



CH 690 462 A5



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
ISTITUTO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

11 CH 690 462 A5

51 Int. Cl.⁷: G 01 N 027/327
C 12 Q 001/32
C 12 M 001/34

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

12 FASCICOLO DEL BREVETTO A5

21 Numero della domanda: 01322/95

22 Data di deposito: 08.05.1995

30 Priorità: 03.06.1994 IT RM94A000352

24 Brevetto rilasciato il: 15.09.2000

45 Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 15.09.2000

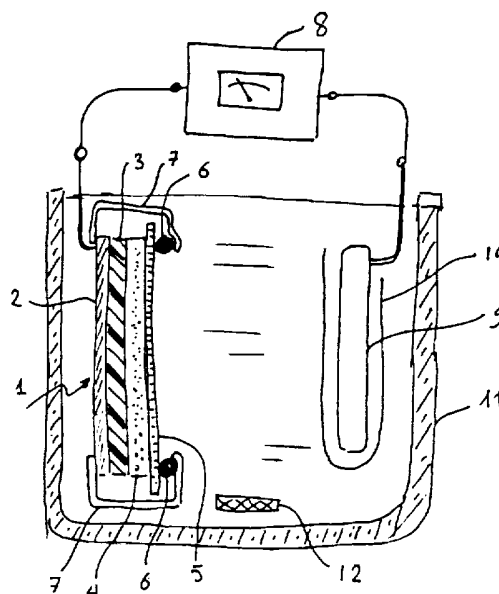
73 Titolare/Titolari:
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.,
Viale Shakespeare, 47, Roma (IT)

72 Inventore/Inventori:
Mazzei, Franco, Roma (IT)
Longo, Antonio, Monza (Milano) (IT)
Gaetani, Franco, Ariccia (Roma) (IT)
Lorenti, Giampiero, Roma (IT)

74 Mandatario:
Kemia S.A., Via Pioda 12 Casella postale 3205,
6901 Lugano (CH)

54 Biosensore elettrochimico per la determinazione della carnitina e di acilcarnitine a catena corta in fluidi corporei, e procedimento di determinazione

57 Biosensore elettrochimico per la determinazione della carnitina e di suoi derivati in fluidi corporei comprendente un elettrodo di base di platino per O_2 e tre diverse membrane legate meccanicamente ad esso di cui una membrana (3) in politetrafluoroetilene, una membrana (4) biocatalitica con gruppi ammino sulla superficie e con un'appropriata quantità di CDH e UPO e glutaraldeide quale agente bifunzionale, ed una membrana (5) per dialisi, disposte per consentire le reazioni di misura ed impedire il deterioramento e/o contaminazioni dell'elettrodo attivo. L'invenzione fornisce inoltre un metodo per la determinazione della carnitina che utilizza tale biosensore e che si basa sulla determinazione amperometrica della carnitina e di suoi derivati con l'impiego di enzima immobilizzato di carnitina deidrogenasi e perossidasi di rafano in accoppiamento con un elettrodo ad ossigeno.



CH 690 462 A5

Descrizione

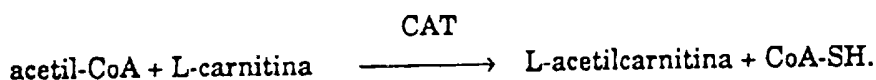
La presente invenzione riguarda un biosensore elettrochimico per la determinazione della carnitina e di acilcarnitine a catena corta in fluidi corporei.

Come è noto, in pazienti affetti da patologie della muscolatura scheletrica, cardiomiopatie e disturbi renali, la concentrazione tissutale e sierica della L-carnitina presenta valori diversi da quelli di norma. Ciò si verifica anche in pazienti epilettici trattati con farmaci anticonvulsivanti quali, ad esempio, l'acido valproico.

Si presenta così la necessità di disporre di dispositivi e di metodiche analitiche mediante le quali possa venire determinata rapidamente ed efficacemente la concentrazione della L-carnitina in fluidi biologici, quali siero ed urine. Tali dispositivi e metodiche sono altresì utili nell'esecuzione di studi di farmacocinetica quando la L-carnitina oppure i suoi derivati vengono somministrati quali farmaci e se ne desidera studiare il destino metabolico.

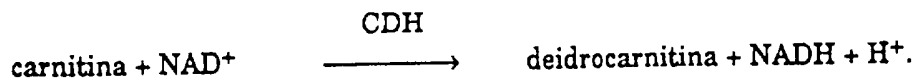
È generalmente riconosciuto che la L-carnitina (acido γ -trimetilammino- β -idrossibutirrico) gioca un ruolo importante nel trasporto degli acidi grassi liberi nei mitocondri. La sua concentrazione viene ad essere alterata nel siero, nell'urina, o nei tessuti di pazienti che presentino patologie renali o cardiomiopatie, ed in pazienti trattati con farmaci anticonvulsivanti quali, ad esempio, l'acido valproico.

I metodi usuali per la determinazione della carnitina e dei derivati della carnitina si basano sull'attività dell'enzima carnitina acetiltransferasi (acetil-CoA:carnitina-O-acetiltransferasi) (CAT). Per la carnitina e le acilcarnitine (queste ultime saggiate dopo un pretrattamento mediante idrolisi), la reazione fondamentale è la seguente



La rivelazione dei prodotti di reazione viene di solito effettuata con mezzi radiochimici e/o con tecniche spettrofotometriche.

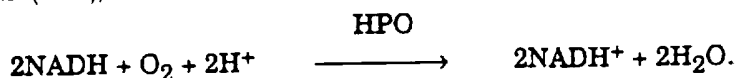
È stato di recente isolato e purificato l'enzima carnitina deidrogenasi (carnitina:NAD⁺ ossidoreduttasi) (CDH), che catalizza la seguente reazione:



La concentrazione di carnitina viene determinata mediante la misurazione della formazione dell'NADH, che può essere effettuata con diversi metodi analitici che includono la ossidazione elettrochimica diretta dell'NADH con l'impiego di un potenziale elettrico applicato. Il valore del potenziale richiesto è tuttavia molto elevato, per cui possono venire ossidate altre specie chimiche eventualmente presenti nel campione e che interferiscono, riducendo drasticamente la specificità del metodo. Inoltre, l'ossidazione diretta dell'NADH è un processo relativamente lento.

Nel contempo, anche altri metodi basati sull'ossidazione elettrochimica dell'NADH in presenza di mediatori quali il 2,6-diclorofenolindofenolo od il ferricianuro sono influenzati dalla presenza di specie chimiche diverse in soluzione.

Un altro metodo elettrochimico si basa sul consumo di ossigeno dovuto all'ossidazione dell'NADH in presenza di perossidasi (HPO), secondo la reazione:



Allo scopo di migliorare i metodi convenzionali di analisi della L-carnitina e di derivati della L-carnitina, la presente invenzione fornisce una cella di misura per la rivelazione di quantitativi significativi di L-carnitina e di suoi derivati che utilizza un elettrodo costituito da un biosensore elettrochimico e che comprende un elettrodo di base ed una molteplicità di membrane legate meccanicamente ad esso, disposte per consentire le reazioni di misura ed impedire il deterioramento e/o contaminazioni dell'elettrodo attivo.

L'invenzione fornisce altresì un metodo originale che utilizza tale biosensore e che si basa sulla determinazione amperometrica della carnitina e di L-acilcarnitine a catena corta con l'impiego di enzima immobilizzato di carnitina deidrogenasi e perossidasi di rafano (donatore: H₂O₂ ossidoreduttasi) in accoppiamento con un elettrodo ad ossigeno di Clark.

La presente invenzione verrà ora descritta con riferimento ad un esempio sperimentale riportato a titolo illustrativo e non limitativo e con riferimento alle Figure dei disegni allegati, in cui:

la fig. 1 mostra schematicamente il biosensore elettrochimico;

la fig. 1A mostra schematicamente una disposizione di misura che utilizza il biosensore in condizioni di misura di tipo statico;

la fig. 1B mostra schematicamente una disposizione simile a quella di fig. 1A, in cui la misura è di tipo dinamico, che utilizza un elettrodo a flusso;

la fig. 1C mostra schematicamente una ulteriore disposizione in cui gli enzimi sono immobilizzati su resina e le misure sono effettuate impiegando un elettrodo a flusso;

la fig. 2 mostra curve di calibrazione del sensore CDH-HPO; e

la fig. 3 mostra il decadimento in funzione del tempo della sensibilità in percentuale del sensore CDH-HPO.

Esempio sperimentale

a) Reagenti

La carnitina deidrogenasi (16 U/mg da *Pseudomonas putida*) è stata fornita dalla SERVA Fein-Biochemica (Heidelberg-New York). L-carnitina idrocloruro ed L-acetilcarnitina idrocloruro sono stati ottenuti dalla Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A. (Pomezia, Italia). Perossidasi di rafano (80 U/mg), NAD⁺ e NADH sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

La glutaraldeide (soluzione al 25%) è stata fornita dalla Merck (Darmstadt, Germania). Le membrane Pall Biodyne B Transfer (membrane in nylon 6,6 con gruppi ammino sulla superficie e porosità di 0,2 µm) sono state fornite dalla Pall Italia s.r.l. (Milano, Italia). Le membrane per dialisi in acetato di cellulosa (spessore 0,0254 mm; taglio MW = 12 000 D) sono state fornite dalla Sigma Chemical Co.

Tutti gli altri reagenti erano di qualità analitica.

b) Preparazione della membrana bioenzimatica

L'immobilizzazione degli enzimi è stata ottenuta collocando sulla membrana di nylon 6,6 con gruppi ammino sulla superficie una appropriata quantità di CDH e HPO (0,137 mg/cm²), e stendendo sulla superficie 10 µl di glutaraldeide (soluzione al 25%) quale agente bifunzionale. La membrana venne lasciata riposare a temperatura ambiente per due ore e quindi lavata con tampone fosfato (0,1 M, pH 7,0) allo scopo di eliminare la glutaraldeide in eccesso.

c) Sensore

Facendo ora riferimento alla fig. 1, verrà descritta in dettaglio la struttura del sensore secondo l'invenzione e la relativa attrezzatura di misura.

Il sensore di L-carnitina, indicato nel suo complesso con 1, è stato assemblato collocando sulla superficie di platino di un elettrodo sensore 2 per O₂ di tipo commerciale (Idronaut s.r.l., Monza, Italia) tre diverse membrane, nel seguente ordine: per prima una membrana 3 in Teflon permeabile ai gas, per eliminare interferenze da sostanze elettricamente attive; successivamente la membrana 4 biocatalitica, preparata come descritto precedentemente, ed infine una membrana 5 per dialisi, per impedire attacchi microbici e/o contaminazione dell'enzima e la dispersione dell'enzima stesso dalla membrana 4.

Un anello toroidale 6 in materiale elastomerico cooperante con elementi a molla 7 è stato impiegato per fissare i tre strati costituenti le predette membrane sulla punta del sensore a perossido di idrogeno.

Con riferimento alla fig. 1A, viene ora mostrata schematicamente la disposizione di misura, che utilizza il biosensore secondo l'invenzione, in cui CDH e HPO sono immobilizzati su membrana e le modalità di misura sono di tipo statico.

Il sensore comprende un elettrodo 101 ad O₂, una membrana selettiva 102, ad esempio in Teflon (politetrafluoroetilene) permeabile ai gas, una membrana biocatalitica 103 preparata come precedentemente descritto ed infine una membrana 104 per dialisi per impedire attacchi microbici e/o contaminazione dell'enzima e dispersione dell'enzima stesso dalla membrana 103.

È inoltre previsto un anello elastico 105 di ritegno dei vari componenti ora descritti.

Una apparecchiatura di termostatazione 106 opera sulla cella 106' in modo noto.

Il terminale attivo dell'elettrodo 101 è collegato ad un misuratore amperometrico 107, ad esempio Orion 931 ionalizer o equivalenti, avente una uscita collegata ad un registratore grafico 108. Può essere opportuno impiegare un agitatore di tipo magnetico, di per sé noto, indicato schematicamente con 109.

Con riferimento alla fig. 1B, viene mostrata una disposizione simile a quella di fig. 1A in cui la misura è di tipo dinamico, che utilizza un elettrodo a flusso.

In tale disposizione, 110 indica l'ingresso del fluido sotto misura, 111 il sensore precedentemente descritto, 112 la cella termostata mediante una unità di termostatazione 113. Con 114 viene indicata una pompa di circolazione quale una pompa di tipo peristaltico, che scarica il fluido in 115 dopo le operazioni di misura.

Anche in questa disposizione l'elettrodo attivo del sensore è collegato ad un misuratore amperometrico 116 la cui uscita è collegata ad un registratore grafico 117.

Nella fig. 1C è mostrata una ulteriore disposizione in cui l'enzima è immobilizzato su una resina quale Sephadex (polidestragano).

In tale figura, con 120 è indicato l'ingresso del fluido da analizzare, che perviene ad un bioreattore 121 e da questo alla cuvetta 122 comprendente il sensore 123 secondo l'invenzione.

5 Sia il bioreattore 121, sia la cuvetta 122, sono termostatati tramite una unità 124 di termostatazione di tipo noto.

L'uscita dalla cuvetta 122 è condotta ad una pompa peristaltica 124 collegata ad uno scarico 125 per il fluido, dopo che questo è stato sottoposto a misura.

10 L'elettrodo attivo del sensore 123 è collegato anche in questo caso al misuratore amperometrico 125 la cui uscita è collegata ad un registratore grafico 127.

d) Esperimenti amperometrici

15 Sono state effettuate misure amperometriche collegando il bioelettrodo precedentemente descritto ad un rivelatore amperometrico (ABD, Universal Sensor Inc., Lo Angeles, U.S.A.). È stato applicato un potenziale costante pari a -650 mV tra il catodo di platino e l'anodo Ag/AgCl dell'elettrodo ad ossigeno. La camera dell'elettrodo è stata riempita con una soluzione di riempimento di KH_2PO_4 e KCl entrambi $0,1$ M, $\text{pH} = 7,4$. Gli esperimenti sono stati eseguiti in $2,5$ mL di tampone glicina-KOH $0,1$ M, in una cella di vetro termostata a 37°C in modo convenzionale mediante circolazione forzata di acqua. Du-

20 rante l'operazione sono stati impiegati agitatori magnetici. Il sensore è stato impiegato per determinare la concentrazione del substrato aggiungendo il campione, se necessario convenientemente diluito, alla soluzione campione.

I campioni contenenti derivati di L-acilcarnitina sono stati saggiati dopo pretrattamento mediante idrolisi alcalina necessario per convertire la L-acilcarnitina in L-carnitina.

25

e) Misurazioni di NADH

Il sensore è stato immerso in una soluzione tampone di glicina-KOH $0,1$ M sottoposta ad agitazione, $\text{pH} = 8,5$, con cloruro manganoso $0,4$ mM, posta in una cella termostata.

30 Dopo la stabilizzazione del segnale, sono state aggiunte ogni 5 minuti soluzioni standard di NADH; il segnale registrato era proporzionale alla concentrazione di NADH nella soluzione.

f) Misurazioni di L-carnitina

35 Il sensore è stato immerso in una soluzione tampone glicina KOH $0,1$ M sottoposta ad agitazione, $\text{pH} = 8,5$ contenente NAD^+ $0,4$ mM e cloruro manganoso $0,4$ mM, posta in una cella termostata.

Dopo la stabilizzazione del segnale del sensore, sono state aggiunte soluzioni standard di L-carnitina ogni 5 minuti. È stato ottenuto un segnale che era proporzionale alla concentrazione di L-carnitina nella cella di misura.

40 I campioni contenenti L-acetilcarnitina sono stati saggiati dopo un pretrattamento mediante idrolisi necessario per convertire la L-acetilcarnitina in L-carnitina.

f) Risultati

45 Le fig. 2 e 3 mostrano rispettivamente grafici relativi alla calibrazione del sensore e all'andamento delle prestazioni del sensore in funzione del tempo.

In particolare, la fig. 2 mostra un grafico di calibrazione ricavato nella determinazione di tre diversi substrati: NADH; L-carnitina e L-acetilcarnitina e la fig. 3 mostra la variazione delle prestazioni del sensore in funzione del tempo, valutate contro una soluzione standard di L-carnitina ($0,5$ mM). I dati riportati nella fig. 3 si riferiscono ad un sensore utilizzato giornalmente per 15–20 saggi al giorno, inclusa la calibrazione. Ovviamente, la vita utile del sensore può venire prolungata riducendo il numero complessivo di saggi.

50 Le tabelle 1, 2 e 3 che seguono mostrano rispettivamente la caratterizzazione analitica del sensore CDH-HPO in soluzioni standard di NADH; la caratterizzazione analitica del sensore CDH-HPO in soluzioni standard di L-carnitina; e la caratterizzazione analitica del sensore CDH-HPO in soluzioni standard di L-acetilcarnitina.

60

65

Tabella I

Caratterizzazione analitica del sensore Cl⁻H-HP0 in soluzioni standard di NADH

5	Temperatura di analisi	37°C
	pH	8,5
	Tampone	glicina-KOH 0,1 mol/L
10	Tempo di risposta	3 min
	Equazione del grafico di calibrazione	$Y = 28,52 X - 6,62$ $Y = nA$; $X = \log [\text{NADH}] \text{ (mol/L)}$
	Intervallo di linearità	$5,0 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$
15	Coefficiente di correlazione	0,9993
	Limite inferiore di rivelazione	$2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
	Riproducibilità delle misurazioni	0,7%
20	(come deviazione standard raggruppata nell'intervallo di linearità)	

Tabella II

Caratterizzazione analitica del sensore CDH-HPO in soluzioni standard di L-carnitina

25	Temperatura di analisi	37°C
	pH	8,5
30	Tampone	glicina-KOH 0,1 mol/L
	Tempo di risposta	3 min
	Equazione del grafico di calibrazione	$Y = 8,62 + 0,55 X$ $Y = nA$; $X = \log [\text{L-carnitina}] \text{ (mol/L)}$
35	Intervallo di linearità	$9,9 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$
	Coefficiente di correlazione	0,9989
	Limite inferiore di rivelazione	$5,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
40	Riproducibilità delle misurazioni	0,9%
	(come deviazione standard raggruppata nell'intervallo di linearità)	

Tabella III

Caratterizzazione analitica del sensore CDH-HPO in soluzioni standard di L-acetilcarnitina

45	Temperatura di analisi	37°C
50	pH	8,5
	Tampone	glicina-KOH 0,1 mol/L
	Tempo di risposta	3 min
55	Equazione del grafico di calibrazione	$Y = 8,62 + 0,55 X$ $Y = nA$; $X = \log [\text{acetilcarnitina}] \text{ (mol/L)}$
	Intervallo di linearità	$9,9 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$
	Coefficiente di correlazione	0,9983
60	Limite inferiore di rivelazione	$5,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
	Riproducibilità delle misurazioni	1,2%
	(come deviazione standard raggruppata nell'intervallo di linearità)	

65

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad una sua forma di realizzazione preferita, ma si comprenderà che variazioni e modifiche potranno essere apportate in pratica da parte di un esperto nel ramo senza uscire dall'ambito di protezione della presente privativa industriale.

5 Rivendicazioni

1. Biosensore elettrochimico per la determinazione della carnitina e di acilcarnitine a catena corta in fluidi corporei, caratterizzato dal fatto di comprendere una struttura inclusa in una cella di misura per la rivelazione di quantitativi significativi di L-carnitina e di suoi derivati che utilizza un elettrodo costituito da un biosensore elettrochimico e che comprende un elettrodo di base ed una molteplicità di membrane legate meccanicamente ad esso, disposte per consentire le reazioni di misura ed impedire il deterioramento e/o contaminazioni dell'elettrodo attivo.
2. Biosensore secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di comprendere una membrana bioenzimatica comprendente una membrana con gruppi ammino sulla superficie su cui è collocata un'adeguata quantità di CDH e HPO e glutaraldeide quale agente bifunzionale, detta membrana essendo collocata in una struttura stratificata disposta sulla superficie di platino di un elettrodo sensore per ossigeno in una configurazione che comprende una prima membrana in materiale sintetico permeabile ai gas, la membrana bioenzimatica ed infine una membrana per dialisi quale barriera anticontaminazione ed antidisersione.
3. Biosensore secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che la struttura stratificata viene bloccata meccanicamente sull'elettrodo sensore per ossigeno mediante una disposizione di ritegno elastica.
4. Biosensore secondo la rivendicazione 2 o 3, caratterizzato dal fatto che la membrana permeabile ai gas è costituita da una membrana di politetrafluoroetilene.
5. Biosensore secondo la rivendicazione 2 o 3, caratterizzato dal fatto che la membrana per dialisi è costituita da una membrana di acetato di cellulosa.
6. Biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che l'elettrodo comprende un anodo Ag/AgCl.
7. Biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che la misura è di tipo amperometrico.
8. Biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 a 5, caratterizzato dal fatto che la membrana bioenzimatica comprende un enzima immobilizzato di carnitina deidrogenasi e perossidasi di rafano.
9. Biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che è previsto per la misura in condizioni di tipo statico.
10. Biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 8, caratterizzato dal fatto che è previsto per la misura a flusso mediante circolazione a ciclo aperto del fluido biologico sotto misura.
11. Biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 8, caratterizzato dal fatto di comprendere una resina polidestran per immobilizzare gli enzimi e dal fatto che è previsto per la misura a flusso mediante circolazione a ciclo aperto del fluido biologico sotto misura.
12. Procedimento per la determinazione analitica di L-carnitina e di suoi derivati partendo da un fluido corporeo e comprendente una fase di determinazione amperometrica, che utilizza una cella di misura che include un biosensore secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti.

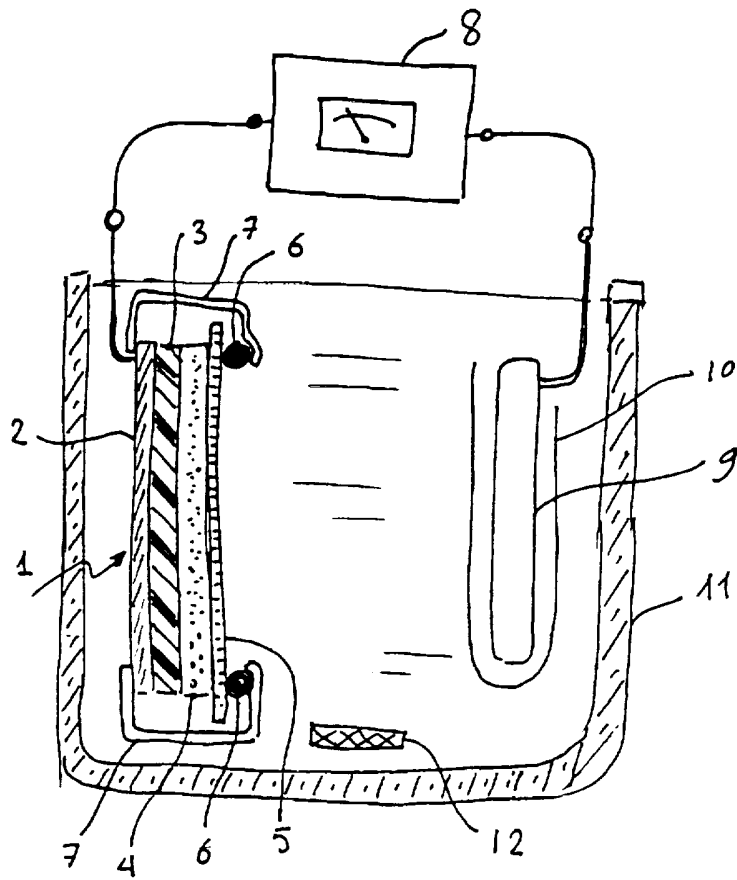


FIG 1

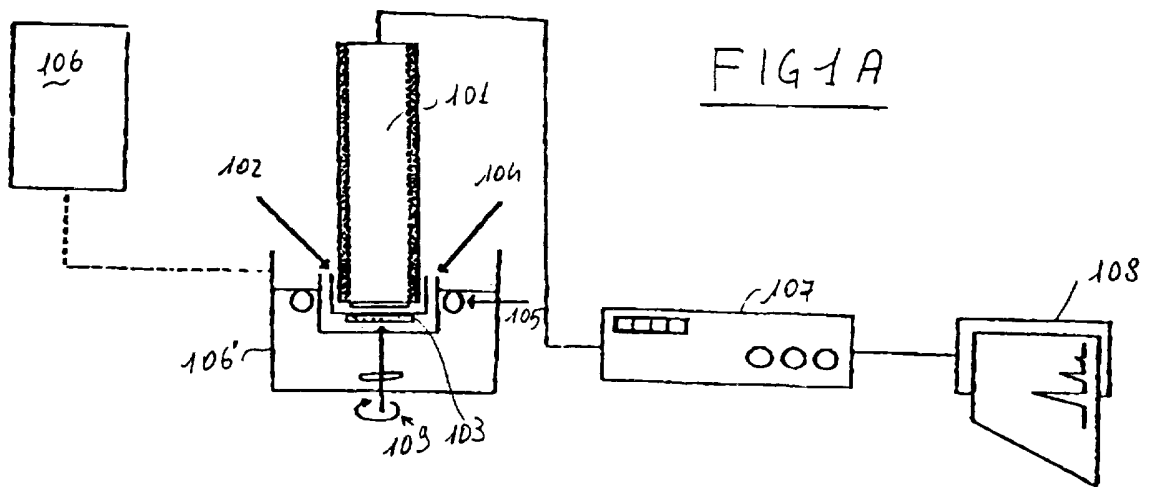
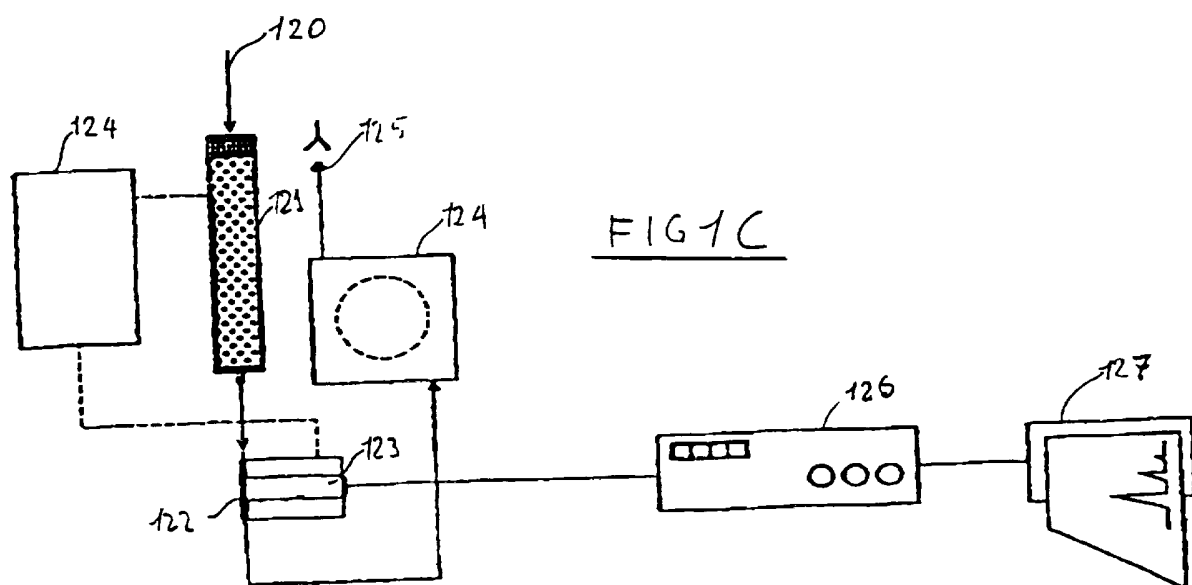
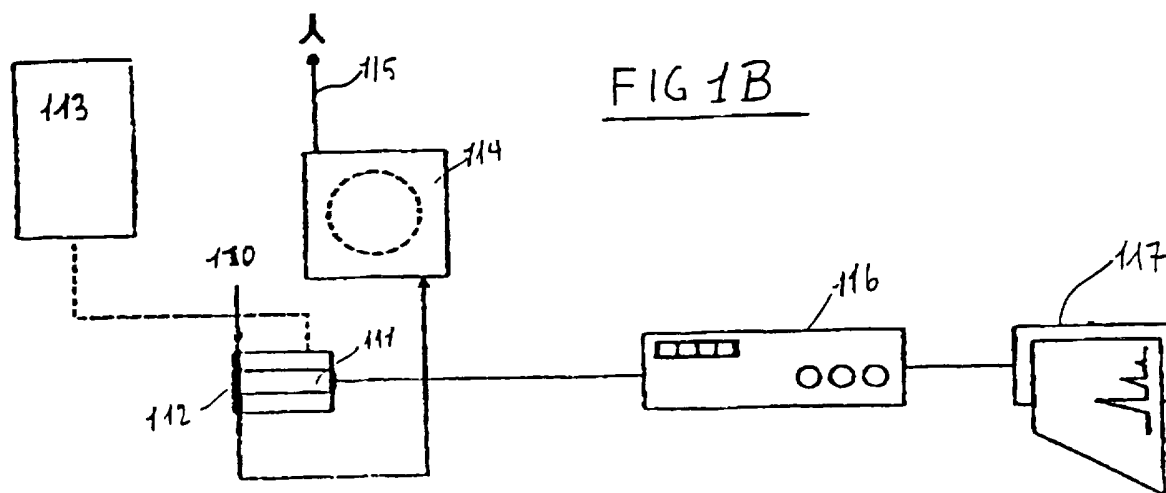


FIG 1A



CURVE DI CALIBRAZIONE DEL SENSORE CDH-HPO

glicina-KOH 0,1 M pH=8,5; T=37°C

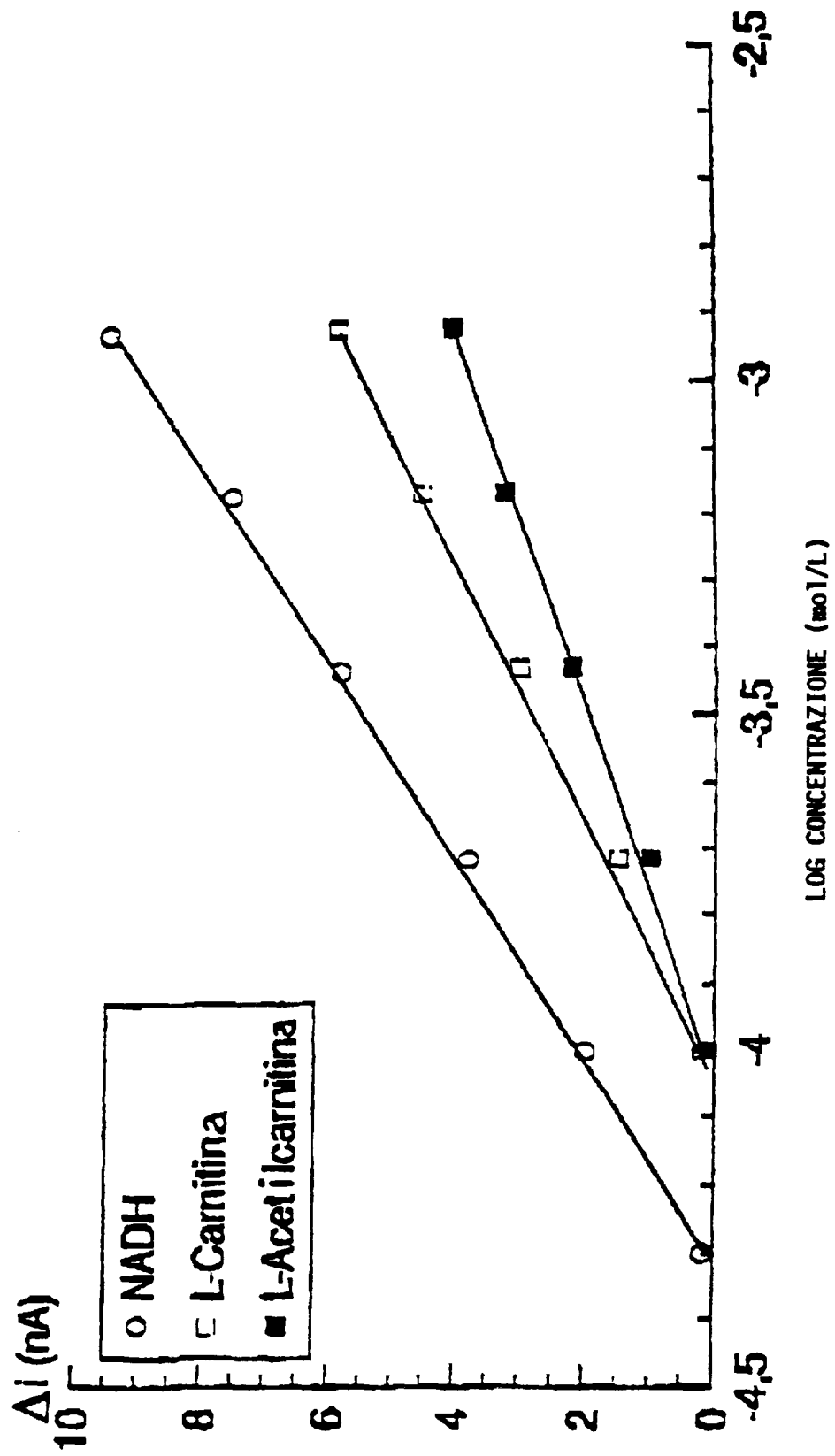


FIGURA 2

SENSORE CDH-HPO
VALUTAZIONE DEL TEMPO DI VITA

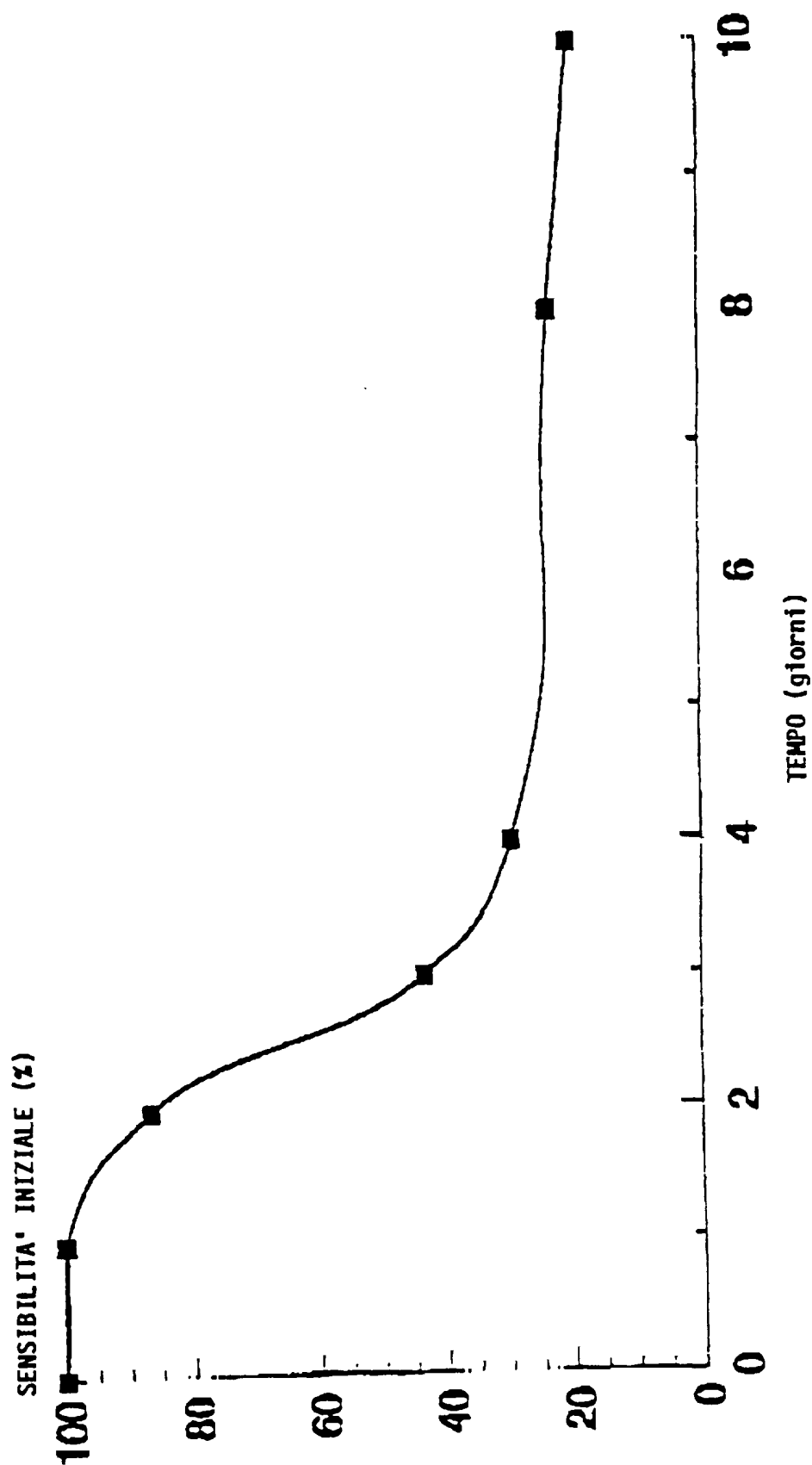


FIGURA 3