tal como impresión con retícula u otras técnicas apropiadas. La formulación también puede incluir otros ingredientes tales como un tampón para proteger a la enzima durante el proceso de fabricación, un estabilizante proteico para proteger a la enzima contra la desnaturalización, y un agente desespumante. Estos ingredientes adicionales también pueden tener un efecto en las propiedades de la capa de reacción.

El electrodo de trabajo tiene típicamente un espesor en seco entre unas 2 y 50 μm , preferentemente entre unas 10 y 25 μm . El espesor en seco real dependerá, hasta cierto punto, de la técnica de aplicación utilizada para aplicar los ingredientes que constituyen el electrodo de trabajo. Por ejemplo, para la impresión con retícula son típicos unos espesores entre unas 10 y 25 μm .

Sin embargo, el espesor de la capa de reacción no es únicamente función del espesor en seco del electrodo de trabajo sino que también depende del efecto de la muestra en el electrodo de trabajo. En el caso de muestras acuosas,

la formulación de los ingredientes del electrodo de trabajo afectará al grado de captación de agua que muestre esta capa.

El relleno constituye típicamente entre un 20 y un 30% en peso del vehículo acuoso. Las cantidades de los otros ingredientes son, típicamente, menos de un 1% en peso del vehículo acuoso, y se ajustan empíricamente para lograr las propiedades finales deseadas. Por ejemplo, la cantidad de tampón y estabilizante proteico son ajustadas para conseguir el grado deseado de actividad enzimática residual. Con respecto a esto, se puede utilizar más enzima y menos estabilizante, o menos enzima y más estabilizante, para lograr el mismo nivel final de actividad enzimática. La cantidad de aglutinante y de agente desespumante debería ser ajustada para dar viscosidades apropiadas para el método de aplicación, siendo apropiadas las viscosidades superiores para impresión con retícula, y siendo apropiadas las viscosidades inferiores para impresión en rotograbado.

Se puede formular una formulación de tinta acuosa apropiada, conforme a la Tabla 2, siendo el balance de desespumante, tampón, intensificadores de la actividad enzimática y agua para constituir 1 gramo de tinta formulada. La enzima, cofactor, mediador, relleno y aglutinante son como se definieron anteriormente.

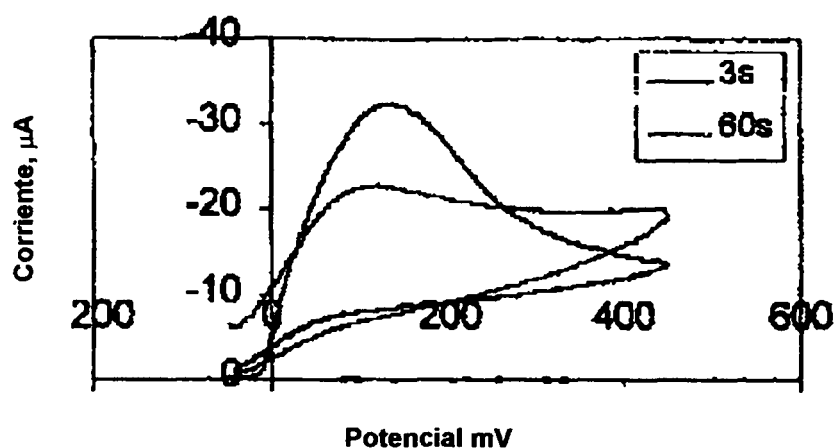
TABLA 2

Enzima (tal como glucosa deshidrogenasa o 3-hidroxibutirato deshidrogenasa)	200 a 4.000 unidades
Cofactor nicotinamida (tal como NAD)	5 a 30% en peso
Mediador (tal como 1,10-fenantrolina quinona)	0'1 a 1'5% en peso
Relleno (tal como carbono ultrafino o titania)	10 a 30% en peso
Aglutinante (tal como alginato o goma guar)	0'01 a 0'5% en peso
Estabilizante proteico (tal como trehalosa o albúmina de suero bovino)	0'01 a 2% en peso

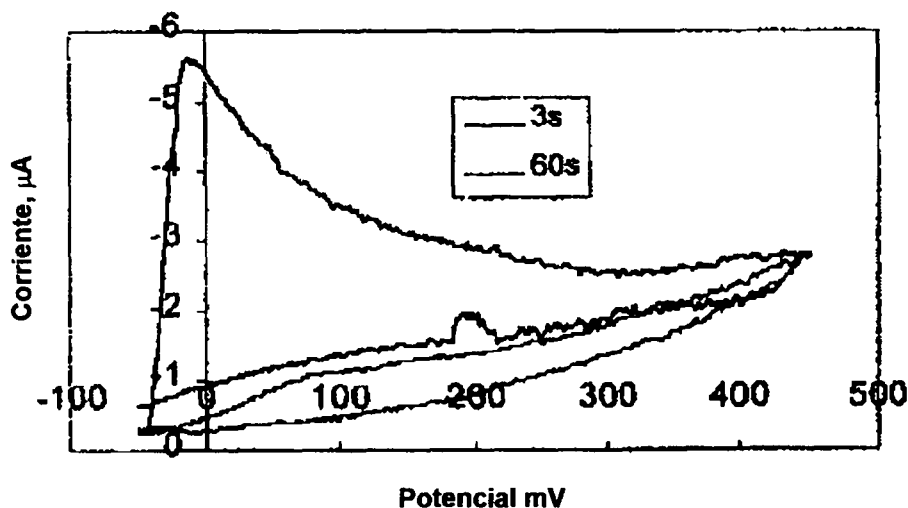
La estabilidad de la capa de reacción puede ser fácilmente evaluada utilizando voltametría cíclica con diversas demoras de tiempo. La formulación del electrodo de trabajo se evalúa exponiéndolo a una muestra conteniendo una concentración relativamente alta de analito, y sometiendo a un potencial ininterrumpidamente creciente hasta un valor máximo, y después a un potencial ininterrumpidamente decreciente hasta ningún potencial aplicado. La corriente resultante aumenta hasta un valor máximo y luego cae a medida que continúa el barrido de voltaje. Tales evaluaciones de voltametría cíclica son conducidas después de varios periodos de demora, después de que el electrodo de trabajo sea expuesto a la muestra. El cambio en la corriente máxima, con periodos de demora crecientemente largos, es una medida de la estabilidad de la capa de reacción. Cuanto más estable sea la capa de reacción más pequeña será la disminución en la corriente máxima.

Se condujo una evaluación para comparar la estabilidad de un electrodo de trabajo, formulado conforme a las enseñanzas de la presente invención, con la de un "electrodo de trabajo" formulado conforme a las enseñanzas de Geng y col., en las páginas 1.267 a 1.275, de Biosensors and Bioelectronics, Volumen II, número 12 (1996). El electrodo de trabajo representativo de la presente invención fue formulado con aproximadamente el 25% de relleno (carbono ultrafino), aglutinante, estabilizante proteico y desespumante como se pensó anteriormente, y el electrodo de trabajo representativo de Geng fue formulado con un poli(óxido de etileno) de alto peso molecular, como se describió en la página 1.267 del artículo de Geng. En cada caso, se aplicó un potencial a una frecuencia de exploración de 50 milivoltios por segundo hasta 400 mV, frente a un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata después de exponer el electrodo de trabajo a una solución acuosa 20 mM de glucosa durante 3 segundos y 60 segundos. La formulación conforme a la presente invención produce una capa de reacción estable en la que la corriente máxima después de 60 segundos es el 60% de la observada después de 3 segundos, mientras que la formulación conforme al artículo de Geng produce una capa de reacción inestable en la que no es observable ninguna corriente máxima después de una exposición de 60 segundos.

Esto es atribuido a una disolución del electrodo con una pérdida de los reactivos en la solución del granel. Los voltagramas respectivos son como sigue:



Formulación con Aglutinante y Rellenante (Presente Invención)



Formulación PEO (Artículo de Geng)

Las tiras de ensayo de esta invención pueden detectar analitos, que son sustratos de enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP, utilizando un mediador seleccionado de los compuestos revelados aquí, tal como 1,10-FQ.

Las tiras de ensayo conforme a esta invención son pretendidas para su uso con aparatos y sistemas de medición electrónicos. Estos controlan el progreso de la reacción electroquímica (por ejemplo, manteniendo un potencial concreto en los electrodos), monitorizan la reacción, y calculan y presentan el resultado. Una característica particular que es conveniente en un sistema medidor para su uso con tiras de ensayo de este tipo es la capacidad de detectar la humectación de la zona de reacción por el líquido de la muestra, permitiendo de este modo una iniciación oportuna de la medición, y reduciendo el potencial para inexactitudes causadas por error del usuario. Este objetivo se puede conseguir aplicando un potencial a los electrodos de la tira de ensayo en cuanto la tira sea insertada dentro del medidor; este potencial puede ser eliminado durante un corto tiempo para permitir que la humectación sea completada antes de la iniciación de la medición.

El medidor también puede presentar un medio para identificar automáticamente tiras de ensayo para medir diferentes analitos. Esto se puede lograr, por ejemplo, cuando en la tira de ensayo estén impresos uno o más bucles del circuito; cada bucle puede proporcionar una resistencia característica del tipo de tira, como se describió en la Patente U.S. N° 5.126.034, en la columna 4, líneas 3 a 17. Como alternativa adicional, en el extremo proximal de la tira de ensayo se podrían cortar muescas u otras figuras; los interruptores o detectores ópticos en el medidor pueden detectar la presencia o ausencia de cada muesca. Otra técnica de identificación del tipo de tira incluye el variar el color de las tiras y suministrar el medidor con un fotodetector capaz de distinguir la gama de colores; y proporcionar las tiras con códigos de barras, tiras magnéticas u otras marcas, y suministrar el medidor con un adecuado dispositivo de lectura.

En un ejemplo de una tira de ensayo para producción a gran escala, los electrodos de tira tienen una configuración de dos electrodos constando de un electrodo de referencia/contraelectrodo y un electrodo de trabajo. El soporte puede estar fabricado de cualquier material que tenga una superficie eléctricamente aislante, incluyendo policloruro de vinilo, policarbonato, poliéster, papel, cartón, cerámica, metal recubierto con cerámica, mezclas de estos materiales (por ejemplo, una mezcla de policarbonato y poliéster), u otra sustancia aislante.

Al soporte se le aplica una tinta conductora mediante un método de deposición tal como impresión con retícula. Esta capa forma las áreas de contacto, que permiten al medidor conectar con la tira de ensayo, y proporciona un circuito eléctrico entre los contactos y la química activa que acontece en la tira. La tinta puede ser, por ejemplo, una mezcla de carbono con base orgánica, secada al aire. Formulaciones alternativas abarcan tintas de carbono con base acuosa y tintas metálicas tales como plata, oro, platino y paladio. Otros métodos para secar o curar las tintas incluyen el empleo de radiación infrarroja, ultravioleta, y de radiofrecuencia.

La capa que forma el electrodo de referencia/contraelectrodo se imprime con una tinta con base disolvente orgánico conteniendo una mezcla de plata/cloruro de plata. Pares de referencia alternativos incluyen Ag/BrAg, Ag/IAg y Ag/Ag₂O. La impresión se prolonga hasta cubrir parcialmente la pista de en medio de la impresión de carbono, donde se extiende dentro de la zona de reacción. Es útil si las partes por separado de esta impresión son prolongadas para cubrir las partes de otras pistas de carbono fuera de la zona de reacción, a fin de que se reduzca la resistencia eléctrica total de cada pista.

Opcionalmente, se puede imprimir una capa de tinta dieléctrica para cubrir la mayor parte de las capas impresas de carbono y de plata/cloruro de plata. En este caso, se dejan dos áreas sin cubrir, a saber, el área para contacto eléctrico y el área sensora, que estarán debajo de la zona reactiva como se representa en las Figs. 1 y 2. Esta impresión sirve para definir el área de la zona reactiva, y para proteger las pistas expuestas del cortocircuito.

Para el electrodo de trabajo, se depositan una o más tintas, hasta un espesor preciso, en un área definida en la parte superior de una de las pistas conductoras dentro de la zona de reacción, para depositar la enzima, el cofactor y un mediador de la presente invención. Es conveniente hacer esto mediante impresión con retícula. Otras maneras de extender esta tinta abarcan la impresión por chorro de tinta, la dosificación volumétrica, la impresión en huecogrado, la impresión flexográfica, y la impresión tipográfica. Opcionalmente, sobre una segunda pista conductora se puede depositar una segunda tinta, parcialmente activa, para formar un electrodo falso.

Como se discutió antes, se pueden incluir polisacáridos en la formulación de la tinta, como materia en el ingrediente aglutinante. Los polisacáridos apropiados incluyen goma guar, alginato, goma de algarrobo, carragenina y xantana. La tinta también puede incluir un formador de película; los polímeros formadores de película apropiados abarcan alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrol, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa (CMC) y poli(vinil oxazolidinona). Los rellenos de la tinta pueden incluir dióxido de titanio, sílice, alúmina o carbono.

Los siguientes son ejemplos ilustrativos, no limitantes, de la práctica de la invención:

Ejemplo 1

Mediadores

Se obtuvo azul de Meldola (AM) (Compuesto 3), como sal hemi-Cl₂Zn, de Polysciences Inc. Se compraron 2,6-dicloroindofenol (DCIF) (Compuesto 6) y tampón Tris de Sigma. La solución de salino tamponado con fosfato (PBS) (fórmula de Dulbecco) fue preparada a partir de comprimidos suministrados por ICN Biomedicals Ltd.

Se compró D-3-hidroxi butirato deshidrogenasa (HBDH; EC 1.1.1.30) de *Pseudomonas sp.* de Toyobo Co., Ltd. La p-nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y el ácido D,L-3-hidroxi butírico fueron suministrados por Boehringer Mannheim.

Se preparó 1,10-fenantrolina quinona (1,10-FQ) (Compuesto 7) conforme al método de Gillard y col. (*J. Chem. Soc. A*, 1.447-1.451, 1970). Se sintetizó la 1,7-fenantrolina quinona (1,7-FQ) (Compuesto 8) utilizando el procedimiento descrito por Eckert y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2.533-2.536, 1982). Se sintetizó 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina quinona (2,9-Me₂-1,10-FQ) (Compuesto 10) como subproducto de la nitración de neocuproína, como se reveló por Mullins y col. (*J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 75-81, 1996). Se preparó metosulfato de 1-metoxifenacina (1-MeO-FMS) (Compuesto 5) vía la metilación de 1-metoxifenacina adaptada a partir del método descrito por Surrey (*Org. Synth. Coll. Vol. 3*, Ed. E. C. Horning, Wiley, Nueva York, 753-756). Se sintetizó 1-metoxifenacina mediante una reacción modificada de Wohl-Aue, como se informó por Yoshioka (*Yagukaku Zasshi*, 73: 23-25, 1953). Se preparó 4-metil-1,2-benzoquinona (4-Me-BQ) (Compuesto 4) vía oxidación de 4-metilcatecol con o-cloranilo, según un procedimiento general por Carlson y col. (*J. Am. Chem. Soc.*, 107: 479-485, 1985). El complejo de 1,10-FQ [Ru(bpy)₂](1,10-FQ)(PF₆)₂ (Compuesto 12) fue obtenido a partir de [Ru(bpy)₂Cl₂] (Strem Chemicals Inc.), como se informó por Goss y col. (*Inorg. Chem.*, 24: 4.263-4.267, 1985).

Preparación de Trifluorometanosulfonato de 1-Me-1,10-fenantrolina quinona (1-Me-1,10-FQ) (Compuesto 11)

Se añadió trifluorometanosulfonato de metilo (Aldrich) (1'0 ml) a una solución de 1,10-FQ (0'50 g, 2'38 mmoles) en cloruro de metileno anhidro (25 ml) bajo nitrógeno. Ocurrió una precipitación inmediata, y la mezcla resultante fue agitada durante 24 horas. La filtración, seguida por lavado con cloruro de metileno, proporcionó 1-Me-1,10-FQ⁺ (0'65 g, 73%) como polvo fino amarillo.

Evaluación de Azul de Meldola y 1,10-FQ como Mediadores de NADH en Tiras Secas

Se produjeron electrodos impresos con retícula, incorporando 1,10-FQ y AM, a partir de una tinta orgánica de carbono conteniendo estos mediadores de NAD(P)H en un nivel de 3'5 mg/g de tinta. Los mediadores sólidos fueron mezclados en una tinta de carbono conductora comercial (Gwent Electronic Materials).

En la Fig. 3 se muestra la curva dosis-respuesta para los electrodos conteniendo 1,10-FQ, ensayados con soluciones acuosas de NADH (0-16'7 mM) en PBS, a un potencial de equilibrio de +400 mV, frente a un electrodo de referencia de Ag/ClAg impreso. Se registró una pendiente de 0'58 $\mu\text{A mM}^{-1}$ de NADH. En la Fig. 4 se muestra la curva dosis-respuesta para los electrodos conteniendo AM, ensayados con soluciones acuosas de NADH (0-12'4 mM), a un potencial de equilibrio de +100 mV, frente a un electrodo de referencia de Ag/ClAg impreso. Se observó una pendiente incrementada de 8'48 $\mu\text{A mM}^{-1}$ de NADH.

Evaluación de la Inhibición del Mediador de D-3-hidroxibutirato deshidrogenasa

Se prepararon una serie de 18 soluciones (2'5 ml cada una), cada una conteniendo 50 U/ml de HBDH y 1'29 ó 2'58 mg de los siguientes mediadores de NAD(P)H: AM (3), 4-Me-BQ (4), 1-MeO-FMS (5), DCIF (6), 1,10-FQ (7), 1,7-FQ (8), 2,9-Me₂-1,10-FQ (10), 1-Me-1,10-FQ⁺ (11) y [Ru(bpy)₂(1,10-FQ)](PF₆)₂ (12) en tampón Tris (50 mM, pH 8'2). También se preparó una solución de control conteniendo enzima pero no mediador. Las soluciones fueron incubadas durante 0'5 horas a 37'5°C, ensayadas después (por triplicado) para NADH a 340 nm utilizando un equipo D-3-hidroxibutirato de Sigma Diagnostics. El alcance de la interferencia del mediador añadido con la velocidad del ensayo, comparada al control, proporcionó una medida cuantitativa de la eficacia del mediador como oxidante de NADH.

Después, se volvió a aislar la enzima de las soluciones de mediador mediante filtración a través de una membrana de polisulfona (corte de peso molecular nominal: 30.000) en un filtro para microcentrífuga (Millipore). La enzima que quedó en el filtro fue disuelta en tampón Tris (0'2 ml), y la solución resultante se ensayó (por triplicado) con el equipo Sigma. Comparando los resultados de los ensayos antes y después de la filtración, se pudo determinar el efecto de cualquier mediador, unido covalentemente y/o irreversiblemente, en la actividad enzimática.

En la Tabla 3 se recogen los resultados de los dos ensayos en cada solución, antes y después de la filtración.

TABLA 3

Mediador	Velocidad del ensayo (unidades de absorbancia/minuto)		
	Control (sin mediador)	Antes de la filtración	Después de la filtración
1,10-FQ	0'167	0'149	0'160 (96%)
1,7-FQ	0'155	0'115	0'150 (97%)
AM	0'167	0'008	0'026 (16%)
4-Me-BQ	0'170	0'005	0'007 (4%)
1-MeO-FMS	0'150	0'009	0'071 (47%)
DCIF	0'150	0'104	0'085 (57%)
2,9-Me ₂ -1,10-FQ	0'197	0'189	N/A
1-Me-1,10-FQ ⁺	0'197	0'150	0'185 (94%)
[Ru(bpy) ₂ (1,10-FQ)](PF ₆) ₂	0'197	0'114	0'193 (98%)

Aunque estos resultados demostraron que los mediadores de fenantrolina quinona fueron mediadores de NADH relativamente ineficaces comparados con el azul de Meldola y el 1-MeO-FMS (esto es, la velocidad del ensayo "antes de la filtración" fue rebajada únicamente hasta un pequeño alcance), "después de la filtración" la actividad enzimática original fue restaurada por encima del 90% para las soluciones conteniendo 1,10-FQ, 1,7-FQ, 1-MeO-1,10-FQ o

[Ru(bpy)₂(1,10-FQ)](PF₆)₂. Este no fue el caso para AM, 1-MeO-FMS, DCIF o 4-Me-BQ. En efecto, el mediador quinona 4-Me-BQ demostró ser el inhibidor más potente, con únicamente el 4% de la actividad original permaneciendo “después de la filtración”. De este modo, los últimos cuatro mediadores inactivan parcialmente la HBDH, mientras que los mediadores recién descritos tenían ventajosamente un pequeño o ningún efecto en la actividad enzimática.

En la Fig. 5 se muestran, como cuadro de barras, el porcentaje de las actividades enzimáticas residuales para cada mediador, el cual revela que los mediadores utilizados en la presente invención, representados por barras negras, no son inhibidores fuertes de la HBDH. Por contraste, los AM, 4-Me-BQ, 1-MeO-FMS y DCIF inhibieron irreversiblemente todos la HBDH, con pérdidas concomitantes en la actividad oscilando desde el 43 al 96%; estos resultados están representados por barras grises en la Figura 5.

Ejemplo 2

Evaluación del Azul de Meldola y la 1,10-FQ en Tiras Secas conteniendo HBDH

Se produjeron electrodos impresos con retícula a partir de una tinta de carbono acuosa incorporando 1,10-FQ o AM en un nivel de 2'4 ó 4'3 mg/g de tinta, respectivamente, junto con la enzima HBDH (120 unidades/g de tinta) y NAD⁺ (110 mg/g de tinta). La tinta también contenía un aglutinante polisacárido.

En la Fig. 6 se dan las curvas dosis-respuesta para los electrodos conteniendo 1,10-FQ. Los electrodos fueron ensayados, después de 4, 14 y 26 semanas de almacenamiento (30°C, desecados), con soluciones acuosas de D-3-hidroxibutirato (0-25 mM) en PBS, a un potencial de equilibrio de +400 mV frente a un electrodo de referencia de Ag/ClAg impreso. Las tres respuestas a la dosis fueron no lineales y se estabilizaron con una corriente de 8'5 µA, siendo registradas a 24 mM de D-3-hidroxibutirato. Esto demostró que la respuesta de los electrodos secos fue estable durante al menos 26 semanas.

En la Fig. 7 se proporcionan las curvas dosis-respuesta para los electrodos conteniendo AM. Los electrodos fueron ensayados, después de 2 y 14 semanas de almacenamiento (30°C, desecados), con soluciones acuosas de D-3-hidroxibutirato (0-28 mM) en PBS, a un potencial de equilibrio de +100 mV frente a un electrodo de referencia de Ag/ClAg impreso. Las curvas dosis-respuesta fueron similares a las de la Fig. 4. Después de 2 semanas de almacenamiento, para estos electrodos se registró una corriente de 8'6 µA, a 24 mM de D-3-hidroxibutirato. Esta es casi idéntica a las respuestas obtenidas de tiras secas conteniendo 1,10-FQ.

Este resultado demostró que la capacidad de un compuesto tal como AM, para mediar muy eficazmente con NADH, comparado con 1,10-FQ, pesa más por el hecho de que inhiba la HBDH. Además, la estabilidad de la respuesta de los electrodos al D-3-hidroxibutirato está comprometida por la inactivación de la HBDH por el AM. La Fig. 7 demuestra que la respuesta de estos electrodos cayó un margen inaceptable de aproximadamente el 7% después de 14 semanas de almacenamiento.

En resumen, los electrodos biosensores conteniendo un mediador utilizado en la presente invención mostraron respuestas que fueron estables después de al menos 26 semanas de almacenamiento. Por contraste, aquellos electrodos incorporando un mediador tradicional tal como AM, que es un inhibidor enzimático irreversible, exhibieron respuestas que declinaron después de solamente 14 semanas de almacenamiento.

Ejemplo 3

Evaluación de 1,10-FQ en Tiras Secas conteniendo Glucosa deshidrogenasa (GDH)

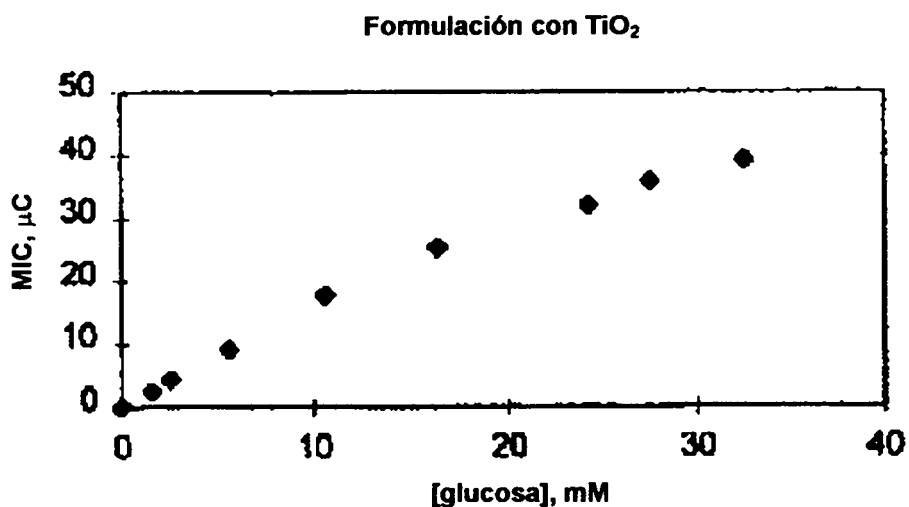
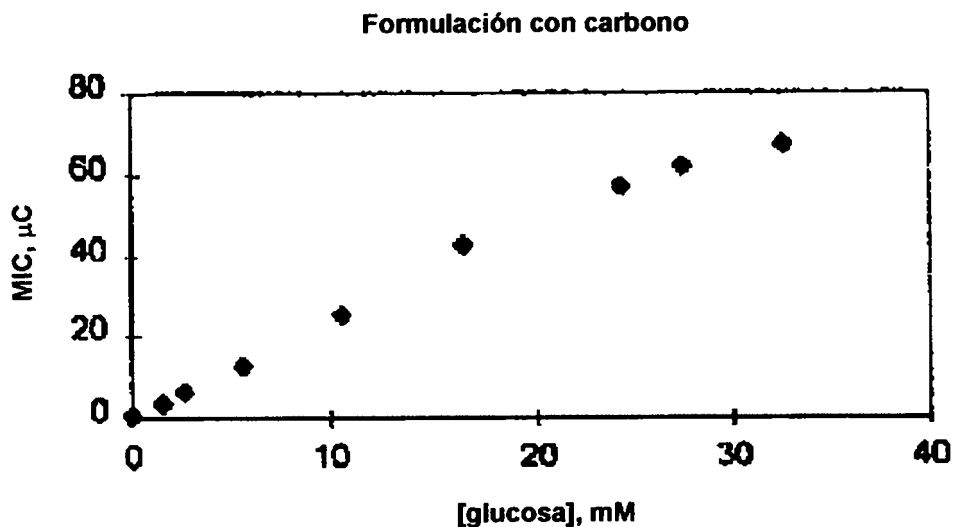
Se produjeron electrodos impresos con retícula a partir de una tinta de carbono acuosa incorporando 1,10-FQ o AM en un nivel de 2'4 ó 4'3 mg/g de tinta, respectivamente, junto con la enzima glucosa deshidrogenasa (120 unidades/g de tinta) y NAD⁺ (110 mg/g de tinta). La tinta también contenía un aglutinante polisacárido.

En la Fig. 8 se da la curva dosis-respuesta calibrada para los electrodos. Los electrodos fueron ensayados con sangre completa conteniendo concentraciones fisiológicamente relevantes de glucosa, oscilando desde 3'3 hasta 26 mM. Se mantuvo un potencial de equilibrio de +50 mV frente a un electrodo de Ag/ClAg impreso. Los electrodos produjeron una respuesta lineal durante el rango de glucosa. De este modo, se demostró que un mediador utilizado en la invención puede ser utilizado para construir un sensor de glucosa, útil clínicamente, que funciona a un potencial aplicado particularmente bajo.

Ejemplo 4

Se prepararon tiras electrodo utilizando la construcción ilustrada en las Figuras 1 y 2, con un electrodo de referencia/contraelectrodo de plata/cloruro de plata y un electrodo de trabajo preparado imprimiendo con retícula una formulación conforme a la Tabla 2. En un caso, el relleno era el 25% en peso de carbono ultrafino y, en el otro caso, el relleno era el 25% en peso de titanía. En ambos casos, la enzima fue glucosa deshidrogenasa (GDH), el cofactor fue NAD, el mediador fue 1,10-FQ, el aglutinante fue goma guar, el estabilizante proteico fue albúmina de suero bovino (BSA) y el tampón fue Tris (0'325% en peso).

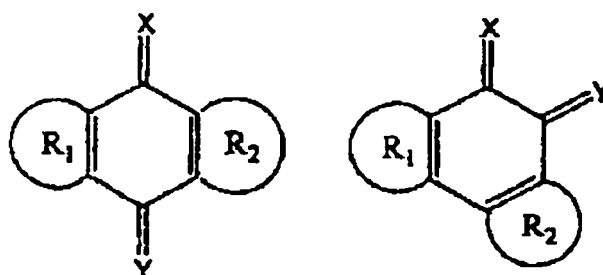
Se evaluaron estas tiras electrodo aplicando un potencial de 200 mV entre el electrodo de referencia/contraelectrodo y el electrodo de trabajo, mientras que una solución acuosa de glucosa cubría ambos electrodos. La corriente observada desde los 15 a los 20 segundos después de la aplicación del potencial fue integrada y trazada gráficamente frente al contenido de glucosa de las soluciones de ensayo. La formulación rellena con carbono dio una pendiente de 2'6 microculombios por mM de glucosa y un intercepto en el eje X de -1 microculombios, mientras que la formulación rellena con titanía dio una pendiente de 1'5 microculombios por mM de glucosa y un intercepto en el eje X de 0'6 microculombios. Los diagramas fueron como sigue:



REIVINDICACIONES

1. Una tira electrodo desechable de un solo uso, para su sujeción a la circuitería de salida de señales de un sistema sensor para detectar una corriente representativa de un analito en una muestra acuosa, la tira comprendiendo:

- a) un soporte alargado teniendo una superficie plana, sustancialmente lisa, adaptada para su sujeción liberable a dicha circuitería de salida de lectura;
- b) un primer conductor que se extiende a lo largo de dicha superficie, y comprendiendo un elemento conductor para su conexión a dicha circuitería de salida de lectura; un electrodo activo sobre dicha superficie, en contacto con dicho primer conductor, dicho electrodo activo constando de una enzima dependiente del cofactor nicotinamida, un cofactor nicotinamida, y un compuesto mediador teniendo una de las fórmulas siguientes:



o un complejo o quelato metálico del mismo,

donde X e Y pueden ser, independientemente, oxígeno, azufre, CR^3R^4 , NR^3 , o NR^3R^{4+} o el grupo funcional CZ^1Z^2 , donde Z^1 y Z^2 son grupos captadores de electrones; R_1 y R_2 pueden ser, independientemente, un grupo aromático o heteroaromático sustituido o no sustituido; y R^3 y R^4 pueden ser, independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alquilo, arilo, heteroarilo, amino, alcóxido o ariloxilo, sustituido o no sustituido, en donde dicho electrodo activo está formulado con ingredientes rellenos y aglutinantes de manera que dicho electrodo dé una respuesta monotónica, a concentraciones de dicho analito entre aproximadamente 1 y 8 mM, cuando la medición se haga de una manera cinética en la que ocurre la oxidación y reducción simultáneas del mediador durante la medición, dicho ingrediente aglutinante incluyendo materias que aumenten fácilmente la viscosidad de los medios acuosos y favorezcan la formación de películas o capas, y dicho ingrediente relleno siendo una materia particulada que es químicamente inerte a las reacciones de oxidación-reducción implicadas en la medición, e insoluble en medios acuosos;

- c) un segundo conductor que se extiende a lo largo de dicha superficie, constando de un elemento conductor para su conexión a dicha circuitería de salida de lectura;
- d) un electrodo de referencia/contraelectrodo en contacto con dicho segundo conductor;
- e) dichos conductores estando espaciados separadamente para que no estén en contacto eléctrico, y estando configurados a fin de que no entren en contacto eléctrico cuando dicha muestra acuosa sea colocada en dicha tira;
- f) dicho electrodo activo y dicho electrodo de referencia/contraelectrodo estando configurados para que ambos puedan ser cubiertos simultáneamente por una pequeña gota de dicha muestra acuosa y proporcionar una vía de conducción eléctrica entre dichos electrodos.

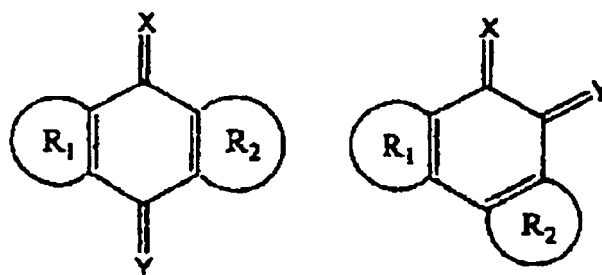
2. La tira electrodo de la reivindicación 1, en donde el compuesto mediador es 1,10-fenantrolina quinona.

3. La tira electrodo de la reivindicación 2, en donde la enzima dependiente del cofactor es glucosa deshidrogenasa.

4. La tira electrodo de la reivindicación 2, en donde la enzima dependiente del cofactor es 3-hidroxi-butarato deshidrogenasa.

5. Un proceso para medir la concentración en una muestra acuosa de un analito sometido a oxidación mediante una enzima dependiente de NAD(P)^+ , comprendiendo

- a) oxidar el analito con la enzima dependiente de NAD(P)^+ , en presencia de NAD(P)^+ ; oxidar la NAD(P)H generada por reacción con el analito y la enzima dependiente de NAD(P)^+ con un compuesto mediador teniendo una de las dos fórmulas siguientes:



o un complejo o quelato metálico del mismo,

donde X e Y pueden ser, independientemente, oxígeno, azufre, CR^3R^4 , NR^3 , o NR^3R^{4+} o el grupo funcional CZ^1Z^2 , donde Z^1 y Z^2 son grupos captores de electrones; R_1 y R_2 pueden ser, independientemente, un grupo aromático o heteroaromático sustituido o no sustituido; y R^3 y R^4 pueden ser, independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alquilo, arilo, heteroarilo, amino, alcoxilo o ariloxilo, sustituido o no sustituido; dichos enzima dependiente de NAD(P)^+ , NAD(P)^+ y compuesto mediador habiendo sido aplicados a la superficie de dicho electrodo en combinación con un aglutinante y un rellente; y

- b) aplicar un potencial eléctrico en un electrodo para reoxidar el compuesto mediador reducido al oxidar la NAD(P)H , y observar la corriente resultante, en donde algo de compuesto mediador está siendo reducido por reacción con NAD(P)H mientras que algo de compuesto mediador está siendo oxidado por transferencia de electrones hacia dicho electrodo, durante un periodo de medición, y la velocidad de oxidación del compuesto mediador durante dicho periodo de medición, y por consiguiente, la corriente resultante observada está monotónicamente relacionada con la concentración de analito en la muestra.

6. El proceso de la reivindicación 5, en donde la corriente observada durante el periodo de medición está linealmente relacionada con la concentración de analito en la muestra.

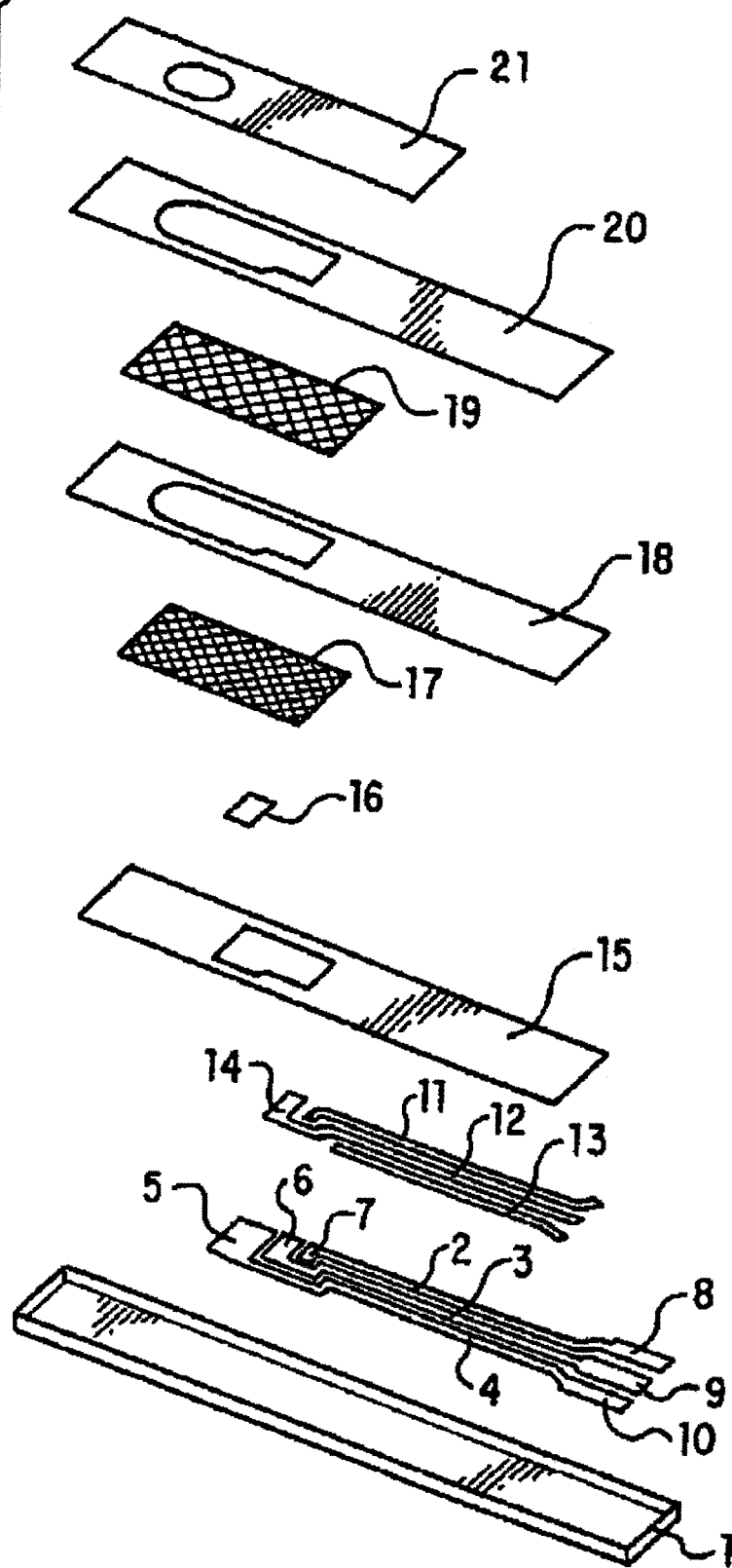
7. El proceso de la reivindicación 5, en donde el componente mediador es 1,10-fenantrolina quinona.

8. El proceso de la reivindicación 7, en donde la enzima dependiente del cofactor es glucosa deshidrogenasa.

9. El proceso de la reivindicación 7, en donde la enzima dependiente del cofactor es 3-hidroxibutirato deshidrogenasa.

10. El proceso de la reivindicación 5, en donde el potencial aplicado es 200 mV o menos.

FIG. 1



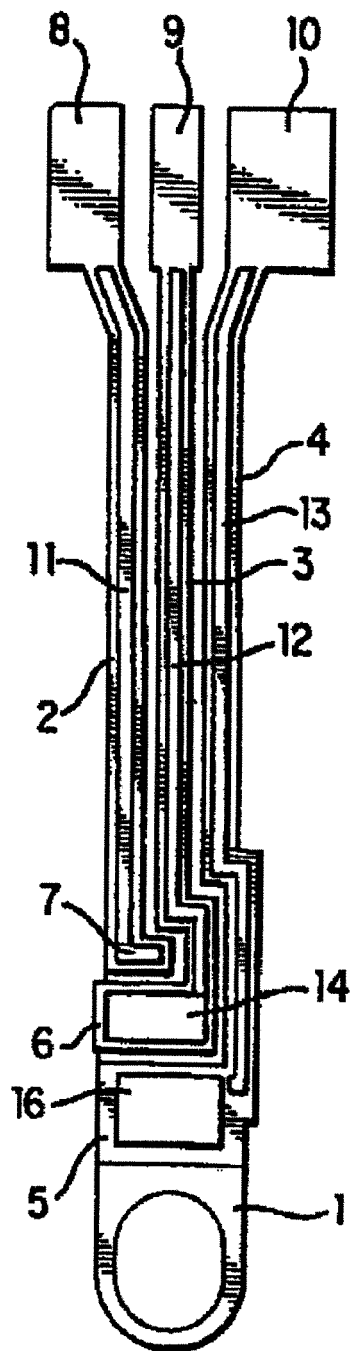


FIG. 2

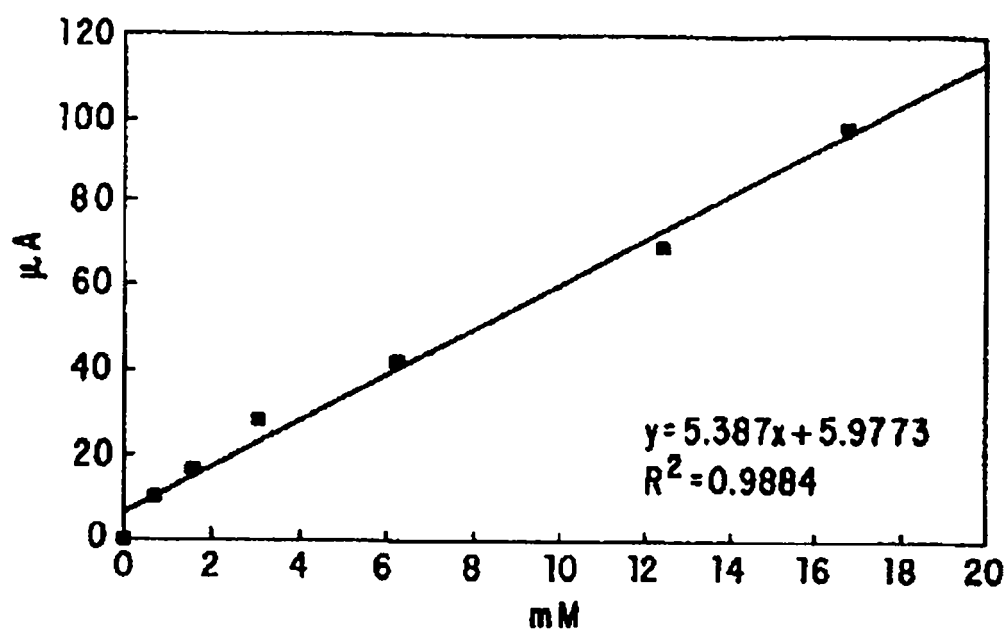


FIG. 3

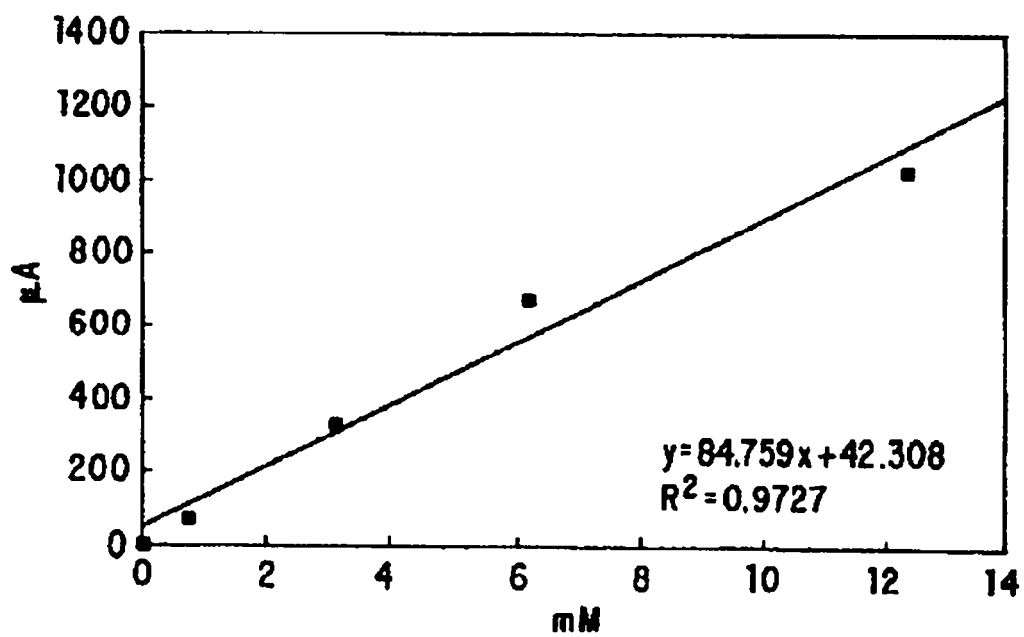


FIG. 4

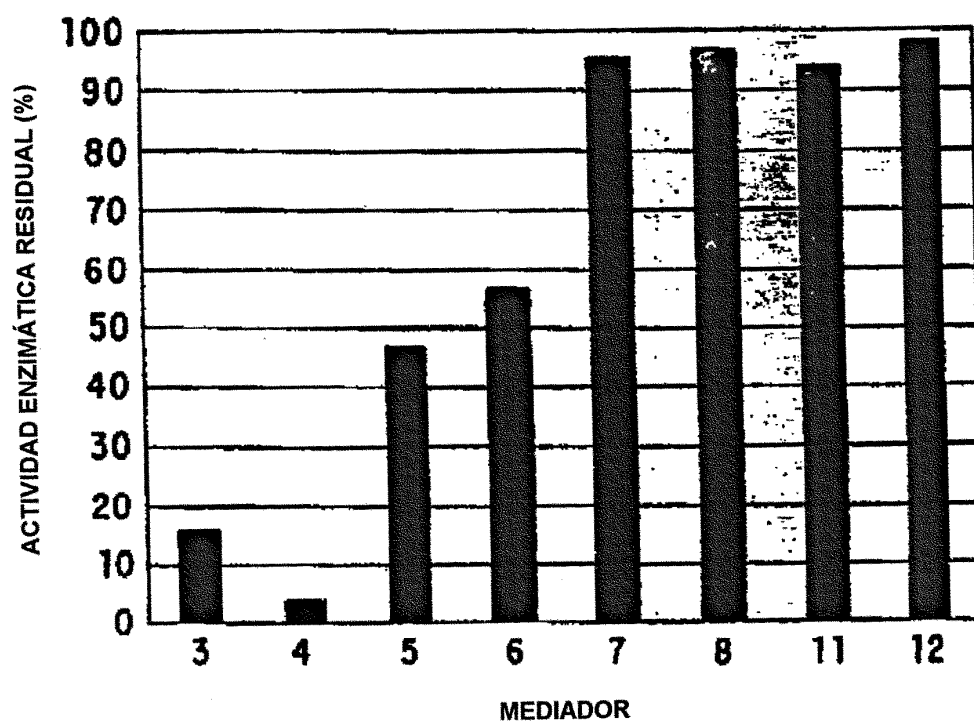


FIG. 5

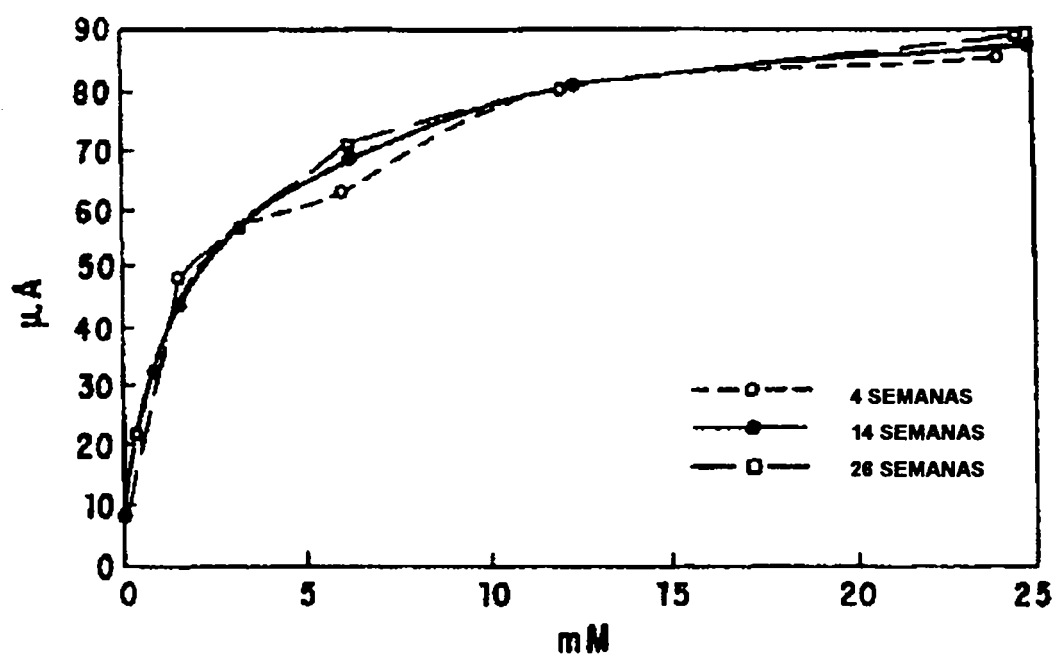


FIG. 6

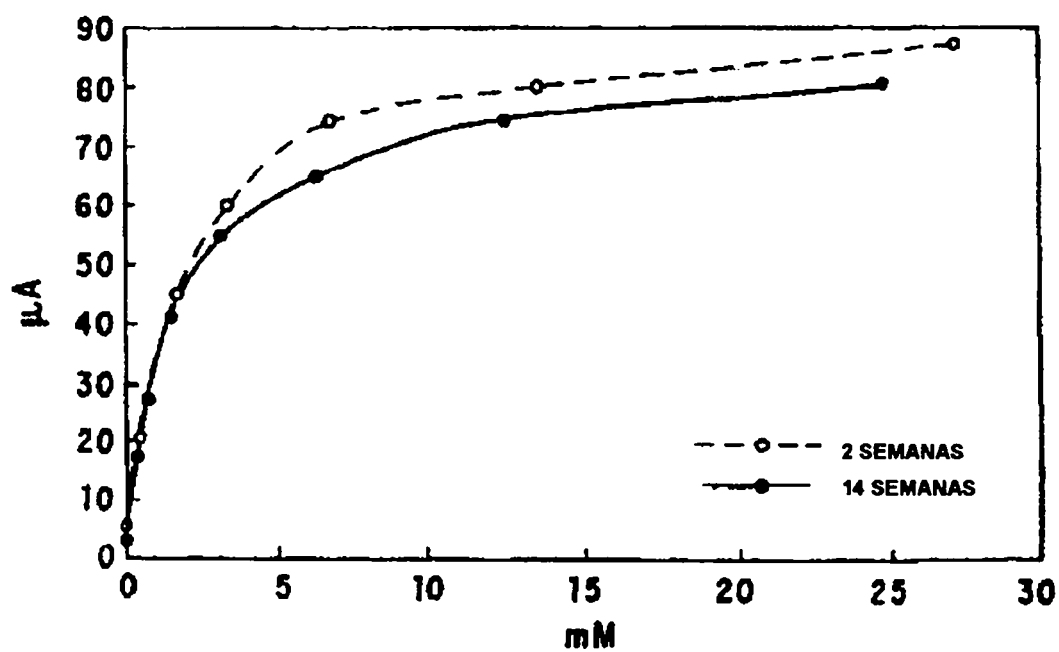


FIG. 7

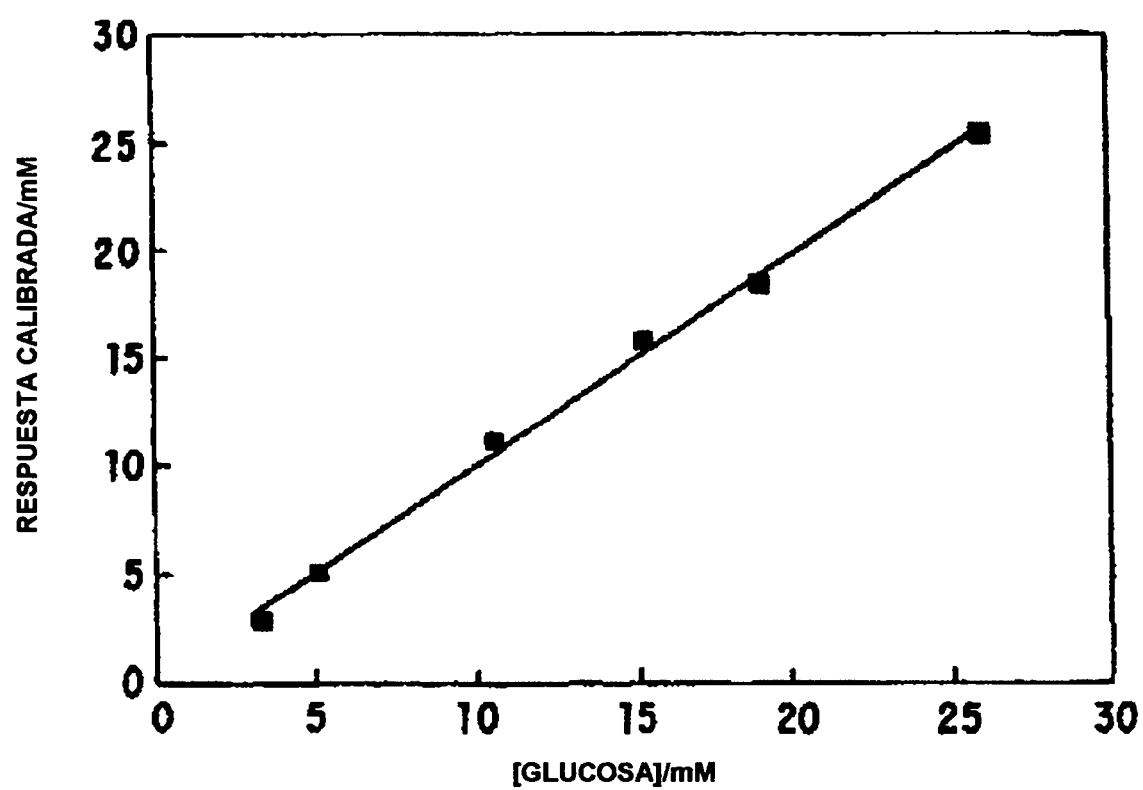


FIG. 8