(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 533 375**

(51) Int. CI.:

G01N 27/327 (2006.01)
G01N 27/416 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11765650 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2554982**

(54) Título: **Biosensor**

(30) Prioridad:

31.03.2010 JP 2010081435

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2015

(73) Titular/es:

CCI CORPORATION (50.0%)
12, Banch Shinhazama Seki City
Gifu Prefecture 501-3923 , JP y
ULTIZYME INTERNATIONAL LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

NISHIWAKI, NAOHIDE;
MIYAMOTO, SHOICHI;
INAGAWA, AKITSUGU y
MURASE, HIRONOBU

(74) Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

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

Biosensor

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un biosensor, en particular, a un biosensor para medir la concentración de grasa neutra. La invención se refiere específicamente a un biosensor que puede determinar la concentración de un componente específico en una muestra específica, tal como una muestra de un organismo vivo, cuantitativa y rápidamente mediante la utilización de una reacción enzimática, en particular, siendo dicho biosensor para medir la concentración de grasa neutra.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

En los últimos años, los biosensores han sido utilizados en el sector de la medicina y otros. Los objetivos a medir mediante los biosensores son diversas sustancias químicas, ejemplos de las cuales incluyen moléculas de bajo peso molecular y de alto peso molecular. Según el objetivo a medir, se ha avanzado en el desarrollo de un biosensor que tiene varias funciones.

Hasta la fecha, son conocidos biosensores que pueden obtener fácilmente una determinación cuantitativa sin diluir o remover un componente (sustrato) específico contenido en una muestra de un organismo vivo, o de un alimento. Se ha propuesto, por ejemplo, un biosensor obtenido mediante: formar un sistema de electrodos que tiene por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo en una placa base de aislamiento; colocar, sobre este sistema de electrodos, una capa de reacción enzimática que contiene una enzima redox y un receptor de electrones, inmovilizados cada uno con un agente de inmovilización tal como un polímero hidrófilo; colocar a continuación una capa filtrante (capa de eliminación de corpúsculos sanguíneos) sobre esta capa de reacción enzimática; y cubrir adicionalmente esta capa filtrante, desde arriba, con una tapa para integrar estos elementos en una unidad.

Mediante dicho biosensor, la concentración de sustrato en una muestra se determina cuantitativamente de la siguiente manera: en primer lugar, se vierte una solución de la muestra, tal como sangre, sobre la capa filtrante, y el filtrado resultante penetra en la capa de reacción enzimática. De este modo, la enzima redox y el receptor de electrones se disuelven en la solución de la muestra, de manera que una reacción enzimática avanza entre el sustrato y la enzima. Mediante esta reacción enzimática, el sustrato se oxida y simultáneamente el receptor de electrones se reduce. Después de la finalización de la reacción enzimática, el receptor de electrones reducido se oxida electroquímicamente. A partir del valor de la corriente de oxidación obtenido en este momento, se puede calcular la concentración del sustrato en la solución de la muestra.

Como un procedimiento para medir la grasa neutra con un biosensor se conoce, por ejemplo, un procedimiento de determinación cuantitativa de la grasa neutra en una muestra, tal como sigue: en primer lugar, la grasa neutra contenida en la solución de la muestra se descompone, por ejemplo, en ácido graso libre y glicerina con lipoproteína lipasa (LPL). Tal como se muestra en las fórmulas (1) y (2) descritas a continuación, la glicerina generada se puede determinar cuantitativamente, utilizando glicerina quinasa (GK), y glicerina-3-ácido fosfórico oxidasa (GPO) o glicerina-3-ácido fosfórico deshidrogenasa (GPDH). En otras palabras, la glicerina se puede determinar cuantitativamente midiendo la disminución en el receptor de electrones en forma oxidada, el aumento en el receptor de electrones en forma reducida, o la cantidad de ácido fosfórico dihidroxiacetona, tal como se muestra en las fórmulas siguientes. En particular, midiendo electroquímicamente la magnitud del aumento del receptor de electrones en forma reducida, se puede determinar cuantitativamente la glicerina.

[Fórmula química 1]

$$\text{Glicerina} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{glicerina-3-ácido fosfórico} \qquad (1)$$

Glicerina-3-ácido fosfórico + receptor de electrones en forma oxidada

$$\xrightarrow{\text{GPO/GPDH}} \text{ácido fosfórico dihidroxiacetona} + \text{receptor de electrones en forma reducida} \qquad (2)$$

Sin embargo, cada una de las tres enzimas, es decir, lipoproteína lipasa (LPL), glicerina quinasa (GK) y glicerina-3-ácido fosfórico oxidasa (GPO), que se utilizan en la medición de grasa neutra mencionada anteriormente, son costosas.

Para resolver este problema, se da a conocer (bibliografía de patentes 1) un biosensor en el que se utilizan, como enzimas utilizadas en la reacción de descomposición de grasa neutra, dos de la enzima de descomposición de grasa neutra y deshidrogenasa de glicerina (GLDH), para disminuir los costes de las enzimas. Sin embargo, el biosensor

de la bibliografía de patentes 1 no es suficiente en cuanto a tiempo de medición y a precisión. Por lo tanto, es deseable aumentar la precisión y realizar más rápidamente la medición.

Al mismo tiempo, como un procedimiento que utiliza una única enzima sin el resultado deL oxígeno disuelto, se conoce un procedimiento como el mostrado en la formula (3) descrita a continuación, en el que se utiliza NAD+ deshidrogenasa de glicerina dependiente de glicerina (NAD-GLDH).

[Fórmula química 2]

$$\text{Glicerina + portador de electrones en forma oxidada} \xrightarrow{\text{NAD-GLDH}} \text{dihidroxiacetona + portador de electrones en forma reducida} \quad (3)$$

Sin embargo, esta reacción requiere la adición de NAD+, que es costoso.

Como un procedimiento para determinar la glicerina de manera cuantitativa, sencilla y económica, se conoce un procedimiento que utiliza poliol deshidrogenasa en que se incorpora pirroloquinolina quinona como un grupo prostético (PQQ-PDH). El procedimiento se lleva a cabo de acuerdo con la reacción de la formula (4) descrita a continuación; por lo tanto, el procedimiento tiene ventajas, por ejemplo, porque la determinación no se ve afectada por el oxígeno disuelto, la reacción es simple, es innecesaria la utilización de diversas enzimas, y no se requiere la adición de NAD+ costosa.

[Fórmula química 3]

$$\text{Glicerina + portador de electrones en forma oxidada} \xrightarrow{\text{PQQ-PDH}} \text{dihidroxiacetona + portador de electrones en forma reducida} \quad (4)$$

Considerando las cuestiones anteriores, para proporcionar un biosensor capaz de medir la grasa neutra con gran precisión en poco tiempo, se han realizado hasta la fecha informes sobre biosensores, en cada uno de los cuales están situadas una enzima de descomposición de grasa neutra y deshidrogenasa de glicerina en capas diferentes, respectivamente (bibliografía de patentes 2 y 3). El biosensor de la bibliografía de patentes 2 posee una estructura que tiene, en un electrodo, una capa polímera que contiene GLDH y un polímero hidrófilo, y una capa filtrante que contiene una enzima de descomposición de grasa neutra soportada en un papel de filtro, estando laminadas a su vez estas dos capas de reacción. El biosensor de la bibliografía de patentes 3 se caracteriza porque posee una estructura que tiene, en un electrodo, una capa polímera que contiene GLDH y un polímero hidrófilo, y una capa de tela no tejida que contiene una enzima de descomposición de grasa neutra soportada en una tela no tejida, estando laminadas a su vez estas dos capas de reacción.

Técnica anterior

Bibliografía de patentes

Bibliografía de patente 1: folleto WO 2006/104077

Bibliografía de patente 2: solicitud de patente japonesa a inspección pública (JP-A) número 2009-244013.

Bibliografía de patente 3: JP-A-2009-244014.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

Problema técnico

Sin embargo, incluso según los biosensores descritos en la bibliografía de patentes 2 y 3, el tiempo de medición es de dos minutos en el ejemplo (párrafo [0100] de la bibliografía de patentes 2, y párrafo [0100] de la bibliografía de patentes 3). En conclusión, el tiempo de medición no es aún lo suficientemente corto. Por lo tanto, es deseable un biosensor que pueda realizar la medición en un tiempo más corto.

De este modo, la invención se ha realizado para resolver estos problemas, y un objetivo de la misma es dar a conocer un biosensor que pueda medir la concentración de un componente específico, tal como grasa neutra, en una muestra en un periodo de tiempo corto.

Solución al problema

Los inventores han investigado intensamente para resolver los problemas. Como resultado, los inventores han encontrado que cuando se fabrica una capa de reacción en una estructura bicapa, sin utilizar un portador tal como un papel de filtro o una tela no tejida, mediante la formación de una capa que contiene enzimas de descomposición de lípidos sobre una capa que contiene enzimas redox, aplicando una solución que contiene enzimas de descomposición de lípidos directamente sobre la capa que contiene enzimas redox, se pueden mejorar las velocidades de las reacciones mediante las dos enzimas. La invención se ha conseguido basándose en este descubrimiento.

Por consiguiente, el objetivo mencionado anteriormente se consigue mediante un biosensor que comprende una placa base de aislamiento, un sistema de electrodos que contiene, por lo menos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, y está formado sobre la placa base de aislamiento, y una sección de suministro de muestras formada sobre el sistema de electrodos, en el que la sección de suministro de muestras tiene una capa de reacción que comprende: una primera capa de reacción formada en el sistema de electrodos y que contiene, por lo menos, una enzima redox en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN) como un grupo prostético; y una segunda capa de reacción formada aplicando, sobre la primera capa de reacción, una solución que incluye una enzima de descomposición de lípidos.

Resultados ventajosos de la invención

La utilización del biosensor de la invención hace posible medir la concentración de un componente objetivo en un periodo de tiempo corto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una vista, en perspectiva, con las piezas desmontadas, de una realización del biosensor de la invención.

La figura 2 es una vista, en sección, del biosensor de la figura 1.

La figura 3 es una vista, en perspectiva, con las piezas desmontadas, de otra realización del biosensor de la invención.

La figura 4 es una vista, en sección, del biosensor de la figura 3.

La figura 5 es un gráfico que muestra resultados medidos de la concentración de grasa neutra en sangre entera, en cada uno de los ejemplos 1 y 2, y en el ejemplo comparativo.

La figura 6 es un gráfico que muestra resultados medidos de la concentración de grasa neutra en sangre entera, en cada uno de los ejemplos 3 y 4.

La figura 7 es un gráfico que muestra resultados medidos de la concentración de grasa neutra en sangre entera, en cada uno de los ejemplos 5 y 6.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES

Según la invención, se suministra un biosensor que comprende una placa base de aislamiento, un sistema de electrodos que contiene por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, y está formado en la placa base de aislamiento, y una sección de suministro de muestras formada en el sistema de electrodos, en el que la sección de suministro de muestras tiene una capa de reacción que incluye: una primera capa de reacción formada en el sistema de electrodos y que contiene por lo menos una enzima redox que incluye, como un grupo prostético, pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD), o mononucleótido de flavina (FMN) (en la descripción, la capa se puede denominar simplemente como "primera capa de reacción"); y una segunda capa de reacción formada aplicando, sobre la primera capa de reacción, una solución que contiene una enzima de descomposición de lípidos (en la descripción, la capa se puede denominar simplemente como "segunda capa de reacción"). La invención se caracteriza porque la capa de reacción está fabricada en una estructura bicapa que incluye la primera capa de reacción que contiene enzima redox y la segunda capa de reacción que contiene enzima de descomposición de lípidos, y la segunda capa de reacción está formada aplicando directamente una solución que contiene enzima de descomposición de lípidos sobre la primera capa de reacción.

Tal como se ha descrito anteriormente, hasta la fecha se han realizado informes acerca de biosensores: las dos enzimas mencionadas anteriormente se han mezclado entre sí para ser fabricadas en una única capa en un biosensor tal como se describe en la bibliografía de patente 1; y tal como se describe en la bibliografía de patentes 2 y 3, en un biosensor, una estructura de capas bicapa que tiene una capa polímera que contiene una enzima redox y un polímero soluble en agua, y una capa filtrante o capa de tela no tejida dispuesta sobre la capa polímera y

compuesta de un portador, tal como un papel de filtro o tela no tejida, y este portador lleva por separado una enzima de descomposición neutra. En el caso del biosensor de la bibliografía de patente 1, de entre estos biosensores, la enzima redox, tal como deshidrogenasa de glicerina (GLDH), tiene generalmente una solubilidad menor que la enzima de descomposición de lípidos. Este aspecto afecta a la enzima de descomposición de lípidos; por lo tanto, las reacciones basadas en las dos enzimas no avanzan rápidamente y entonces se modifican las velocidades de reacción. Parece que esto tiene como resultado un retraso de las reacciones enzimáticas en el conjunto del sensor, de manera que no se puede reducir suficientemente el tiempo de medición. En el caso de los biosensores de la bibliografía de patentes 2 y 3, dado que la enzima de descomposición de lípidos está contenida por separado en el papel de filtro o en la tela no tejida, la solubilidad de la enzima redox es buena. Sin embargo, se requiere mucho tiempo para hacer que una muestra penetre en la capa polímera. Parece que esto tiene asimismo como resultado un retraso de las reacciones enzimáticas en el conjunto del sensor, de manera que no se puede reducir suficientemente el tiempo de medición.

Por el contrario, en la invención, una solución que contiene una enzima de descomposición de lípidos es aplicada sobre la primera capa de reacción que contiene una enzima redox, para formar la segunda capa de reacción directamente sobre la primera capa de reacción. Por consiguiente, cuando se hace pasar una muestra que contiene grasas, tales como grasa neutra, a través de la sección de suministro de muestras para ponerla en contacto con la enzima de descomposición de lípidos en la segunda capa de reacción, esta enzima de descomposición de lípidos se disuelve rápidamente dado que la enzima de descomposición de lípidos tiene una solubilidad elevada. Como resultado, esta enzima descompone las grasas de la muestra para generar ácidos grasos libres, y glicerina. Esta reacción se completa dentro del periodo de tiempo requerido, equivalente al tiempo requerido para la finalización de la disolución de la enzima de descomposición de lípidos. A continuación, dado que la enzima redox está presente en la primera capa de reacción, entre la segunda capa de reacción y los electrodos, después de la finalización de la disolución de la enzima de descomposición de lípidos en la segunda capa de reacción, la enzima redox comienza a disolverse. La muestra en la que se ha descompuesto el lípido penetra rápidamente en la primera capa de reacción, la muestra disuelve la enzima redox, y la glicerina generada produce un portador de electrones en forma reducida. A continuación, se mide electroquímicamente la magnitud del aumento en el portador de electrones en forma reducida. Por esta razón, según el biosensor de la invención, se pueden determinar cuantitativamente grasas en una muestra en un periodo de tiempo corto. Los mecanismos respectivos en la bibliografía de patentes 1 a 3, y el mecanismo de la invención se basan en deducciones, y la invención no está limitada por este mecanismo.

En lo que sigue, se describirán específicamente realizaciones del biosensor de la invención haciendo referencia a los dibujos. La invención no está limitada a las realizaciones siempre que las posibles realizaciones no se aparten del alcance de las reivindicaciones. En los dibujos, cualquier relación dimensional puede estar exagerada siendo diferente a la relación real, para mayor comodidad de la explicación.

La figura 1 es una vista, en perspectiva, con las piezas desmontadas, que muestra una de las realizaciones del biosensor de la invención. La figura 2 es una vista, en sección, del biosensor de la figura 1. En la presente descripción, el biosensor mostrado en las figuras 1 y 2 se puede denominar como "primer biosensor".

Tal como se muestra en las figuras 1 y 2, un sistema de electrodos que incluye el electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4- está formado en una placa base de aislamiento -1-, que se puede denominar simplemente como "placa base" en la descripción. El sistema de electrodos tiene que incluir, por lo menos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. Por lo tanto, se puede suprimir el electrodo de referencia -3-. Están dispuestas capas de adhesivo -6- en los bordes de la placa base de aislamiento -1-. El electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4- funcionan como medios para la conexión eléctrica del biosensor. El electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4- pueden estar formados, cada uno, como un electrodo que tiene una configuración deseada haciendo referencia adecuadamente a descubrimientos conocidos convencionalmente, por ejemplo, sobre serigrafía, pulverización catódica o algún otro procedimiento, o combinando dos o más de los mismos.

Una capa de aislamiento -5- está formada en el electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4-, formados cada uno sobre la placa base de aislamiento -1- para dejar al descubierto el sistema de electrodos. La capa de aislamiento -5- funciona como un medio de aislamiento para impedir un cortocircuito entre los electrodos individuales. El procedimiento para formar la capa de aislamiento no está particularmente limitado. Por lo tanto, la capa puede estar formada mediante un procedimiento conocido convencionalmente, tal como un procedimiento de serigrafía o un procedimiento de unión.

La zona de trabajo del electrodo de trabajo -2-1-, la zona de trabajo del electrodo de referencia -3-1- y la zona de trabajo del contraelectrodo -4-1- están formadas de manera que emparedan la capa de aislamiento -5-. En la zona de trabajo del electrodo de trabajo -2-1-, la zona de trabajo del electrodo de referencia -3-1- y la zona de trabajo del contraelectrodo -4-1- que constituyen el sistema de electrodos, están formadas sucesivamente la primera capa de reacción -8- y la segunda capa de reacción -9-. En la figura 1, la sección de suministro de muestras se compone de la primera capa de reacción -8-, la segunda capa de reacción -9- y un espacio -S- situado entre la segunda capa de reacción -9- y la tapa -7-.

La primera capa de reacción -8- contiene, por lo menos, una enzima redox en la que está incorporada, por lo menos, pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN), como un grupo prostético (en adelante, la enzima redox se puede denominar como "enzima redox en la invención").

La segunda capa de reacción -9- está formada sobre la primera capa de reacción -8-, y está formada aplicando sobre la misma, por lo menos, una solución que contiene enzima de descomposición de lípidos. En esta descripción, "la segunda capa de reacción está formada aplicando una solución que contiene enzima de descomposición de lípidos" significa que una solución que contiene una enzima de descomposición de lípidos está aplicada directamente sobre la primera capa de reacción, sin transportar la enzima de descomposición de lípidos mediante un portador, tal como un papel de filtro o una tela no tejida, y a continuación se seca para formar una película aplicada.

Las zonas de trabajo (-2-1-, -3-1- y -4-1-) funcionan como un medio de aplicación de potencial, para aplicar un potencial eléctrico a una muestra en la primera capa de reacción -8-, y como un medio de detección de corriente para detectar un flujo de corriente en la muestra cuando se utiliza el biosensor. El electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4- que incluyen las zonas de trabajo (-2-1-, -3-1- y -4-1-), respectivamente, se pueden denominar como el electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4-, respectivamente. El electrodo de trabajo -2- y el contraelectrodo -4- trabajan en forma de un par cuando se utiliza el biosensor, y funcionan como un medio de medición de la corriente para medir una corriente de oxidación (corriente de respuesta) que circula cuando se aplica el potencial a la muestra en la primera capa de reacción -8-. Cuando se utiliza el biosensor, el electrodo de referencia -3- se utiliza como una base de referencia para aplicar un potencial predeterminado al contraelectrodo -4- y al electrodo de trabajo -2- a través de estos electrodos.

El biosensor de la presente realización está formado uniendo la tapa -7- (sobre la placa base -1-) con el adhesivo (cinta de doble cara) -6- dispuesto sobre la placa base -1- para cubrir la primera capa de reacción -8- y la segunda capa de reacción -9-. El adhesivo (cinta de doble cara) -6- puede estar dispuesto sobre la parte del lado del electrodo, o solamente sobre la parte del lado de la tapa -7-, o puede estar dispuesto en ambas.

En el biosensor de la invención, es preferente que la sección de suministro de muestras contenga además un portador de electrones. En esta realización, el portador de electrones puede estar presente en cualquier realización en el interior de la sección de suministro de muestras. Los ejemplos específicos de las realizaciones incluyen una realización (A) en que la primera capa de reacción -8- contiene el portador de electrones (el portador de electrones está situado en la primera capa de reacción -8-); una realización (B) en que la segunda capa de reacción -9- contiene el portador de electrones (el portador de electrones está situado en la segunda capa de reacción -9-) y una realización (C) en que está dispuesta adicionalmente una tercera capa de reacción que contiene el portador de electrones. Puede ser utilizada cualquiera de estas realizaciones (A), (B) y (C), o pueden ser utilizadas en combinación dos o más de dichas realizaciones (A), (B) y (C). Entre las realizaciones, es más preferente la realización (B) o la (C). En otras palabras, en relación con el biosensor de la invención es preferente que la segunda capa de reacción tenga un portador de electrones (el portador de electrones está situado en la segunda capa de reacción) o que el biosensor tenga además una tercera capa de reacción que contenga el portador de electrones.

En el primer caso (la segunda capa de reacción tiene un portador de electrones), es preferente que esté situada adicionalmente una capa que contiene un tensoactivo, que en adelante se puede denominar capa tensoactiva, en la sección de suministro de muestras, para estar separada de la primera y de la segunda capas de reacción -8- y -9-. La disposición de la capa tensoactiva no está particularmente limitada. Preferentemente, por ejemplo, la capa tensoactiva está formada en el lado de la tapa, para estar separada de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9-. Cuando la capa tensoactiva está formada en el lado de la tapa, en este caso, la difusión o la humectabilidad de la muestra, tal como una muestra de sangre entera, sobre el lado de la tapa es mejor que cuando la tapa -7- contacta directamente con la muestra. Por lo tanto, se produce la ventaja de que la muestra puede ser introducida rápidamente en la sección de suministro de muestras.

En el último caso (una tercera capa de reacción tiene un portador de electrones), es preferente que la tercera capa de reacción, que tiene el portador de electrones, esté situada además en la sección de suministro de muestras para estar separada de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9-. La disposición de la tercera capa de reacción no está particularmente limitada. Preferentemente, por ejemplo, la tercera capa de reacción está formada en el lado de la tapa, para ser estar separada de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9-. Cuando el biosensor tiene un portador de electrones, según esta disposición, se consigue el resultado ventajoso de que se realiza una mejora en la estabilidad del propio portador de electrones, o de la enzima redox cuando el biosensor está almacenado. Esto constituye un resultado ventajoso en base al hecho de que el portador de electrones y la enzima redox no contactan entre sí.

En otras palabras, una realización diferente del biosensor de la invención, en un caso en que el biosensor contenga una tercera capa de reacción, es un biosensor que incluye una placa base de aislamiento, un sistema de electrodos que contiene, por lo menos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo y está formado en la placa base de aislamiento, y una sección de suministro de muestras formada en el sistema de electrodos, en el que: la sección de suministro de muestras tiene una capa de reacción que incluye una primera capa de reacción formada sobre el

sistema de electrodos y que contiene, por lo menos, una enzima redox en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN), como un grupo prostético; una segunda capa de reacción formada aplicando, sobre la primera capa de reacción, una solución que incluye una enzima de descomposición de lípidos; y además la tercera capa de reacción que contiene un portador de electrones está situada para ser estar separada de la primera y la segunda capas de reacción. En adelante, se describirá un biosensor según la realización diferente de la invención, haciendo referencia a las figuras 3 y 4.

La figura 3 es una vista, en perspectiva, con las piezas desmontadas, que muestra la realización diferente del biosensor de la invención, que contiene una tercera capa de reacción. La figura 4 es una vista, en sección, del biosensor de la figura 3. En la descripción, el biosensor mostrado en las figuras 3 y 4 se puede denominar como "segundo biosensor".

Tal como se muestra en las figuras 3 y 4, la estructura básica del mismo es idéntica a la del biosensor mostrado en las figuras 1 y 2, excepto en que está dispuesta además una tercera capa de reacción -10- que contiene el portador de electrones (específicamente, la tercera capa de reacción -10- está situada junto a la primera capa de reacción -8- y la segunda capa de reacción -9-). En otras palabras, la capa formada en el lado de la tapa -7- se denomina la tercera capa de reacción -10-; y de las dos capas formadas en la parte del lado del electrodo, una capa más próxima a sus electrodos y la otra capa, se denominan respectivamente como primera capa de reacción -8- y segunda capa de reacción -9-. La sección de suministro de muestras se compone de la primera, la segunda y la tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, y del espacio -S- dispuesto entre la segunda capa de reacción -9- y la tercera capa de reacción -10-. La primera capa de reacción -8- contiene enzima redox, la segunda capa de reacción -9- contiene enzima de descomposición de lípidos, y la tercera capa de reacción -10- contiene el portador de electrones. En conclusión, en el segundo biosensor, según la realización diferente, no es admisible que enzima redox, la enzima de descomposición de lípidos y el portador de electrones estén contenidos simultáneamente en la misma capa de reacción. La tercera capa de reacción -10- está formada sobre la tapa -7-, que tiene dos bordes en los que están situadas capas de adhesivo (cinta de doble cara) -6a-, respectivamente, para estar dispuestas en un intersticio entre los dos bordes.

El segundo biosensor está formado uniendo conjuntamente los adhesivos (cintas de doble cara) -6b- unidos a la placa base -1- sobre la que están formadas la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9-, y, los adhesivos (cintas de doble cara) -6a- unidos a la tapa -7- sobre la que está formada la primera capa de reacción -8-. El adhesivo (cinta de doble cara) -6- puede estar situado solamente sobre el lado de la placa base -1-, o puede estar situado solamente sobre el lado de la tapa -7-.

A continuación, se detallarán los requisitos estructurales individuales. Tal como se ha descrito anteriormente, la estructura del primer biosensor es idéntica a la del segundo biosensor excepto en que el segundo biosensor tiene además la tercera capa de reacción -10-; por lo tanto, cualquier descripción específica acerca de los requisitos estructurales descritos a continuación es aplicable al primer y al segundo biosensores de la invención, salvo que se indique lo contrario. Cuando se describe la cantidad contenida de cada uno de los requisitos estructurales, se puede utilizar el término "por sensor". En la descripción, el término "por sensor" significa lo siguiente: para cada sensor, en que el volumen de la muestra a suministrar a la sección de suministro de muestras es "de 0,1 a 20 µl (preferentemente de aproximadamente 2 µl)", y el tamaño del sensor es el tamaño de los biosensores ordinarios. Por lo tanto, en relación con los biosensores que tienen un tamaño menor o mayor que dicho tamaño, la invención se puede aplicar a los mismos regulando adecuadamente la cantidad contenida de cada uno de los requisitos estructurales.

<Placa base de aislamiento>

La placa base de aislamiento -1- utilizada en la invención no está particularmente limitada; por lo tanto, se puede utilizar para la misma un material conocido convencionalmente. Ejemplos de los mismos incluyen plásticos, papeles, vidrios y cerámicas. La forma y el tamaño de la placa base de aislamiento -1- no están particularmente limitados.

Los plásticos tampoco están particularmente limitados, y pueden ser plásticos conocidos convencionalmente. Ejemplos de los mismos incluyen tereftalato de polietileno (PET), poliésteres, poliestireno, polipropileno, policarbonatos, poliimidas y resinas acrílicas.

<Electrodos>

Los electrodos de la invención incluyen, por lo menos, el electrodo de trabajo -2- y el contraelectrodo -4-.

Los electrodos de la invención no están particularmente limitados, siempre que los electrodos puedan detectar electroquímicamente una reacción de la muestra (el objetivo a medir) y la enzima redox en la invención. Ejemplos de los mismos incluyen electrodo de carbono, electrodo de oro, electrodo de plata, electrodo de platino y electrodo de paladio. Desde el punto de vista de la resistencia a la corrosión y de los costes, son preferentes los electrodos de carbono.

En la invención, los electrodos pueden ser de un tipo de dos electrodos, que incluye solamente el electrodo de trabajo -2- y el contraelectrodo -4-, o pueden ser de un tipo de tres electrodos, que incluye además el electrodo de referencia -3-. El tipo de tres electrodos puede ser utilizado más preferentemente que el tipo de dos electrodos para conseguir un control del potencial con mayor sensibilidad. Los electrodos de la invención pueden incluir otro electrodo, tal como un electrodo de detección, para detectar la cantidad de un líquido.

Una zona del mismo que contacta con la sección de suministro de muestras (zona de trabajo) puede estar fabricada de un material constitutivo diferente al de otras zonas del electrodo. Cuando el electrodo de referencia -3- está fabricado, por ejemplo, de carbono, la zona de trabajo del electrodo de referencia -3-1- puede estar fabricada de plata/cloruro de plata. Dado que los biosensores ordinarios son desechables, es aconsejable utilizar, como electrodos, electrodos desechables.

<Capa de aislamiento>

El material que constituye la capa de aislamiento -5- no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen tinta resistente, resinas tales como PET y polietileno, vidrio, cerámica y papel. Preferentemente, el material es PET.

<Sección de suministro de muestras>

Tal como se ha descrito anteriormente, en el primer biosensor de la invención, la sección de suministro de muestras tiene la primera capa de reacción -8-, que contiene enzima redox, y la segunda capa de reacción -9-, que contiene enzima de descomposición de lípidos. Cuando la capa tensoactiva está dispuesta sobre el lado de la tapa -7- para ser estar separada de la primera y la segunda capas de reacción, la sección de suministro de muestras tiene asimismo la capa tensoactiva.

En el segundo biosensor de la invención, la sección de suministro de muestras tiene no sólo la primera capa de reacción -8-, que contiene enzima redox, y la segunda capa de reacción -9-, que contiene enzima de descomposición de lípidos, sino asimismo la tercera capa de reacción -10-, que está formada separadamente de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9-, y dicha tercera capa de reacción -9- contiene el portador de electrones. Proporcionando una tercera capa de reacción tal como en el segundo biosensor de la invención, la enzima redox y el portador de electrones pueden estar comprendidos en capas diferentes entre sí, y se puede impedir entonces que el biosensor se deteriore por el contacto entre el portador de electrones y la enzima redox, cuando está almacenado.

En la invención, los grosores respectivos de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9- no están particularmente limitados, y se puede seleccionar adecuadamente cada uno para que sea del grosor de las capas de reacción ordinarias. El grosor de la primera capa de reacción -8- es, preferentemente, de 0,01 a 25 µm, más preferentemente de 0,025 a 10 µm, en particular, preferentemente de 0,05 a 8 µm. El grosor de la segunda capa de reacción -9- es, preferentemente, de 0,01 a 25 µm, más preferentemente de 0,025 a 10 µm, en particular, preferentemente de 0,05 a 8 µm. Es aconsejable determinar el grosor total de la primera y la segunda capas de reacción 8 y 9 para que esté dentro de un intervalo, preferentemente de 0,02 a 50 µm, más preferentemente de 0,05 a 20 µm, en particular, preferentemente de 0,1 a 16 µm. El procedimiento para controlar cada uno de los grosores no está particularmente limitado. Por ejemplo, el grosor se puede controlar regulando adecuadamente la cantidad de aplicación (por ejemplo, la cantidad vertida) de la solución que contiene los componentes predeterminados.

Cuando la capa tensoactiva se forma sobre el lado de la tapa -7- para estar separada de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9- en el primer biosensor de la invención, el grosor de la misma es preferentemente de 0,01 a 25 µm, más preferentemente de 0,025 a 10 µm, incluso más preferentemente de 0,05 a 8 µm. La distancia de separación entre la segunda capa de reacción -9- y la capa tensoactiva es preferentemente de 0,05 a 1,5 mm, más preferentemente de 0,07 a 1,25 mm, incluso más preferentemente de 0,09 a 1 mm. Cuando la distancia está comprendida en este intervalo, se produce fácilmente un fenómeno de capilaridad de manera que la muestra se introduce fácilmente en la sección de suministro de muestras. Los grosores de la primera y de la segunda capas de reacción -8- y -9-, y de la capa tensoactiva formada opcionalmente, pueden ser iguales o diferentes.

En el segundo biosensor de la invención, los grosores respectivos de la primera y de la segunda capas de reacción -8- y -9- y de la tercera capa de reacción no están particularmente limitados, y se pueden seleccionar adecuadamente cada uno para que sean del grosor de una capa de reacción ordinaria. El grosor de la primera capa de reacción -8- es, preferentemente, de 0,01 a 25 µm, más preferentemente de 0,025 a 10 µm, en particular, preferentemente de 0,05 a 8 µm. El grosor de la segunda capa de reacción -9- es, preferentemente, de 0,01 a 25 µm, más preferentemente de 0,025 a 10 µm, en particular, preferentemente de 0,05 a 8 µm. Es aconsejable determinar el grosor total de la primera y de la segunda capas de reacción -8- y -9- en un intervalo preferentemente de 0,02 a 50 µm, más preferentemente de 0,05 a 20 µm, en particular, preferentemente de 0,1 a 16 µm.

Es aconsejable determinar el grosor de la tercera capa de reacción -10- para que esté comprendido dentro de un intervalo preferentemente de 0,01 a 10 µm, más preferentemente de 0,025 a 10 µm, en particular, preferentemente de 0,05 a 8 µm. Los grosores respectivos de la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10- pueden

ser iguales o diferentes. El procedimiento para controlar cada uno de los grosores no está particularmente limitado. Por ejemplo, el grosor se puede controlar regulando adecuadamente la cantidad de aplicación (por ejemplo, la cantidad vertida) de una solución que contiene los componentes predeterminados. La distancia de separación entre la segunda capa de reacción -9- y la tercera capa de reacción -10- no está particularmente limitada, y es preferentemente de 0,05 a 1,5 mm, más preferentemente de 0,075 a 1,25 mm, en particular, preferentemente de 0,1 a 1 mm. Cuando la distancia está comprendida en este intervalo, la enzima redox y el portador de electrones no contactan entre sí cuando el biosensor está almacenado, y además se produce fácilmente un fenómeno de capilaridad, de manera que la muestra es absorbida fácilmente en las capas de reacción. La distancia de separación se puede controlar, controlando el grosor del adhesivo. En otras palabras, el adhesivo cumple asimismo la función de un separador, para separar entre sí la segunda capa de reacción -9- y la tercera capa de reacción -10-.

(Enzima redox)

En la invención, la primera capa de reacción -8- contiene enzima redox en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN), como un grupo prostético, que se puede denominar como "coenzima". En particular, la enzima redox es preferentemente una poliol deshidrogenasa en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), como un grupo prostético. En relación con la enzima redox de la invención, puede ser utilizada solamente una especie de la misma, o pueden ser utilizadas dos o más especies de la misma en forma mezclada.

En la invención, la enzima redox, en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN), como un grupo prostético, no está particularmente limitada, y depende de la clase de la muestra. Ejemplos de enzima redox en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ) como un grupo prostético incluyen deshidrogenasa de glicerina, deshidrogenasa de sorbitol, deshidrogenasa de manitol, deshidrogenasa de arabitol, deshidrogenasa de galactitol, deshidrogenasa de xilitol, deshidrogenasa de adonitol, deshidrogenasa de eritritol, deshidrogenasa de ribitol, deshidrogenasa de propilenglicol, deshidrogenasa de fructosa, deshidrogenasa de glucosa, deshidrogenasa de ácido glucónico, deshidrogenasa de ácido 2-cetoglucónico, deshidrogenasa de ácido 5-cetoglucónico, deshidrogenasa de ácido 2,5-dicetoglucónico, deshidrogenasa de alcohol, deshidrogenasa de alcohol cíclico, deshidrogenasa de acetaldehido, deshidrogenasa de amina, deshidrogenasa de ácido siquímico y oxidasa de galactosa. Ejemplos de enzima redox en la que está incorporado dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN) como un grupo prostético incluyen oxidasa de glucosa, deshidrogenasa de glucosa, oxidasa de D-aminoácido, deshidrogenasa de ácido succínico, oxidasa de monoamina, deshidrogenasa de sarcosina, deshidrogenasa de glicerina, deshidrogenasa de sorbitol, deshidrogenasa de D-ácido láctico y oxidasa de colesterol.

Es preferente la deshidrogenasa de glicerina en la que está incorporada, por lo menos, pirroloquinolina quinona (PQQ) o dinucleótido de flavina, adenina (FAD) como grupo prostético, y es particularmente preferente deshidrogenasa de glicerina en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ) como grupo prostético (en adelante, esta combinación se puede denominar "deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ").

La enzima redox de la invención puede ser un producto adquirido disponible comercialmente, o una enzima preparada personalmente. El procedimiento de preparación personal de la enzima redox puede ser, por ejemplo, un procedimiento conocido de cultivo de bacterias que puede producir la enzima redox en un medio nutriente, y la extracción, a continuación, de la enzima redox del cultivo (ver, por ejemplo, el documento JP-A número 2008-220367).

En el caso, por ejemplo, de deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ, un ejemplo específico de bacterias que pueden fabricar la deshidrogenasa de glicerina incluye bacterias que pertenecen a varios géneros, tales como Gluconobacter y Pseudomonas. Es particularmente preferente utilizar deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ que está presente en una fracción de la membrana de bacterias que pertenecen a Gluconobacter. En particular, se pueden utilizar las siguientes, desde el punto de vista de la facilidad de disposición: Gluconobacter albidus NBRC 3250, 3273, 103509, 103510, 103516, 103520, 103521 ó 103524; Gluconobacter cerinus NBRC 3267, 3274, 3275 ó 3276; Gluconobacter frateurii NBRC 3171, 3251, 3253, 3262, 3264, 3265, 3268, 3270, 3285, 3286, 3290, 16669, 103413, 103421, 103427, 103428, 103429, 103437, 103438, 103439, 103440, 103441, 103446, 103453, 103454, 103456, 103457, 103458, 103459, 103461, 103462, 103465, 103466, 103467, 103468, 103469, 103470, 103471, 103472, 103473, 103474, 103475, 103476, 013477, 103482, 103487, 103488, 103490, 103491, 103493, 103494, 103499, 103500, 103501, 103502, 103503, 103504, 103506, 103507, 103515, 103517, 103518, 103519 ó 103523; Gluconobacter japonicus NBRC 3260, 3263, 3269, 3271 ó 3272; Gluconobacter kanchanaburiensis NBRC 103587 ó 103588; Gluconobacter kondonii NBRC 3266; Gluconobacter oxydans NBRC 3130, 3189, 3244, 3287, 3292, 3293, 3294, 3462, 12528 ó 14819; Gluconobacter roseus NBRC 3990; Gluconobacter sp NBRC 3259 ó 103508; Gluconobacter sphaericus NBRC 12467; Gluconobacter thailandicus NBRC 3172, 3254, 3255, 3256, 3257, 3258, 3289, 3291, 100600 ó 100601.

El medio para cultivar deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ puede ser un medio sintético o un medio natural, siempre que el medio contenga cantidades adecuadas de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una sustancia inorgánica y otros nutrientes necesarios que pueden ser usados por la cepa bacteriana utilizada.

Ejemplos utilizables de la fuente de carbono incluyen glucosa, glicerina y sorbitol. Ejemplos utilizables de la fuente de nitrógeno incluyen productos naturales que contienen nitrógeno tales como peptonas, extractos de carne y extractos de levadura; y sustancias inorgánicas que contienen nitrógeno, tales como cloruro amónico y citrato amónico. Ejemplos utilizables de sustancias inorgánicas incluyen fosfato potásico, fosfato sódico y sulfato magnésico. Adicionalmente, pueden ser utilizadas opcionalmente vitaminas específicas. Las fuentes de carbono mencionadas anteriormente, así como las fuentes de nitrógeno, las sustancias inorgánicas u otros nutrientes necesarios, pueden ser utilizados solos o en combinación de dos o más de los mismos.

El cultivo es preferentemente un cultivo con vibración, o un cultivo en mezcla aireada. La temperatura del cultivo es preferentemente de 20 a 50 ℃, más preferentemente de 22 a 40 ℃, lo más preferentemente de 25 a 35 ℃ . El pH del cultivo es preferentemente de 4 a 9, más preferentemente de 5 a 8. Son permisibles otras condiciones diferentes a éstas, siempre que crezca la cepa bacteriana utilizada. Normalmente, el periodo de cultivo es preferentemente de 0,5 a 5 días. Mediante el cultivo, se acumula una enzima redox en las células bacterianas. La enzima redox puede ser una enzima obtenida mediante el cultivo, o una enzima recombinante obtenida mediante genes de transducción de la enzima redox en bacilos de colon u otras bacterias.

A continuación, se extrae la deshidrogenasa de glicerina resultante dependiente de PQQ. El procedimiento para la extracción puede ser un procedimiento de extracción utilizado ordinariamente, ejemplos del cual incluyen un procedimiento de fractura ultrasónica, un procedimiento de prensa francesa, un procedimiento de disolvente orgánico y un procedimiento de lisozima. El procedimiento de purificación de la enzima redox extraída no está particularmente limitado, y puede ser, por ejemplo, un procedimiento de precipitación salina con sulfato amónico, mirabilita o algún otro material; un procedimiento de agregación metálica utilizando cloruro magnésico o cloruro cálcico; eliminación de ácidos nucleicos utilizando estreptomicina o polietilenimina; o un procedimiento cromatográfico de intercambio iónico a través de DEAE (dietilaminoetil)-sefarosa, CM (carboximetil)-sefarosa, o algún otro.

Una enzima parcialmente purificada o un líquido de enzimas purificadas proporcionado por dicho procedimiento puede ser utilizado tal cual, o puede ser utilizado en una forma modificada químicamente. Cuando la enzima redox modificada químicamente es utilizada en la invención; la enzima redox obtenida mediante el procedimiento mencionado anteriormente, originada a partir de un producto cultivado, es modificada químicamente adecuadamente mediante un procedimiento descrito, por ejemplo, en el documento JP-A No. 2006-271257, y puede ser utilizado el resultante. El procedimiento para la modificación química no se limita al procedimiento descrito en esta publicación.

La cantidad contenida de la enzima redox de la invención no está particularmente limitada, y se puede seleccionar adecuadamente según la clase y la cantidad añadida de una muestra a medir, la clase del portador de electrones, la cantidad de un polímero soluble en agua que se describirá más adelante, y otros. En caso de utilizar, por ejemplo, deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ, la cantidad contenida es preferentemente de 0,01 a 100 U, más preferentemente de 0,05 a 50 U, en particular, preferentemente de 0,1 a 10 U por sensor, desde el punto de vista de la cantidad de enzimas (cantidad de actividad enzimática) para descomponer glicerina rápidamente y no reducir la solubilidad de las capas de reacción. La definición de la unidad de actividad (U) de deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ, y el procedimiento para medir la unidad son según un procedimiento descrito en el documento JP-A número 2006-271257. La deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ que contiene enzima redox se prepara preferentemente mediante la utilización de una solución tampón, tal como glicil-glicina, estando asimismo esta cuestión descrita más adelante.

(Enzima de descomposición de lípidos)

La segunda capa de reacción -9- de la invención contiene la enzima de descomposición de lípidos, que hidroliza el enlace éster que constituye el lípido. Por lo tanto, el biosensor de la invención puede ser utilizado como un sensor de grasa neutra. La enzima de descomposición de lípidos no está particularmente limitada, y ejemplos específicos de la misma incluyen lipoproteína lipasa (LPL), lipasa y esterasa. Desde el punto de vista de la reactividad, es particularmente preferente la lipoproteína lipasa (LPL).

La cantidad contenida de LPL no está particularmente limitada, y se puede seleccionar adecuadamente según la clase y la cantidad añadida de la muestra a medir, la cantidad de polímero hidrófilo a utilizar, la clase de portador de electrones, y otros. La cantidad es preferentemente de 0,1 a 1000 unidades de actividad (U), más preferentemente de 1 a 500 U, en particular, preferentemente de 10 a 100 U desde el punto de vista, por ejemplo, de la cantidad de enzima (cantidad de actividad enzimática) para descomponer rápidamente la grasa neutra y no reducir la solubilidad de las capas de reacción. La definición de la unidad de actividad (U) de LPL, y el procedimiento para medir la unidad, son según el folleto de WO 2006/104077. LPL se prepara preferentemente mediante la utilización de una solución tampón, tal como glicil-glicina, estando asimismo esta cuestión descrita más adelante.

En la invención, la oxidasa y la enzima de descomposición de lípidos cada una de las cuales se ha descrito anteriormente, están, cada una, presentes separadamente en diferentes capas de la primera y la segunda capas de reacción. Según esta realización, la reacción de hidrólisis mediante la enzima de descomposición de lípidos avanza eficientemente.

(Portador de electrones)

El biosensor de la invención contiene, preferentemente, un portador de electrones. El portador de electrones puede estar contenido en la primera o la segunda capas de reacción -8- ó -9-. Preferentemente, en la tercera capa de reacción, que está separada de estas capas de reacción, está contenido el portador de electrones. En este caso, la capa de reacción que contiene el portador de electrones está presente, más preferentemente, separadamente de los electrodos y, en particular, está presente, preferentemente, separadamente de la primera o de la segunda capas de reacción -8- ó -9-, especialmente, de la segunda capa de reacción -9-. Resumiendo, la invención da a conocer un biosensor (segundo biosensor) que comprende una placa base de aislamiento, un sistema de electrodos que contiene, por lo menos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo y está formado en la placa base de aislamiento, y una sección de suministro de muestras formada en el sistema de electrodos, en el que, la sección de suministro de muestras tiene capas de reacción que incluyen una primera capa de reacción formada en el sistema de electrodos y que contiene, por lo menos, una enzima redox en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN) como grupo prostético, y una segunda capa de reacción formada aplicando, sobre la primera capa de reacción, una solución que incluye una enzima de descomposición de lípidos, y una tercera capa de reacción que contiene un portador de electrones está formada de manera que es está separada de la primera y la segunda capas de reacción.

En el segundo biosensor de la invención, la tercera capa de reacción -10- contiene un portador de electrones, que se puede denominar como "receptor de electrones". Cuando el portador de electrones está presente separadamente de los electrodos tal como se describe en el presente documento, es posible limitar o impedir el fenómeno de que el portador de electrones se reduzca automáticamente, tal como en una batería local. De este modo, se puede proporcionar un biosensor con precisión mejorada.

Cuando se utiliza el biosensor, el portador de electrones recibe electrones generados mediante el efecto de la enzima redox, es decir, el portador se reduce. Después de que finalice la reacción enzimática, el portador de electrones reducido se oxida electroquímicamente aplicando un potencial a los electrodos. A partir de la intensidad de la corriente que circula en este momento, que se puede denominar en lo que sigue como la "corriente de oxidación", se puede calcular la concentración del componente deseado en la muestra.

El portador de electrones utilizado en la invención puede ser uno conocido convencionalmente. Las especies del mismo se pueden seleccionar adecuadamente según la muestra y la enzima redox utilizada. En cuanto al portador de electrones, puede ser utilizada una especie del mismo, o pueden ser utilizadas dos o más especies del mismo en combinación.

Ejemplos utilizables preferentemente del portador de electrones son, más específicamente, ferrocianuro potásico, ferrocianuro sódico, ferroceno y derivados del mismo, metosulfato de fenazina y derivados del mismo, p-benzoquinona y derivados del mismo, 2,6-diclorofenolindofenol, azul de metileno, azul de nitrotetrazolio, complejos de osmio, y complejos de rutenio tales como cloruro de hexamina rutenio (III). De estos ejemplos, son preferentes el cloruro de hexaminarutenio (III) y el ferrocianuro potásico, y el cloruro de hexamina rutenio (III) es más preferente.

La cantidad contenida del portador de electrones no está particularmente limitada, y se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la cantidad de adición de la muestra, y otros. Por ejemplo, para incorporar una cantidad suficiente de portador de electrones con respecto a la cantidad de sustrato, la cantidad contenida del portador de electrones es preferentemente de 1 a 2.000 µg, más preferentemente de 5 a 1.000 µg, en particular, preferentemente de 10 a 500 µg por sensor. El portador de electrones se prepara preferentemente mediante la utilización de una solución tampón, tal como glicil-glicina; esto se describirá asimismo más adelante.

(Tensoactivo)

En el biosensor de la invención, la primera, segunda o tercera capas -8-, -9- ó -10- contienen un tensoactivo, si es necesario. En el primer biosensor de la invención, puede estar formada una capa tensoactiva en el lado de la tapa -7-, para estar separada de la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9-.

Cualquier enzima redox se compone de una proteína; por lo tanto, cuando la enzima se adhiere a la superficie frontal de un electrodo, la superficie frontal del electrodo puede ser pasivada desfavorablemente. Por lo tanto, los biosensores ordinarios convencionales tenían una estructura en la que la enzima no contactaba directamente con sus electrodos. Sin embargo, cuando está incluido un tensoactivo en la primera capa de reacción -8-, se limita significativamente o se impide que la enzima redox se adhiera a los electrodos o se fije sobre los mismos. Como resultado, cerca de los electrodos, se puede mejorar la eficiencia de la conversión del portador de electrones desde la forma oxidada a la forma reducida mediante la enzima redox. Es decir, se puede conseguir aumentar la correlación con la concentración de sustrato en el líquido de muestra. Cuando el tensoactivo está formado en el lado de la tapa -7-, la difusión o la humectabilidad de la muestra, tal como una muestra de sangre entera, hacia el lado de la tapa, es mejor que cuando la tapa -7- contacta directamente con la muestra. Por lo tanto, la muestra se puede introducir rápidamente en la sección de suministro de muestras, de manera que esto es favorable.

El tensoactivo utilizado en la invención no está particularmente limitado, siempre que el tensoactivo no reduzca la actividad enzimática de la enzima redox en la invención a utilizar. Se puede utilizar un tensoactivo seleccionado adecuadamente entre los siguientes: por ejemplo, tensoactivos no iónicos, tensoactivos anfóteros, tensoactivos catiónicos, tensoactivos aniónicos y tensoactivos naturales. Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla. El tensoactivo a utilizar es, preferentemente, por lo menos uno de un tensoactivo no iónico y un tensoactivo anfótero, para no afectar negativamente a la actividad enzimática de la enzima redox en la invención.

Los tensoactivos no iónicos no están particularmente limitados, y preferentemente son tensoactivos de polioxietileno o de alquilglicósido, para no afectar negativamente a la actividad enzimática de la enzima redox en la invención.

Los tensoactivos no iónicos de polioxietileno no están particularmente limitados, y son preferentes polioxietileno-p-t-octilfenol (número de oxietileno = 9, 10) [Triton (marca registrada) X-100], monolaurato de sorbitán polioxietileno [Tween 20], monopalmitato de sorbitán polioxietileno [Tween 40], monoestearato de sorbitán polioxietileno [Tween 60], monooleato de sorbitán polioxietileno [Tween 80], polioxietileno polioxipropileno glicol [Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.)], y otros. De estos tensoactivos, los preferentes son polioxietileno-p-t-octilfenol (número de oxietileno = 9, 10) [Triton (marca registrada) X-100] y polioxietileno polioxipropileno glicol [Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.)], desde el punto de vista de mejorar la solubilidad de la enzima redox de la invención.

Los tensoactivos de alquilglicósido no iónicos no están particularmente limitados, y son preferentemente alquilglicósidos y alquiltioglicósidos que tienen, cada uno, un grupo alquilo que tiene de 7 a 12 átomos de carbono, y otros. El número de átomos de carbono es, más preferentemente, de 7 a 10, en particular, preferentemente 8. La fracción de sacárido es preferentemente glucosa, o maltosa, más preferentemente glucosa. Más específicamente, los sacáridos son preferentemente n-octil-β-D-glucósido, y n-octil-β-D-tioglucósido. Cuando se utilizan cada uno de los tensoactivos no iónicos de alquilglicósido en el biosensor, el tensoactivo se aplica muy fácilmente en el proceso de fabricación, de manera que el tensoactivo aplicado puede ser uniforme. En particular, cuando se incluye n-octil-β-D-tioglucósido en la capa de reacción -10- (la primera capa de reacción -8-, o la segunda capa de reacción -9-), la solución de la muestra se difunde muy bien cuando se vierte en la misma, y tiene una buena humectabilidad sobre la misma (no se genera fácilmente tensión superficial). Por lo tanto, desde el punto de vista de la difusión y la humectabilidad, los alquiltioglicósidos son más preferibles que los alquilglicósidos. Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla.

Los tensoactivos anfóteros no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen

ácido 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfónico (CHAPS),

ácido 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxipropano sulfónico (CHAPSO), y

ácido n-alquil-N-N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfónico (Zwittergent (marca registrada)). Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla. Es preferente el ácido 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfónico (CHAPS), o

el ácido 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxipropano sulfónico (CHAPSO). Es particularmente preferente CHAPS, dado que la hemolisis mediante CHAPS es menor entre tensoactivos.

Los tensoactivos catiónicos no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen cloruro de cetilpiridinio y bromuro de trimetilamonio. Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla.

Los tensoactivos aniónicos no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen colato sódico y deoxicolato sódico. Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla.

Los tensoactivos naturales no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen fosfolípidos. Ejemplos preferentes de los mismos incluyen lecitinas tales como lecitinia de yema de huevo, lecitina de soja, lecitina hidrogenada y lecitina de gran pureza. Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla.

Cuando se utiliza una muestra de sangre entera como muestra, es preferente, desde el punto de vista de una mejora adicional de la precisión del biosensor, utilizar un tensoactivo que sea poco hemolítico entre los tensoactivos. Ejemplos específicos y preferentes de éstos incluyen los mencionados anteriormente CHAPS, Tween y Emalgen PP-290 (polioxietileno polioxipropileno glicol, fabricado por la firma Kao Corp.).

En el segundo biosensor de la invención, dicho tensoactivo puede estar incluido en cualquiera de la primera, la segunda y la tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, o estar incluido preferentemente en la primera o la tercera capas de reacción -8- ó -10-, más preferentemente en la primera y la tercera capas de reacción -8- y -10-. De este modo, se puede favorecer la disolución de la enzima redox o del portador de electrones. Cuando el tensoactivo está presente en dos o más de las tres capas de reacción, las respectivas especies del tensoactivo y sus cantidades, que

están incluidas en estas capas de reacción, pueden ser iguales o diferentes. Es preferente seleccionar las especies o las cantidades, considerando la interacción con cada uno de los requisitos estructurales contenidos en cada una de las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-.

Más específicamente, tal como se ha descrito anteriormente, la enzima redox está incluida en la primera capa de reacción -8-. En caso de incluir, por ejemplo, deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ como la enzima redox, es preferente incluir el tensoactivo, por lo menos, en la primera capa de reacción -8-, debido a que la enzima es muy hidrófoba. En este caso, para mejorar adicionalmente la precisión del biosensor cuando se utiliza una muestra de sangre entera como muestra, es preferente utilizar, como especie del tensoactivo, un tensoactivo poco hemolítico (por ejemplo, CHAPS, Tween, Emalgen PP-290, u otros). Al mismo tiempo, tal como se ha descrito anteriormente, en el segundo biosensor, la tercera capa de reacción -10- contiene el portador de electrones (por ejemplo, cloruro de hexamina rutenio (III)); para mejorar la difusión y la humectabilidad a efectos de mejorar la precisión del biosensor, es más preferente hacer que el tensoactivo esté incluido asimismo en la tercera capa de reacción -10-. En este caso, es preferente utilizar asimismo un tensoactivo poco hemolítico (por ejemplo CHAPS, Tween, Emalgen PP-290 u otros) teniendo en cuenta la difusión y la humectabilidad. De este modo, se mejora adicionalmente la precisión del biosensor.

La cantidad contenida del tensoactivo no está particularmente limitada, y se puede regular opcionalmente según la cantidad añadida de la muestra, y otros.

Cuando se utiliza un tensoactivo anfótero, la cantidad contenida es preferentemente de 0,01 a 100 µg, más preferentemente de 0,05 a 50 µg, en particular, preferentemente de 0,1 a 10 µg por sensor, para aumentar la solubilidad de la enzima redox en la invención, impedir la inactivación de la enzima y aplicar fácilmente el tensoactivo en el proceso de fabricación. El tensoactivo se prepara asimismo preferentemente mediante la utilización de una solución tampón, tal como glicil-glicina, tal como se describirá asimismo más adelante. Cuando se contienen dos o más especies del tensoactivo por sensor, la cantidad contenida significa la cantidad total del mismo.

Cuando se utiliza un tensoactivo no iónico como tensoactivo, la cantidad contenida es preferentemente de 0,01 a 100 µg, más preferentemente de 0,05 a 50 µg, en particular, preferentemente de 0,1 a 10 µg por sensor, para aumentar la solubilidad de la enzima redox en la invención, impedir la inactivación de la enzima y aplicar fácilmente el tensoactivo en el proceso de fabricación. El tensoactivo se prepara preferentemente mediante la utilización de una solución tampón, tal como glicil-glicina.

(Polímero hidrófilo)

En la invención, la primera, segunda o tercera capas de reacción -8-, -9- ó -10- pueden contener además un polímero hidrófilo.

Tal como se ha descrito anteriormente, cualquier enzima redox se compone de una proteína; por lo tanto, cuando la enzima se adhiere sobre la superficie frontal del electrodo, la superficie frontal del electrodo puede ser pasivada desfavorablemente. Por lo tanto, los biosensores convencionales ordinarios tenían una estructura en la que la enzima no contactaba directamente con sus electrodos. Sin embargo, cuando el polímero hidrófilo está incluido en la primera capa de reacción -8-, se limita o impide significativamente que la enzima redox se adhiera o se fije sobre los electrodos. Cerca de los electrodos, se puede mejorar la eficiencia de la conversión del portador de electrones desde la forma oxidada a la forma reducida mediante la enzima redox. Es decir, se mejora la correlación con la concentración de sustrato en el líquido de muestra.

En el caso del primer biosensor, el polímero hidrófilo puede estar contenido en cualquiera de la primera o la segunda capas de reacción -8- ó -9-. En el caso del segundo biosensor, el polímero hidrófilo puede estar contenido en cualquiera de las primera, segunda o tercera capas de reacción -8-, -9- ó -10-. El polímero hidrófilo tiene la función de inmovilización de la enzima redox o del portador de electrones de la invención, sobre los electrodos. Por lo tanto, cuando la primera, segunda o tercera capas de reacción -8-, -9- ó -10-, en particular, la primera o la tercera capas de reacción -8- ó -10- contiene el polímero hidrófilo, se puede impedir que estas capas de reacción se despeguen de las superficies de la placa base -1- y de los electrodos. El polímero hidrófilo tiene asimismo el resultado ventajoso de impedir que se agrieten las respectivas superficies de la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-. Por lo tanto, el polímero hidrófilo es ventajoso para mejorar la fiabilidad del biosensor. Además, el polímero hidrófilo puede asimismo limitar que los componentes absorbibles, tales como las proteínas, sean absorbidos sobre los electrodos. Cuando la primera, segunda o la tercera capas de reacción -8-, -9- ó -10- contienen el polímero hidrófilo, el biosensor puede adoptar la forma en que el polímero hidrófilo está contenido en la capa de reacción, o la forma en que la capa del polímero hidrófilo que contiene el polímero hidrófilo está formada de manera que cubre la primera, segunda o tercera capas de reacción -8-, -9- ó -10-.

El polímero hidrófilo utilizable en la invención puede ser uno conocido convencionalmente. Más ejemplos específicos del polímero hidrófilo incluyen polietilenglicol, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa de etilo, carboximetil etil celulosa, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, ácidos poliamino tales como polilisina, ácido sulfónico de poliestireno, gelatina y derivados de los

mismos, polímeros de ácido acrílico o derivados de los mismos, polímeros de anhídrido maléico o sales de los mismos, y almidón o derivados del mismo. De estos polímeros, son preferentes carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y alcohol polivinílico dado que no se pierde la actividad enzimática de la enzima redox de la invención, y además tienen una alta solubilidad. Estos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla.

La cantidad mezclada de dicho polímero hidrófilo es preferentemente de 0,01 a 100 µg, más preferentemente de 0,05 a 50 µg, en particular, preferentemente de 0,1 a 10 µg por sensor, para inmovilizar la enzima o el portador de electrones e impedir la disminución de la solubilidad de las capas de reacción. El polímero hidrófilo se prepara asimismo preferentemente mediante la utilización de una solución tampón, tal como glicil-glicina, tal como se describirá asimismo más adelante. Cuando el polímero hidrófilo se presenta en dos o más de la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, las respectivas especies y cantidades mezcladas del polímero hidrófilo que están incluidas en estas capas de reacción pueden ser iguales o diferentes. Es preferente seleccionar las especies o cantidades considerando la interacción con cada uno de los requisitos estructurales contenidos en cada una de la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-.

(Sacárido)

En el primer y el segundo biosensores de la invención, por lo menos una de la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10- pueden contener además un sacárido. El sacárido puede ser seleccionado y utilizado adecuadamente a partir de sacáridos que no están involucrados en la reacción enzimática relacionada con la medición, y que no reaccionan por sí mismos. El sacárido puede contribuir a la inmovilización o estabilización de la capa o capas individuales. El sacárido puede estar contenido en cualquiera de la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, y está contenido preferentemente, por lo menos, en la primera capa de reacción -8-.

El sacárido, que puede estar contenido, por lo menos, en una de las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, es preferentemente un sacárido no reductor, que no tiene un aldehído libre ni un grupo cetona libre para no tener carácter reductor. Ejemplos de sacáridos no reductores incluyen oligosacáridos de tipo trehalosa, en cada uno de los cuales los grupos reductores están unidos entre sí, glicósidos, en cada uno de los cuales un grupo del sacárido en forma reducida está unido a un compuesto no sacárido, y alcoholes sacáridos, en cada uno de los cuales un sacárido ha sido hidrogenado y reducido. Más ejemplos específicos de los mismos incluyen oligosacáridos de tipo trehalosa, tales como sacarosa, trehalosa y rafinosa, glicósidos tales como alquilglicósido, glicósido fenólico, y glicósido de aceite de semillas de mostaza; y alcoholes sacáridos tales como arabitol y xilitol. Estos sacáridos no reductores pueden ser utilizados solos, o en forma de mezcla de dos o más de los mismos. De estos sacáridos, son preferentes trehalosa, rafinosa y sacarosa, y en particular trehalosa.

La cantidad mezclada del sacárido, que está contenida por lo menos en una de las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, es preferentemente de 0,1 a 500 µg, más preferentemente de 0,5 a 400 µg, incluso más preferentemente de 1 a 300 µg por sensor. Cuando el sacárido está en forma de mezcla, la cantidad mezclada significa la cantidad total de todos los sacáridos. Cuando la cantidad mezclada está dentro del intervalo, el sacárido contribuye a la inmovilización o estabilización de las capas individuales, sin reducir el rendimiento del sensor.

(Proteína)

En el primer y el segundo biosensores de la invención, por lo menos una de las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10- puede contener además una proteína. La proteína puede ser seleccionada y utilizada adecuadamente a partir de proteínas que no estén involucradas en la reacción enzimática relacionada con la medición, y que no reaccionen por sí mismas ni presenten ninguna actividad fisiológica. La proteína puede contribuir a la inmovilización o estabilización de las capas individuales. La proteína puede estar contenida en cualquiera de las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, y preferentemente, está contenida, por lo menos, en la primera capa de reacción -8-.

Ejemplos de la proteína, que puede estar contenida, por lo menos, en una de las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-, incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína, sericina e hidrolizados de las mismas. Las proteínas pueden ser utilizadas solas o en forma de una mezcla de dos o más de las mismas. De estas proteínas, es preferente BSA debido a que esta proteína está disponible fácilmente y tiene un coste reducido. El peso molecular de la proteína es preferentemente de 10 a 1.000 kDa, más preferentemente de 25 a 500 kDa, incluso más preferentemente de 50 a 100 kDa. El peso molecular adoptado en este caso es un valor medido mediante la utilización de cromatografía por permeación de gel.

La cantidad mezclada de la proteína contenida en las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10- es preferentemente de 0,1 a 200 µg, más preferentemente de 0,5 a 100 µg, incluso más preferentemente de 1 a 50 µg por sensor. Cuando la proteína está en forma de una mezcla de dos o más especies de la misma, la cantidad mezclada significa la cantidad total de todas las especies. Cuando la cantidad mezclada está dentro del intervalo, la proteína contribuye a la inmovilización o estabilización de las capas individuales, sin reducir el rendimiento del biosensor.

<Procedimiento para fabricar el biosensor>

El procedimiento para formar las primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10- en el primer y segundo biosensores de la invención tampoco está particularmente limitado. En lo que sigue, se describirá una realización preferente de un procedimiento para fabricar el segundo biosensor de la invención. La invención no está limitada al procedimiento descrito a continuación. La fabricación del primer biosensor de la invención tampoco está particularmente limitada. Por ejemplo, en la siguiente descripción la fabricación se puede llevar a cabo del mismo modo, excepto en que no se forma la tercera capa de reacción.

La primera y la tercera capas de reacción -8- y -10- se pueden formar mediante cualquier procedimiento, y la segunda capa de reacción -9- se forma sobre la primera capa de reacción -8- aplicando sobre la misma una solución que contiene una enzima de descomposición de lípidos. El procedimiento de aplicación no está particularmente limitado, y puede ser un procedimiento de aplicación de una solución que contiene enzimas de descomposición de lípidos vertiendo la solución, o mediante la utilización de un dispositivo de rociado, un dispositivo de recubrimiento en barra, un dispositivo de recubrimiento en matriz, un dispositivo de recubrimiento inverso, un dispositivo de recubrimiento de coma, un dispositivo de recubrimiento de fotograbado, un dispositivo de recubrimiento por rociado o cuchilla limpiadora, o alguna otra herramienta de aplicación.

El procedimiento para la formación de la primera y la tercera capas de reacción -8- y -10- no está particularmente limitado, y puede ser el mismo procedimiento que el utilizado para formar la segunda capa de reacción. El procedimiento para formar la segunda capa de reacción -9- puede ser idéntico al procedimiento para formar la primera y la tercera capas de reacción -8- y -10-, o diferente. Teniendo en cuenta la facilidad de formación, los costes de fabricación, y otros, es preferente utilizar el mismo procedimiento, en particular, un procedimiento de verter cada solución que contiene los componentes predeterminados a aplicar, y a continuación secar la película aplicada. Dicho procedimiento puede fabricar fácilmente un biosensor, y reducir los costes de fabricación cuando los biosensores pueden ser fabricados en grandes cantidades, siendo, por lo tanto, preferente.

En primer lugar se forma la primera capa de reacción como sigue: se mezcla una enzima redox (por ejemplo, deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ) con los componentes deseados, tales como un tensoactivo (por ejemplo, Emalgen) si es necesario, y una solución tampón de glicil-glicina, para preparar una solución de enzima redox. Se vierte una cantidad predeterminada de esta solución de enzima redox sobre los electrodos (zonas de trabajo). Después del vertido de la solución de la enzima redox preparada, la solución se seca en el interior de una estufa que mantiene la temperatura a un valor predeterminado o sobre una placa caliente, para formar la primera capa de reacción sobre los electrodos (zona de trabajo). El tensoactivo puede ser incluido simplemente en la primera capa de reacción, o se puede formar una capa que contenga el tensoactivo para cubrir la primera capa de reacción. Alternativamente, se forma una capa tensoactiva sobre los electrodos, y a continuación se puede formar sobre la misma la primera capa de reacción -8-. Si es necesario, los demás componentes mencionados anteriormente (por ejemplo, el polímero hidrófilo) pueden ser añadidos a la misma. Se puede añadir a la misma un disolvente orgánico volátil, tal como etanol, si es necesario. La adición del disolvente orgánico volátil acelera el secado, y limita la cristalización a un nivel reducido. Se puede aplicar previamente un adhesivo sobre la placa base -1-.

Cuando se ha formado la capa tensoactiva, se mezcla un tensoactivo (por ejemplo, Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.)) con los componentes deseados, tales como una solución tampón de glicil-glicina, y un disolvente orgánico volátil para preparar una solución de tensoactivo. Se vierte una cantidad predeterminada de esta solución de tensoactivo sobre los electrodos o sobre la primera capa de reacción. Alternativamente, tal como se describe a continuación, la cantidad se vierte sobre la segunda capa de reacción, la tercera capa de reacción o la tapa -7-. Después de verter la solución de tensoactivo, la solución se seca en el interior de una estufa que mantiene la temperatura a un valor predeterminado, o sobre una placa caliente para formar la capa tensoactiva.

A continuación se forma la segunda capa de reacción como sigue: se mezcla una enzima de descomposición de lípidos (por ejemplo lipoproteína lipasa (LPL)) con los componentes deseados, tal como una solución tampón de glicil-glicina, para preparar una solución de enzima de descomposición de lípidos. Se vierte una cantidad predeterminada de esta enzima de descomposición de lípidos sobre la capa de enzima redox formada tal como se ha descrito anteriormente. Después de verter la solución preparada de la enzima de descomposición de lípidos, la solución se seca en el interior de una estufa que mantiene la temperatura a un valor predeterminado, o sobre una placa caliente para formar la segunda capa de reacción sobre la primera capa de reacción. Se puede añadir adicionalmente un tensoactivo a la segunda capa de reacción. El tensoactivo se puede incluir simplemente en la segunda capa de reacción, o se puede formar una capa que contenga el tensoactivo para cubrir la segunda capa de reacción, tal como se ha descrito anteriormente. Si es necesario, se pueden añadir a la misma los demás componentes mencionados anteriormente (por ejemplo, el polímero hidrófilo). Si es necesario, se puede asimismo añadir a la misma un disolvente orgánico volátil, tal como etanol. La adición del disolvente orgánico volátil acelera el secado, y limita la cristalización a un nivel reducido.

La tercera capa de reacción se forma como sigue: se mezcla un portador de electrones (por ejemplo cloruro de hexamina rutenio (III)) con los componentes deseados, tales como un tensoactivo (por ejemplo, Emalgen) si es necesario, y una solución tampón de glicil-glicina, para preparar una solución de portador de electrones. Se vierte

una cantidad predeterminada de esta solución de portador de electrones sobre la tapa -7-. Después de verter la solución de portador de electrones preparada, la solución se seca en el interior de una estufa que mantiene la temperatura a un valor predeterminado, o sobre una placa caliente, para formar la tercera capa de reacción sobre la tapa. El tensoactivo puede estar incluido simplemente en la capa de reacción, o se puede formar una capa que contenga el tensoactivo para cubrir la capa de reacción, tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, es factible formar la capa tensoactiva sobre la tapa, y formar a continuación la tercera capa de reacción -10- sobre la misma. Previamente se puede aplicar un adhesivo sobre la tapa -7-.

Finalmente, la placa base -1- sobre la que están formadas la primera y la segunda capas de reacción -8- y -9- se une mediante adhesivos -6a- y -6b- a la tapa -7- en la que está formada la tercera capa de reacción -10-. De este modo, se puede fabricar un segundo biosensor.

<Utilización del biosensor>

La muestra utilizada en la invención está, preferentemente, en forma de solución. El disolvente en forma de solución no está particularmente limitado, y puede ser un disolvente seleccionado adecuadamente entre disolventes conocidos convencionalmente, u obtenido combinando dos o más de estos.

La muestra no está particularmente limitada y es, por ejemplo, una muestra de un organismo vivo, tal como sangre entera, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, saliva, orina o médula ósea; una bebida tal como un zumo, o un producto alimenticio tal como salsa de soja o salsa; o agua de desagüe, agua de lluvia o agua de piscina. La muestra es preferentemente sangre entera, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, saliva o médula ósea, y más preferentemente es sangre entera.

En relación con la muestra, es factible utilizar un líquido original tal cual, o una solución obtenida diluyendo el líquido original con un disolvente adecuado para regular la viscosidad o algunas otras propiedades de la misma. El sustrato contenido en la muestra no está particularmente limitado, y puede ser cualquier sustancia siempre que dicha sustancia sea reactiva con las respectivas enzimas contenidas en la primera y la segunda capas de reacción de la invención para generar una corriente medible, que se describirá asimismo más adelante.

Ejemplos del componente deseado (sustrato) en la muestra incluyen sacáridos tales como glucosa, alcoholes polihídricos tales como glicerina, sorbitol y arabitol, lípidos tales como grasa neutra y colesterol, ácidos orgánicos tales como ácido glutámico y ácido láctico, creatina y creatinina. Por la misma razón que se ha descrito anteriormente, es preferente seleccionar un lípido tal como grasa neutra o colesterol, como sustrato.

La manera de suministrar la muestra en la sección de suministro de muestras no está particularmente limitada. Por ejemplo, la muestra puede ser suministrada a las capas de reacción (la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-) desde un lado horizontal de las mismas, mediante el fenómeno de capilaridad.

Cuando la muestra se suministra a las capas de reacción (la primera, segunda y tercera capas de reacción -8-, -9- y -10-), el componente deseado (sustrato) de la muestra se oxida por efecto de la enzima de descomposición de lípidos contenida en la segunda capa de reacción -9- y de la enzima redox contenida en la primera capa de reacción -8-. Al mismo tiempo, cuando el propio sustrato se oxida, se emiten electrones desde el mismo. Los electrones emitidos desde el sustrato son capturados por el portador de electrones disuelto en la tercera capa de reacción -10-. A continuación, el portador de electrones cambia de la forma oxidada a la forma reducida. Después de la adición de la muestra, dejando el biosensor durante un periodo predeterminado, el sustrato se oxida por completo mediante la enzima de descomposición de lípidos y la enzima redox. De este modo, cierta cantidad el portador de electrones se transforma de la forma oxidada a la forma reducida.

El biosensor de la invención puede reducir significativamente el tiempo de reacción (es decir, el tiempo de medición), en que se completa la reacción entre el sustrato y la enzima. El tiempo de reacción (es decir, el tiempo de medición), en el que se completa la reacción entre el sustrato y la enzima no está particularmente limitado. Después de la adición de la muestra, el tiempo de reacción es usualmente de 1 a 120 segundos, preferentemente de 1 a 90 segundos, más preferentemente de 1 a 60 segundos, en particular, preferentemente de 1 a 45 segundos.

A continuación, para oxidar el portador de electrones a una forma reducida, se aplica un potencial predeterminado al electrodo de trabajo -2- y al contraelectrodo -4- mediante los electrodos. De este modo, el portador de electrones en forma reducida se oxida electroquímicamente para ser convertido a una forma oxidada. Mediante el valor de la corriente medida en este momento (en adelante, la corriente se puede denominar "corriente de oxidación"), se calcula la cantidad del portador de electrones en forma reducida antes de la aplicación del potencial. Además, la cantidad del sustrato que ha reaccionado con las enzimas se puede determinar cuantitativamente. El valor del potencial aplicado cuando circula la corriente de oxidación no está particularmente limitado, y se puede ajustar adecuadamente haciendo referencia a descubrimientos conocidos convencionalmente. Por ejemplo, es aconsejable aplicar un potencial de aproximadamente -200 a +700 mV, preferentemente de 0 a +500 mV entre el contraelectrodo -4- y el electrodo de trabajo -2-. El medio de aplicación del potencial para aplicar el potencial no está particularmente limitado, y puede ser un medio adecuado de aplicación de potencial conocido convencionalmente.

La manera de medir el valor de la corriente de oxidación y la manera de transformar el valor de la corriente en la concentración del sustrato puede ser de cronoamperometría, en que el valor de la corriente se mide después de un cierto periodo a partir de la aplicación de un potencial predeterminado, o cronocoulometría, en la que se realiza una medición sobre la cantidad de cargas que se obtiene integrando la respuesta de corriente mediante cronoamperometría con respecto al tiempo. Preferentemente se utiliza a cronoamperometría debido a que la medición se puede obtener con un sistema de dispositivos simple.

Se ha descrito anteriormente un ejemplo en el que la concentración de sustrato se calcula midiendo una corriente mediante la oxidación del portador de electrones en forma reducida (corriente de oxidación). Cuando proceda, es factible adoptar una realización en que la concentración del sustrato se calcula midiendo una corriente mediante la reducción del portador de electrones en forma oxidada, que permanece sin reducir (corriente de reducción).

El biosensor de la invención se puede utilizar en cualquier forma sin ninguna limitación especial. El biosensor puede ser utilizado para varias aplicaciones, tales como un biosensor de tipo desechable, que es un artículo desechable, y un biosensor para medir continuamente un valor predeterminado, incorporando como mínimo los electrodos en un cuerpo humano.

El biosensor de la invención se puede aplicar a un sensor conocido convencionalmente, tal como un sensor de grasa neutra o un sensor de colesterol.

Los resultados ventajosos de la invención se resumen a continuación.

Mediante el biosensor de la invención, la enzima redox y la enzima de descomposición de lípidos están contenidas por separado en capas de reacción diferentes entre sí; de este modo, igual que la descomposición de la grasa neutra a glicerina mediante la enzima de descomposición de lípidos, la reacción de oxidación mediante la enzima redox avanza rápidamente. Por esta razón, la concentración de glucosa o de grasa neutra en la muestra se puede medir en poco tiempo. Los valores medidos apenas varían, es decir, el biosensor mejora adicionalmente la precisión de la medición.

EJEMPLO

Los resultados ventajosos de la invención se describirán mediante los siguientes ejemplos y un ejemplo comparativo. Sin embargo, el alcance técnico de la invención no se limita solamente a los ejemplos siguientes. El símbolo "%" indica "% en masa", salvo que se especifique otra cosa.

<Medición de la concentración de grasa neutra en sangre entera>

(Ejemplo 1)

Para los electrodos se ha utilizado un chip, el DEP Chip EP-N (fabricado por la firma Bio Device Technology Co., Ltd.). En el DEP Chip EP-N, se formó el electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4-, cada uno de ellos fabricado de carbono, sobre la placa base de aislamiento -1- y, mediante la capa de aislamiento -5-, se formaron los siguientes elementos: zona de trabajo del electrodo de trabajo -2-1- fabricada de carbono, zona de trabajo del electrodo de referencia -3-1- fabricada de plata/cloruro de plata y zona de trabajo del contraelectrodo -4-1- fabricada de carbono.

Se formó una primera capa de reacción (capa GLDH) mediante las etapas siguientes.

Se mezcló deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ, glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.) para obtener unas concentraciones finales de 1,5 U, 5 mM (0,65 µg) y 0,025% (0,5 µg), respectivamente, por sensor (volumen de la muestra de "sangre entera" a suministrar: 2 µl), y para obtener una solución (solución GLDH). La solución GLDH resultante se vertió sobre EP-N para cubrir la zona de trabajo del electrodo de trabajo, la zona de trabajo del electrodo de referencia y la zona de trabajo del contraelectrodo. La solución se secó a 30 ℃ durante 5 minutos para proporcionar l a primera capa de reacción (capa GLDH).

Se formó una segunda capa de reacción (capa LPL) mediante las etapas siguientes.

Se mezclaron lipoproteína lipasa (LPL) (fabricada por la firma Asahi Kasei Corp.) y glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para obtener unas concentraciones de 75 U y 5 mM (0,65 µg), respectivamente, por sensor (volumen de muestra de líquido: 2 µl), y para obtener una solución (solución LPL). La solución LPL resultante se vertió sobre la capa GLDH formada para superponerse sobre la capa (para cubrirla). La solución se secó a 30 ℃ durante 5 minutos para pro porcionar la segunda capa de reacción (capa LPL).

De este modo, se formó (superpuesta) la capa LPL, que era la segunda capa, sobre la capa GLDH, que era la primera capa.

Se formó una tercera capa de reacción (capa del portador de electrones) mediante las etapas siguientes.

Se mezcló cloruro de hexamina rutenio (III) (fabricado por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.) para obtener concentraciones finales de 100 mM (65 µg), 25 mM (3,25 µg) y 0,1% (2 µg), respectivamente, por sensor (volumen de muestra de "sangre entera" a suministrar: 2 µl) y para producir una solución mediadora. La solución mediadora resultante se vertió en un intersticio formado adhiriendo adhesivos (cintas de doble cara) sobre una tapa fabricada de PET. A continuación, la solución se secó a 50 ℃ durante 5 minutos para proporcionar la tercera capa de reacción (capa del portador de electrones).

La tapa, sobre la que se formó la tercera capa de reacción, se unió a los adhesivos (cintas de doble cara) pegados a la placa base, sobre la que se formaron la primera y la segunda capas de reacción, para fabricar un sensor de grasa neutra. Se evaluaron las propiedades del mismo. El grosor de cada una de la primera, la segunda y la tercera capas de reacción fue de 5 µm, y la distancia de separación entre la segunda y la tercera capas de reacción fue de 0,15 mm.

Se absorbieron en el mismo dos microlitros de líquido de muestra (sangre entera; valor de grasa neutra de 300 mg/dl), y a continuación se dejaron reposar tantos segundos como el tiempo de reacción. A continuación, se utilizó el electrodo de referencia como referencia, y se aplicó un potencial de +200 mV entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Después de 5 segundos, se midió el valor de la corriente que circulaba entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. El valor de la corriente era proporcional a la concentración del portador de electrones reducido, es decir, la concentración de la grasa neutra descompuesta en la sangre entera. A partir de este valor de la corriente, se puede determinar la concentración de grasa neutra en la sangre entera. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 5. En la figura 5, los resultados del ejemplo 1 se representan mediante un círculo blanco (O).

Ejemplo 2:

Se formó una primera capa de reacción (capa GLDH) del mismo modo que en el ejemplo 1.

Se formó una segunda capa de reacción (capa LPL que contiene el portador de electrones) mediante las etapas siguientes.

Se mezclaron lipoproteína lipasa (LPL, fabricada por la firma Asahi Kasei Corp.), glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y cloruro de hexamina rutenio (III) (fabricado por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para obtener concentraciones de 75 U, 5 mM (0,65 µg) y 100 mM (65 µg), respectivamente, por sensor (volumen de líquido de la muestra: 2 µl) para obtener una solución (solución LPL que contiene el portador de electrones). La solución LPL resultante que contiene el portador de electrones se vertió sobre la capa GLDH formada, para superponerse sobre la capa (para cubrirla). La solución se secó a 30 ℃ durante 5 minutos para proporcionar la segunda capa de reacción (capa LPL que contiene el portador de electrones).

De este modo, la capa LPL que contiene el portador de electrones, que era la segunda capa, se formó (se superpuso) sobre la capa GLDH, que era la primera capa de reacción.

Se formó una capa tensoactiva mediante las etapas siguientes.

Se mezcló glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.) para obtener concentraciones finales de 25 mM (3,25 µg) y 0,01 (2 µg), respectivamente, por sensor (volumen de "sangre entera" de muestra a suministrar: 2 µl), y para proporcionar una solución de tensoactivo. La solución de tensoactivo resultante se vertió en un intersticio formado adhiriendo adhesivos (cintas de doble cara) sobre una tapa fabricada de PET. A continuación, la solución se secó a 50 ℃ durante 5 minutos para proporcionar una capa tensoactiva.

La tapa, sobre la que se formó la capa tensoactiva, se unió a los adhesivos (cintas de doble cara) pegados a la placa base, sobre la que se formaron la primera y la segunda capas de reacción, para fabricar un sensor de grasa neutra. Se evaluaron las propiedades del mismo. El grosor de cada una de la primera y la segunda capas de reacción y de la capa tensoactiva era de 5 µm, y la distancia de separación entre la segunda capa de reacción y la capa tensoactiva era de 0,15 mm.

En relación con el sensor de grasa neutra fabricado según se ha indicado anteriormente, el valor de la corriente del mismo se midió del mismo modo que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 5. En la figura 5, los resultados del ejemplo 2 se representan mediante un triángulo blanco (Δ).

Ejemplo comparativo:

Se preparó una solución GLDH y una solución LPL del mismo modo que en el ejemplo 1. A continuación, se mezclaron entre sí la solución GLDH y la solución LPL para fabricar la cantidad de cada uno de los componentes por sensor (volumen de muestra de "sangre entera" a suministrar: 2 µl), igual que en el ejemplo. El líquido mezclado se vertió sobre el chip EP-N para cubrir la zona de trabajo del electrodo de trabajo, la zona de trabajo del electrodo de referencia y la zona de trabajo del contraelectrodo. La solución se secó a 30 ℃ durante 5 minutos para proporcionar una capa mezclada de la capa GLDH y la capa LPL. Excepto estas etapas, se fabricó un sensor de grasa neutra comparativo del mismo modo que en el ejemplo 1.

En relación con el sensor de grasa neutra fabricado según se ha indicado anteriormente, el valor de la corriente del mismo se midió del mismo modo que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 5. En la figura 5, los resultados del ejemplo comparativo están representados mediante un cuadrado negro (◆).

Ejemplo 3:

Los electrodos utilizados en este caso fueron electrodos de un sistema de tres electrodos, diseñados y fabricados por los propios inventores. En el sistema de electrodos, se formaron sobre la placa base de aislamiento -1- el electrodo de trabajo -2-, el electrodo de referencia -3- y el contraelectrodo -4- fabricados, cada uno, de carbono, y mediante la capa de aislamiento -5-, se formaron las siguientes: zona de trabajo del electrodo de trabajo -2-1- fabricada de carbono, zona de trabajo del electrodo de referencia -3-1- fabricada de plata/cloruro de plata y zona de trabajo del contraelectrodo -4-1- fabricada de carbono.

Se formó una primera capa de reacción (capa GLDH) mediante las etapas siguientes.

Se mezcló deshidrogenasa de glicerina dependiente de PQQ, glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), Emalgen PP-290 (fabricado por la firma Kao Corp.) y polímero polietilenglicol 6000 como un polímero hidrófilo, para obtener concentraciones finales de 1,0 U, 10 mM (1,3 µg), 0,05% (0,5 µg) y 0,75% (7,5 µg), respectivamente, por sensor (volumen de la muestra de "sangre entera" a suministrar: 11µl) para proporcionar una solución (solución GLDH). La solución GLDH resultante se vertió sobre los electrodos para cubrir la zona de trabajo del electrodo de trabajo, la zona de trabajo del electrodo de referencia y la zona de trabajo del contraelectrodo. La solución se secó a 40 ℃ durante 5 minutos para proporcionar la primera capa de reacción (capa GLDH).

Se formó una segunda capa de reacción (capa LPL que contiene el portador de electrones) mediante las etapas siguientes.

Se mezclaron lipoproteína lipasa (LPL, fabricada por la firma Asahi Kasei Corp.), glicil-glicina (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y cloruro de hexamina rutenio (III) (fabricado por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para obtener concentraciones finales de 80 U, 5 mM (0,65 µg) y 200 mM (61,9 µg), respectivamente, por sensor (volumen de líquido de la muestra: 1 µl) para obtener una solución (solución LPL que contiene el portador de electrones). La solución LPL resultante que contiene el portador de electrones se vertió sobre la capa GLDH formada, para superponerla sobre la capa (para cubrirla). La solución se secó a 40 ℃ durante 5 minutos para proporcionar la segunda capa de reacción (capa LPL que contiene el portador de electrones).

De este modo, la capa LPL que contiene el portador de electrones, que era la segunda capa, se formó (se superpuso) sobre la capa GLDH, que era la primera capa de reacción.

Se formó una capa tensoactiva mediante las etapas siguientes.

La tapa, sobre la que se formó la capa tensoactiva, se unió a los adhesivos (cintas de doble cara) pegados a la placa base, sobre la que se formaron la primera y la segunda capas de reacción, para fabricar un sensor de grasa neutra. Se evaluaron las propiedades del mismo. El grosor de cada una de la primera, segunda y tercera capas de reacción y de la capa tensoactiva era de 5 µm, y la distancia de separación entre la segunda capa de reacción y la capa tensoactiva era de 0,1 mm.

El sensor de grasa neutra fabricado según lo anterior se evaluó como sigue: se absorbió en el mismo un microlitro de líquido de muestra (la sangre entera; valor de grasa neutra de 183 mg/dl) y a continuación se dejó reposar tantos segundos como el tiempo de reacción. A continuación, se utilizó el electrodo de referencia como referencia, y se aplicó un potencial de +200 mV entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Después de un segundo, se midió el valor de la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. El valor de la corriente es proporcional a la concentración del portador de electrones reducido, es decir, la concentración de la grasa neutra descompuesta en la sangre entera. A partir de este valor de la corriente, se puede determinar la concentración de grasa neutra en la sangre entera. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 6. En la figura 6, los resultados del ejemplo 3 se representan mediante un círculo blanco (O).

(Ejemplo 4)

El valor de la corriente se midió del mismo modo que en el ejemplo 3 excepto en que, en lugar del 0,75% (7,5 µg) de polietilenglicol 6000 del ejemplo 3, se utilizó alcohol polivinílico 500 (fabricado por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) de la misma concentración. Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 6. En la figura 6, los resultados del ejemplo 4 se representan mediante un círculo negro (●).

(Ejemplo 5)

El valor de la corriente se midió del mismo modo que en el ejemplo 3 excepto en que, en lugar del 0,75% (7,5 µg) de polietilenglicol 6000 del ejemplo 3, se utilizó el 10% (100 µg) de trehalosa (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 7. En la figura 7, los resultados del ejemplo 5 se representan mediante un cuadrado blanco (□).

(Ejemplo 6)

El valor de la corriente se midió del mismo modo que en el ejemplo 3 excepto en que, en lugar del 0,75% (7,5 µg) de polietilenglicol 6000 del ejemplo 3, se utilizó el 1% (10 µg) de BSA (fabricada por la firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 7. En la figura 7, los resultados del ejemplo 6 se representan mediante un triángulo blanco (Δ).

[Tabla 1]

Tiempo de reacción (segundos)	Valor de la corriente (µA)						
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo comparativo	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
0	1,373	1,384	1,355	2,445	2,246	2,505	2,384
	1,330	1,391	1,406	2,364	2,197	2,613	2,369
30	2,412	2,345	1,713	5,334	5,288	5,519	5,217
	2,237	2,299	1,628	5,477	5,313	5,445	5,366
45	2,547	2,509	1,844	5,898	5,796	6,173	5,802
	2,449	2,478	1,900	5,989	5,704	6,088	5,849
60	2,580	2,579	2,062	6,093	5,899	6,101	5,918
	2,613	2,506	2,125	5,960	5,915	6,079	5,933
90	2,673	2,631	2,409	6,015	5,942	6,131	5,831
	2,639	2,567	2,377	6,125	5,877	6,069	5,976
120	2,513	2,671	2,571	6,062	5,952	6,177	5,945
	2,597	2,598	2,616	6,043	5,913	6,192	5,899

Tal como resulta evidente a partir de la tabla 1 y de las figuras 5, 6 y 7, se comprende que el tiempo transcurrido hasta que el valor medido de la corriente en el sensor comparativo de grasa neutra del ejemplo comparativo alcanzó un estado de equilibrio fue de aproximadamente 120 segundos, mientras que el tiempo hasta que el valor medido de la corriente en el sensor de grasa neutra de cada uno de los ejemplos 1 a 6 alcanzó un estado de equilibrio fue de aproximadamente 45 segundos. Estos resultados demuestran evidentemente que la utilización del biosensor de la invención hace posible medir la grasa neutra en un tiempo más corto que el de los biosensores de la técnica anterior. Los resultados del ejemplo comparativo estarían basados en lo siguiente: la LPL, que es la enzima de descomposición de lípidos, tiene una solubilidad mayor que la GLDH, que es la enzima redox; por lo tanto, cuando GLDH y LPL están presentes en estado mezclado en la misma capa, tal como en el sensor comparativo de grasa neutra del ejemplo comparativo, la baja solubilidad de GLDH afecta a la solubilidad de LPL, de manera que la solubilidad total cae. Por otra parte, el sensor de grasa neutra de la invención resuelve dicho problema. Tal como se ha descrito en los ejemplos, disponiendo las dos enzimas en capas diferentes entre sí, la LPL se disuelve rápidamente y comienza la reacción, y a continuación se disuelve la GLDH y comienza la reacción. Se asume que, como resultado, la separación de las dos enzimas en capas diferentes mejora la reactividad total, de manera que la invención consigue la reducción del tiempo de reacción.

En los ejemplos 3 a 6, los tiempos de reacción respectivos fueron de 45 segundos, y estos fueron tan cortos como en los ejemplos 1 y 2. Por consiguiente, asimismo en el caso de incluir sacárido, proteína o polímero hidrófilo, por lo menos, en una de la primera, segunda y tercera capas de reacción, se obtiene el resultado excelente de reducción del tiempo de reacción.

Explicación de los signos de referencia

-1- Placa base de aislamiento

-2- Electrodo de trabajo

-2-1- Zona de trabajo del electrodo de trabajo

-3- Electrodo de referencia

-3-1- Zona de trabajo del electrodo de referencia

-4- Contraelectrodo

-4-1- Zona de trabajo del contraelectrodo

-5- Capa de aislamiento

-6- (-6a- y -6b-) Adhesivo

-7- Tapa

-8- Primera capa de reacción

-9- Segunda capa de reacción

-10- Tercera capa de reacción

-S- Espacio

REIVINDICACIONES

1. Biosensor, que comprende una placa base de aislamiento, un sistema de electrodos que contiene por lo menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo y está formado sobre la placa base de aislamiento, y una sección de suministro de muestras formada sobre el sistema de electrodos,

en el que la sección de suministro de muestras tiene una capa de reacción que comprende:

una primera capa de reacción formada sobre el sistema de electrodos y que contiene por lo menos una enzima redox en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ), dinucleótido de flavina, adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN) como grupo prostético; y

una segunda capa de reacción formada aplicando, sobre la primera capa de reacción, una solución que incluye una enzima de descomposición de lípidos.

2. Biosensor, según la reivindicación 1, en el que la sección de suministro de muestras comprende además un portador de electrones.

3. Biosensor, según la reivindicación 2, en el que el portador de electrones está situado en la segunda capa de reacción, o

una tercera capa de reacción que tiene el portador de electrones está dispuesta adicionalmente en la sección de suministro de muestras estando separada de la primera y la segunda capas de reacción.

4. Biosensor, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima redox es poliol deshidrogenasa en la que está incorporada pirroloquinolina quinona (PQQ) como el grupo prostético.

5. Biosensor, según la reivindicación 3 ó 4, en el que la primera, segunda o tercera capas de reacción comprenden además un tensoactivo.

6. Biosensor, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la primera, segunda o tercera capas de reacción comprenden además un polímero hidrófilo.

7. Biosensor, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la primera, segunda o tercera capas de reacción comprenden además por lo menos uno de sacárido y proteína.

FIG.1

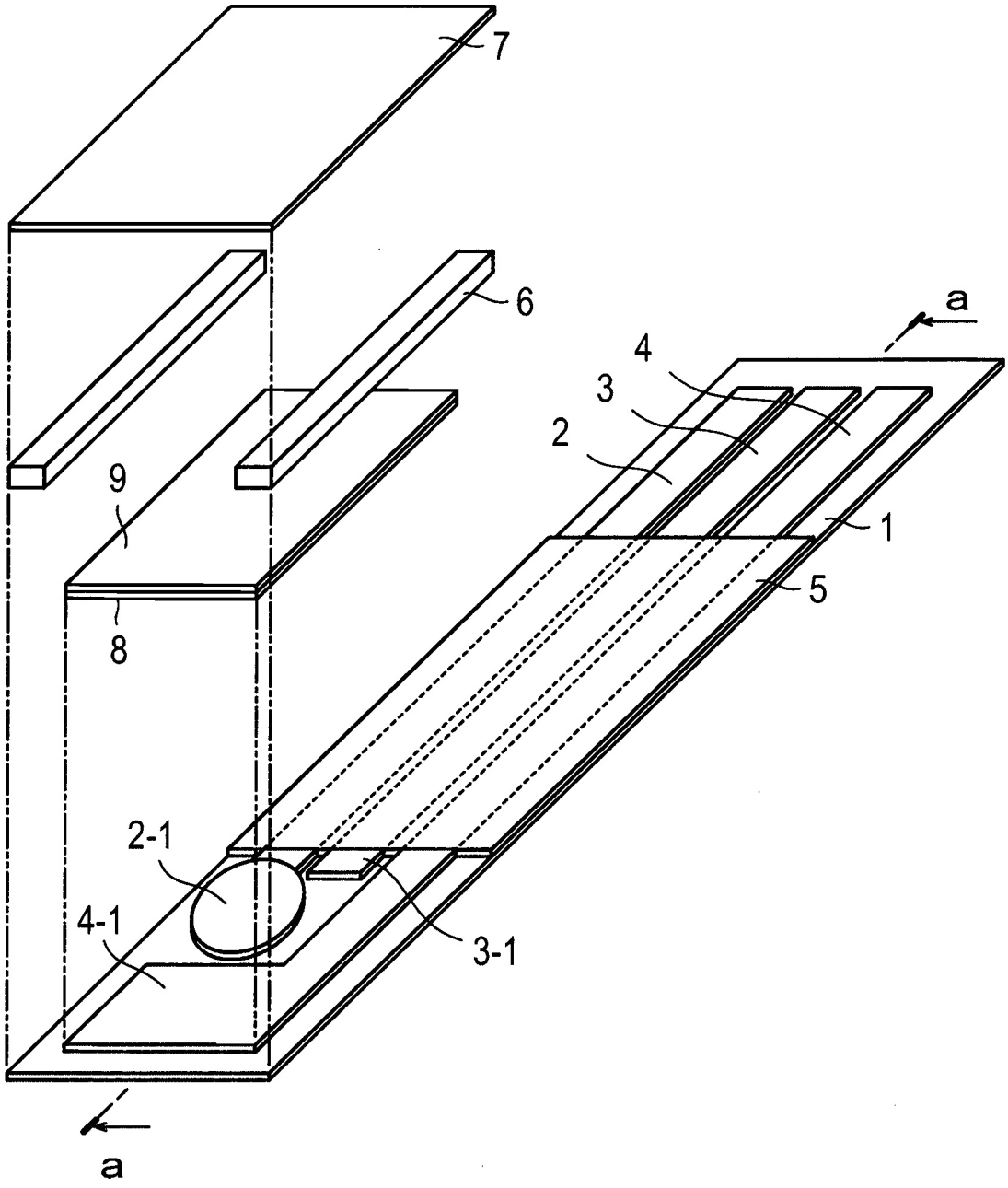


FIG.2

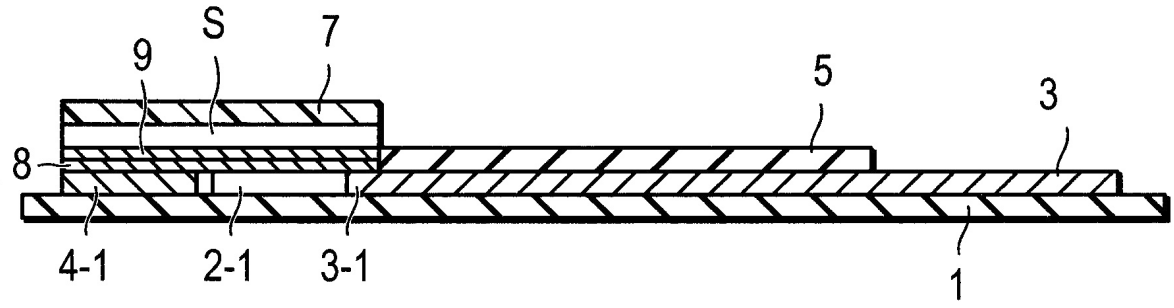


FIG.3

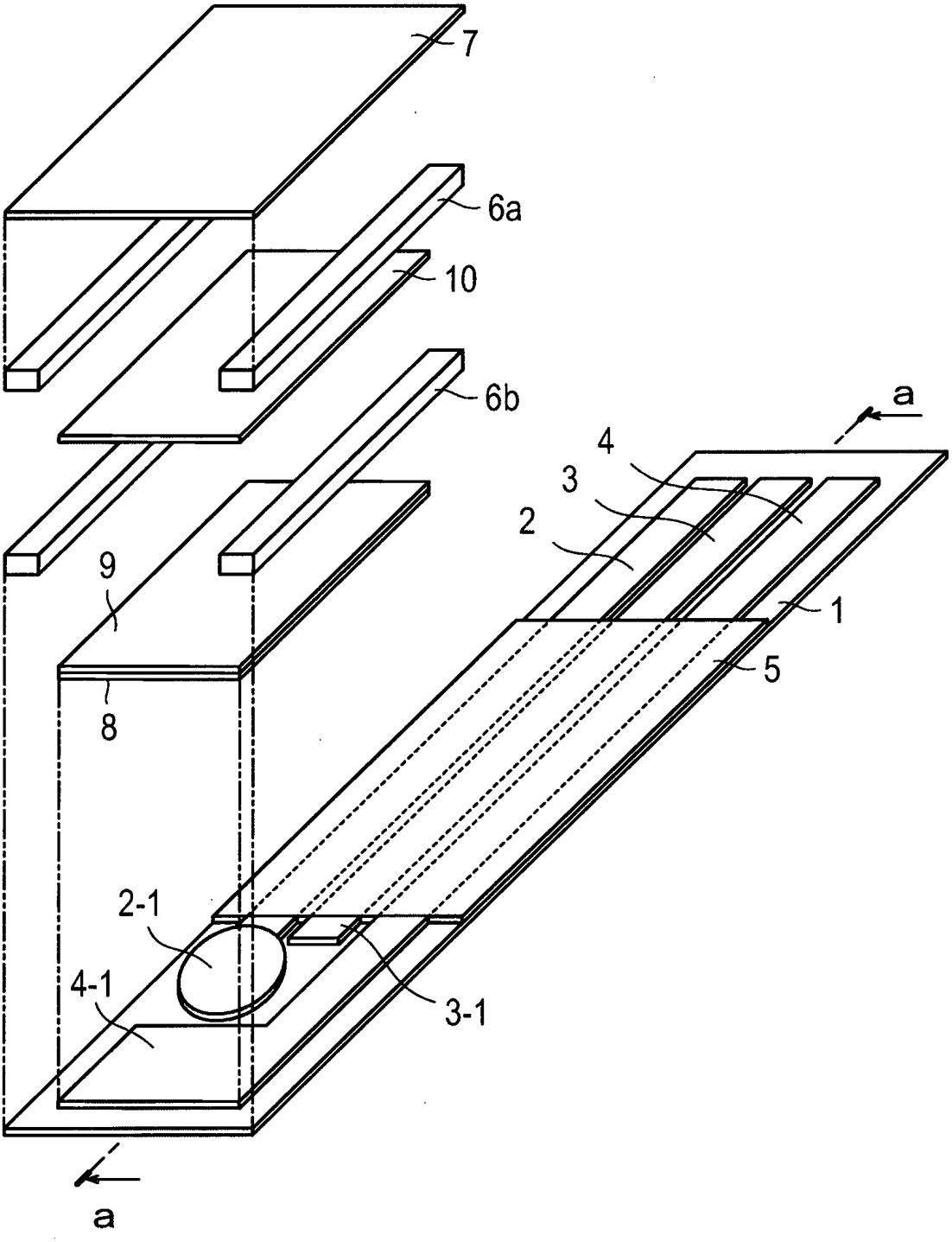


FIG.4

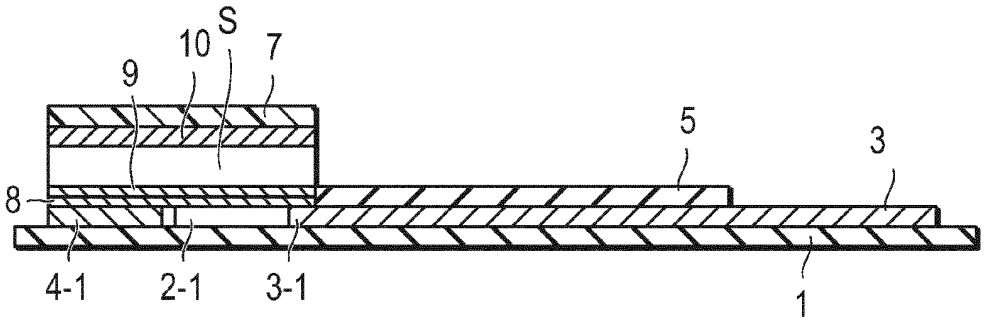

S
10
7
9
5
3
8
4-1
2-1
3-1
1

FIG.5

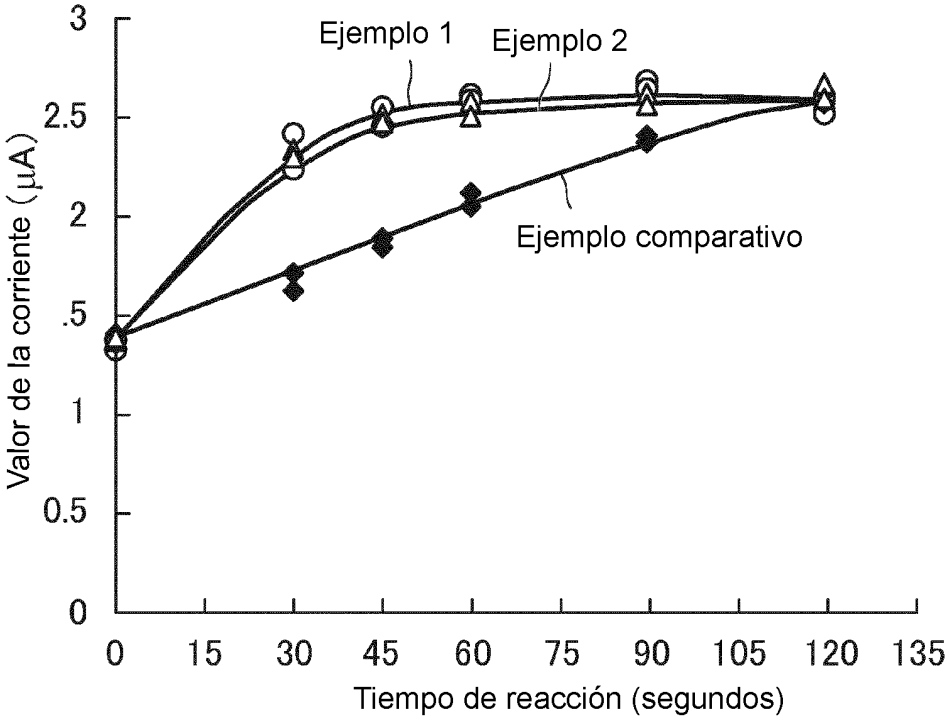

Ejemplo 1
Ejemplo 2
Ejemplo comparativo
Valor de la corriente (μA)
3
2.5
2
.5
1
0.5
0
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
Tiempo de reacción (segundos)

FIG.6

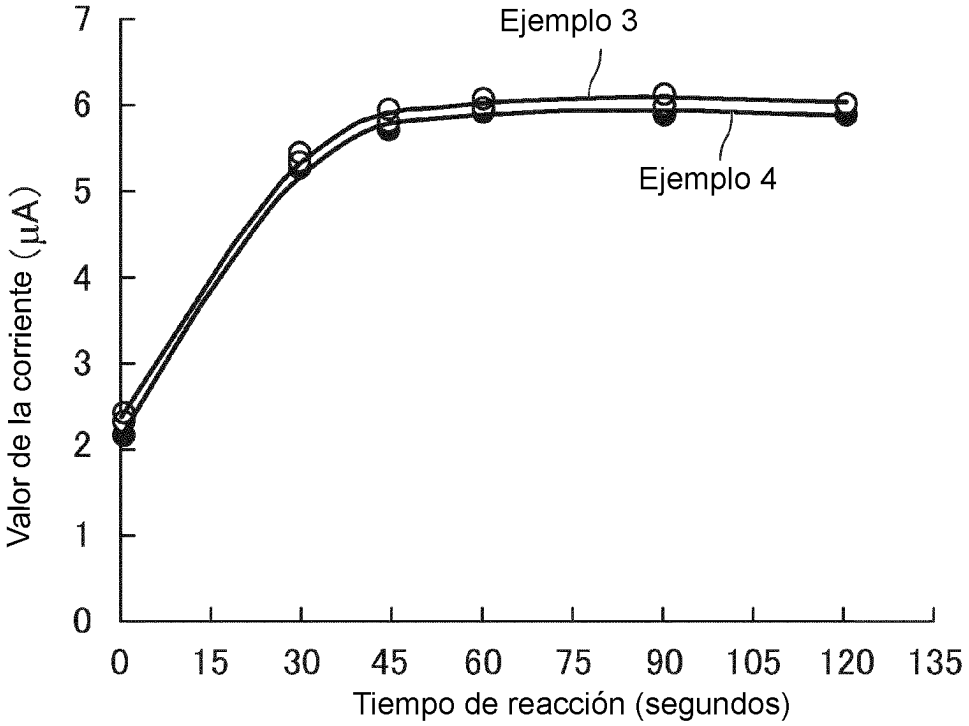
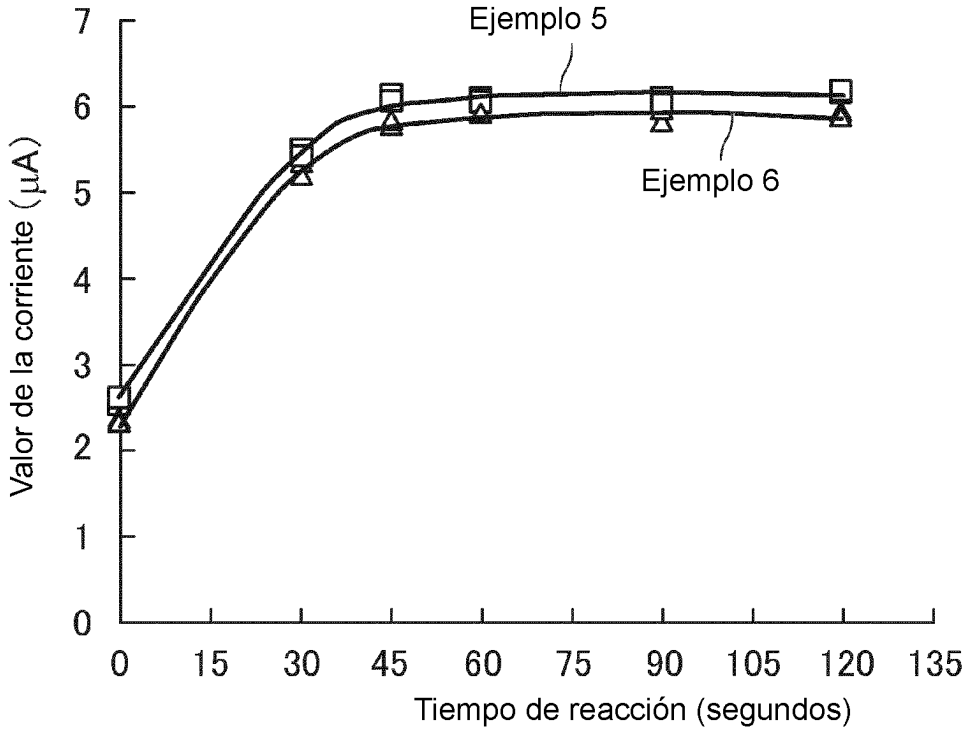

Ejemplo 3
Ejemplo 4
Valor de la corriente (μA)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
Tiempo de reacción (segundos)

FIG.7


Ejemplo 5
Ejemplo 6
Valor de la corriente (μA)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
Tiempo de reacción (segundos)