



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104145023 B

(45)授权公告日 2016.11.09

(21)申请号 201380012775.4

(22)申请日 2013.03.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104145023 A

(43)申请公布日 2014.11.12

(30)优先权数据

12158286.0 2012.03.06 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/054351 2013.03.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/131885 EN 2013.09.12

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 G.开姆尼蒂厄斯 O.加 T.纳格尔

K.雷赫特

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 杜艳玲 梁谋

(51)Int.Cl.

C12Q 1/32(2006.01)

(56)对比文件

CN 101801985 A,2010.08.11,

Karin Lippert and Erwin A. Galinski.

“Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying”.《Appl Microbiol Biotechnol》.1992,pp.61-65.

Karin Lippert and Erwin A. Galinski.

“Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying”.《Appl Microbiol Biotechnol》.1992,pp.61-65.

审查员 冯超

权利要求书3页 说明书14页 附图10页

(54)发明名称

用于酶稳定化的相容性溶质四氢嘧啶及其衍生物

(57)摘要

本发明涉及用于维持和保护酶活性的工具和方法。特别地,本发明涉及干燥组合物,其包含脱氢酶、氧化还原辅因子、在存在氧化还原当量的条件下能引起指示剂的光学性质的至少一种光学变化的试剂、指示剂、以及至少一种相容性溶质,所述溶质是四氢嘧啶或其衍生物。本发明进一步考虑用于测定来自体液样品的被分析物的诊断性测试元件以及制造这种测试元件的方法。本发明进一步设想如上所述的至少一种相容性溶质用于减少干燥条件下组合物中至少一种酶的酶活性的降低的用途。而且根据本发明,还考虑基于测试元件用于测定体液样品中被分析物的存在或量的方法。

1.干燥组合物,包含以下组分:

- (a) 脱氢酶;
- (b) 氧化还原辅因子;
- (c) 在存在氧化还原当量的条件下能够引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂;
- (d) 指示剂;以及
- (e) 至少一种相容性溶质,其是四氢嘧啶或其衍生物;

其中所述脱氢酶是葡萄糖脱氢酶,并且

其中四氢嘧啶的衍生物选自羟基四氢嘧啶、homoeoctoine、羟基四氢嘧啶酯、羟基四氢嘧啶醚、四氢嘧啶的磺酰基衍生物或四氢嘧啶的酯化磺酰基衍生物和四氢嘧啶磺酰基衍生物的酰胺。

2.权利要求1的组合物,其中所述葡萄糖脱氢酶选自葡萄糖脱氢酶EC号1.1.1.47、醌蛋白葡萄糖脱氢酶EC号1.1.5.2、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶EC号1.1.1.49、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)-依赖性葡萄糖脱氢酶EC号1.1.1.119和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)-依赖性葡萄糖脱氢酶EC号1.1.99.10或其酶活性突变体。

3.权利要求2的组合物,其中所述醌蛋白葡萄糖脱氢酶EC号1.1.5.2是吡咯喹啉醌(PQQ)-依赖性葡萄糖脱氢酶EC号1.1.5.2。

4.权利要求1-3所述任一项的组合物,其中所述在存在氧化还原当量的条件下能够引起至少一种光学性质变化的试剂能够将所述氧化还原当量从氧化还原辅因子转移给指示剂。

5.权利要求4的组合物,其中所述试剂是(i)黄递酶,(ii) 吩嗪,(iii) 亚硝基苯胺,或(iv)醌。

6.权利要求5的组合物,其中所述黄递酶是硫辛酰胺脱氢酶或NADH脱氢酶。

7.权利要求5的组合物,其中所述吩嗪是吩嗪硫酸乙酯、吩嗪硫酸甲酯、1-(3-羧丙氧基)-5-吩嗪鎓三氟甲磺酸乙酯或1-甲氧基吩嗪硫酸甲酯。

8.权利要求5的组合物,其中所述亚硝基苯胺是[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇-盐酸盐。

9.权利要求5的组合物,其中所述醌是菲醌、二氮菲醌或苯并[h]-喹啉醌。

10.权利要求1-9任一项的组合物,其中所述氧化还原辅因子选自carba-NAD、NAD、FAD和PQQ。

11.一种用于测定体液样品中被分析物的诊断性测试元件,其包含载体上的权利要求1-10任一项的组合物。

12.权利要求11的测试元件,其中所述载体包含测试区域,所述测试区域含有所述组合物,其中所述测试区域具有所述体液样品应用于其上的点样端,和当被分析物与所述组合物反应时能够检测所述试剂的至少一种光学性质变化的检测端。

13.制造诊断性测试元件的方法,包括在载体上产生根据权利要求1-10任一项的组合物的步骤。

14.权利要求13的方法,其中所述产生包括以下步骤:

(i) 将包含权利要求1的组分(a)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域;以及

(ii) 从所述组合物中除去所述溶剂；

或者

(i) 将包含权利要求1的组分(a)，(b)，(d)和(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域的第一层；

(ii) 从所述第一层的组合物除去所述溶剂；

(iii) 将包含权利要求1的组分(c)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述第一层上的第二层；以及

(iv) 从所述第二层的组合物除去所述溶剂；

或者

(i) 将包含权利要求1的组分(a)，(b)，(d)和(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域的第一层；

(ii) 从所述第一层的组合物除去所述溶剂；

(iii) 将包含权利要求1的组分(b)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述第一层上的第二层；以及

(iv) 从所述第二层的组合物除去所述溶剂；

或者

(i) 将包含权利要求1的组分(a)，(d)和(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域的第一层；

(ii) 从所述第一层的组合物除去所述溶剂；

(iii) 将包含权利要求1的组分(b)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述第一层上的第二层；以及

(iv) 从所述第二层的组合物除去所述溶剂；

或

(i) 将包含权利要求1的组分(c)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域的第一层；

(ii) 从所述第一层的组合物除去所述溶剂；

(iii) 将包含权利要求1的组分(a)，(b)，(d)和(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述第一层上的第二层；以及

(iv) 从所述第二层的组合物除去所述溶剂；

或者

(i) 将包含权利要求1的组分(b)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域的第一层；

(ii) 从所述第一层的组合物除去所述溶剂；

(iii) 将包含权利要求1的组分(a)，(b)，(d)和(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述第一层上的第二层；以及

(iv) 从所述第二层的组合物除去所述溶剂；

或者

(i) 将包含权利要求1的组分(b)-(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述载体上的测试区域的第一层；

(ii) 从所述第一层的组合物除去所述溶剂;

(iii) 将包含权利要求1的组分(a), (d)和(e)的组合物和溶剂即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物应用于所述第一层上的第二层;以及

(iv) 从所述第二层的组合物除去所述溶剂。

15. 权利要求13或14的方法, 其中所述相容性溶质在干燥条件下减少所述组合物中至少一种酶的酶活性的降低。

16. 至少一种相容性溶质, 即四氢嘧啶或其衍生物在干燥条件下用于减少组合物中至少一种酶的酶活性的降低中的用途, 其中所述组合物包含脱氢酶, 氧化还原辅因子, 在存在氧化还原当量的条件下能够引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂和指示剂,

其中所述四氢嘧啶衍生物选自羟基四氢嘧啶、homoectoine、羟基四氢嘧啶酯、羟基四氢嘧啶醚、四氢嘧啶的磺酰基衍生物或四氢嘧啶的酯化磺酰基衍生物和四氢嘧啶磺酰基衍生物酰胺, 以及

其中所述脱氢酶是葡萄糖脱氢酶。

17. 权利要求16的用途, 其中干燥条件下所述组合物中的所述至少一种相容性溶质包含在诊断性测试元件中。

18. 权利要求17的用途, 其中所述测试元件是根据权利要求11或12的诊断性测试元件。

19. 权利要求1-10任一项的干燥组合物在制备用于测定体液样品中被分析物的存在或量的测试元件中的用途, 其中所述测定包括以下步骤:

(a) 使所述诊断性测试元件与怀疑含有被分析物的体液在适合于将所述至少一种酶转化为重构状态的条件接触;

(b) 在诊断性测试元件上测量湿组合物中指示剂的至少一种光学性质的变化, 所述湿组合物包含重构状态的至少一种酶, 以此测定体液样品中被分析物的存在或量。

用于酶稳定化的相容性溶质四氢嘧啶及其衍生物

[0001] 本发明涉及用于维持和保护酶活性的工具和方法。特别地,本发明涉及干燥组合物,其包含脱氢酶、氧化还原辅因子、在存在氧化还原当量的条件下能引起指示剂的光学性质的至少一种光学变化的试剂、指示剂、以及至少一种相容性溶质,所述相容性溶质是四氢嘧啶(ectoine)或其衍生物。本发明进一步考虑用于测定来自体液样品的被分析物的诊断性测试元件和制造这种测试元件的方法。本发明进一步设想了如上所述的至少一种相容性溶质在减少干燥条件下组合物中至少一种酶的酶活性的降低中的应用。此外,根据本发明,考虑了基于测试元件测定体液样品中被分析物的存在或量的方法。

[0002] 通常制造诊断性测试元件用于快速诊断应用。因此,该元件对于处理和储存来说应当是稳健的。这特别适用于测试元件的测试化学。(参见Hönes 2008, Diabetes Technology & Therapeutics 10: S10)。

[0003] 但是,许多诊断性测试元件是基于测试元件上存在的相当复杂的酶测试化学的。特别是,测试元件包含载体和检测层,其中检测层通常含有酶。对于测试元件的适当功能具有决定性的是这些酶在储存期间和处理之后保持生物学活性。由于对单次测量进行校准通常是不可能的,测试元件通常分批校准。一批测试元件的校准信息被储存并被用于该批次的每个元件,而不管处理和储存中的个体差异。

[0004] 但是,测试元件的预处理和储存条件可能严重影响酶活性。例如,测试元件的制造或储存过程中的热处理都可以使酶变性,使得测试元件上存在的总酶活性显著降低,这进而在使用该测试元件时导致错误的测试结果。类似地,许多酶对于氧化过程敏感,这也会导致变性和不可逆的酶失活。但是,测试元件上的许多酶,至少在储存期间是存在于无溶剂的环境中,这可能甚至促进了这种氧化过程。而且,检测层可能包含更利于氧化过程的其它组分,例如氧化还原辅因子和其它氧化还原相关组分等。

[0005] 但是,在这种不利条件下保护酶活性的问题,不仅仅应用于测试元件。而更常见地,许多酶制剂是以基本上无溶剂的形式,例如冻干制剂的形式被提供和储存的。

[0006] 已对各种所谓的相容性溶质,即不同化学分类的低分子化合物,例如糖、多元醇、游离氨基酸、氨基酸衍生物、胺和硫类似物、硫酸酯、短肽和环2,3-二磷酸甘油酸酯对于它们在溶液中和干燥条件下的蛋白质的保护性质进行了研究(参见Arakawa 1985, Biophys J 47: 411; Lippert 1992, Appl Microbiol Biotechnol 37: 61; Göller 1999, J Mol Catal B Enzymatic 7:37; Lentzen 2006, Appl Microbiol Biotechnol 72: 623; W02007/002657, US2010/0255120)。

[0007] 在用于对溶液中的葡萄糖进行电化学测定的传感器中四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶对于葡萄糖氧化酶的稳定作用先前已有报道(W02007/097653; Loose 2006, Proceedings of the 24th IASTED International Multi-conference Biomedical Engineering, 167-173, Innsbruck, AT)。但是,已知葡萄糖氧化酶是一种对于氧化胁迫和热而言相当稳定的酶。另一方面,羟基四氢嘧啶被报道对于乳酸脱氢酶来说不能防止蛋白质在溶液中聚集(Andersson 2000, Biotechnol Appl Biochem 32: 145-153)。通常脱氢酶以及,特别是葡萄糖脱氢酶对于氧化胁迫和热处理是相当敏感的酶。然而,它们是重要的诊断工具。

[0008] 四氢嘧啶还被报道在包含胆固醇脱氢酶针对酶活性进行电化学检测的胆固醇生物传感器中作为试剂(WO2007/132226或WO2006/067424)。

[0009] 但是,存在对储存和温度敏感酶类的酶活性进行保护的需要,所述酶用于诊断应用,并且特别用于脱氢酶类别例如葡萄糖脱氢酶。

[0010] 本发明所基于的技术问题可以被视为是提供了迎合上述需要的工具和方法。所述问题由权利要求中和本文下述表征的实施方案解决。

[0011] 因此,本发明涉及干燥组合物,其包含以下组分:

[0012] (a) 脱氢酶;

[0013] (b) 氧化还原辅因子;

[0014] (c) 在存在氧化还原当量的条件下能引起指示剂的光学性质的至少一种变化的试剂;

[0015] (d) 指示剂;以及

[0016] (e) 至少一种相容性溶质,其是四氢嘧啶或其衍生物。

[0017] 本文所使用的术语“干燥”是指组合物基本不含溶剂或溶剂混合物。本文所使用的基本不含是指最初存在于组合物溶液中的溶剂或溶剂混合物的至少85%,至少90%,至少92%,至少95%或至少98%被从组合物中除去。相应地,优选设想存在于本发明的干燥组合物中的溶剂或溶剂混合物的量为至多15%,以及优选地,至多10%,至多8%,至多5%,至多2%。用以定义量的前述百分比数值和本文中提及的其它百分比数值是指重量百分比(w/w)。

[0018] 本发明的这种组合物优选在正常条件下,即在室温和正常压力下是固体组合物。

[0019] 根据本发明的溶剂允许在不会不可逆地损害所述组合物组分的功能,且特别是脱氢酶的酶活性的条件下溶解本发明的组合物组分的溶剂。而且,设想优选溶剂在标准压力,优选1 bar +/- 10%,在5-40℃,以及更优选室温,优选20℃ +/- 10℃的温度范围内溶解组分。根据本发明的合适的溶剂包括,优选地,水,水性缓冲液,例如磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液,醇类,例如己醇,2-甲氧基-丙醇,2-甲基-2-丁醇、柠檬酸盐缓冲液、磷酸甘油、或Good氏缓冲液(优选除Tris缓冲液之外还包括)。应当理解,根据本发明,所使用的溶剂可以是两种或更多种上述溶剂的混合物。本文中设想的优选的溶剂混合物是水或水性缓冲液和醇类的混合物,且特别是下面所附的实施例中提及的溶剂混合物。

[0020] 优选地,可以通过将本发明组合物的组分首先溶解于溶剂或溶剂组合物中,然后通过适当的处理除去所述溶剂或溶剂组合物,使得剩余的组合物基本不含所述溶剂或溶剂组合物,提供根据本发明的干燥组合物。本发明优选设想的适当的处理包括热处理、蒸发技术、冻干等。优选地,所设想的处理是热处理以及特别是在下述条件下的热处理:用热循环在大约60℃或更高的温度热处理大约20-45分钟,或者在大约95℃热处理大约1-2分钟;组合物的厚度是20-200微米或更小;压力为1 bar或0.1 bar。此外,应当理解,为了使组合物保持在干燥条件下,优选在存在干燥剂的条件下进行储存。合适的干燥剂,优选地,包括硅胶、沸石、碳酸钙或硫酸镁。

[0021] 本文使用的术语“脱氢酶”指能够通过将作为氧化还原当量的氢化物(H⁻)转移给受体分子,优选地,转移给本文其它部分所提及的氧化还原辅因子,从而催化底物氧化的多肽。本发明设想的脱氢酶,优选是那些依赖于氧化还原辅因子(或者有时被称为辅酶)例如吡咯喹啉醌(PQQ),烟酰胺-腺嘌呤-二核苷酸(NAD)或其衍生物,或者黄素辅因子,例如黄

素-腺嘌呤-二核苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN)的脱氢酶。优选的脱氢酶是,特别地,乳酸脱氢酶(EC号1.1.1.27或1.1.1.28)、葡萄糖脱氢酶(见下文)、乙醇脱氢酶(EC号1.1.1.1或1.1.1.2)、L-氨基酸脱氢酶(EC号1.4.1.5)、甘油脱氢酶(EC号1.1.1.6)、苹果酸脱氢酶(EC号1.1.1.37)、3-羟基丁酸脱氢酶(EC号1.1.1.30)或山梨醇脱氢酶(EC号1.1.1.14)。

[0022] 更优选地,所述脱氢酶是葡萄糖脱氢酶。最优选地,所述葡萄糖脱氢酶选自由葡萄糖脱氢酶(EC号1.1.1.47),醌蛋白葡萄糖脱氢酶(EC号1.1.5.2),特别是吡咯喹啉醌(PQQ)-依赖性葡萄糖脱氢酶(EC号1.1.5.2),葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC号1.1.1.49),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)-依赖性葡萄糖脱氢酶(EC号1.1.1.119)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)-依赖性葡萄糖脱氢酶(EC号1.1.99.10)或其酶活性突变体组成的组。根据本发明优选的是W02011/020856中公开的葡萄糖脱氢酶(E.C. 1.1.1.47)突变体,其至少在氨基酸位置96,170和/或252具有突变,通过引用将该文献并入本文。在这些氨基酸位置上设想的优选的突变是Glu96Gly, Glu170Arg或Lys和/或Lys252Leu的取代。

[0023] 所述酶家族的优选成员的结构和性质是本领域熟知的(参见Olsthorn 1998, Biochemistry 37: 13854-13861; Pauly 1976, Hoppe Seylers Z Physiol Chem 356: 1613-1623; Tsujimura 2006, Biosci Biotechnol Biochem 70: 654-659)。前述酶的酶活性突变体可以通过对现有技术中之前描述的前述野生型酶报道的氨基酸序列进行一个或多个氨基酸的取代,添加或缺失获得。优选的突变体是PQQ-依赖性葡萄糖脱氢酶突变体,它们与其野生型对应物相比具有提高的底物特异性,如US 7,132,270或US 7,547,535中所公开的。通过引用将这两篇文献关于突变体的内容合并入本文。其它突变体是在Baik et al (Baik 2005, Appl Environ Microbiol 71: 3285), Vasquez-Figuera et al. (Vasquez-Figuera 2007, Chem BioChem 8: 2295)和W0 2005/045016中公开的那些。

[0024] 本文所使用的术语“氧化还原辅因子”指可以作为酶促转移的氧化还原当量,特别是氢化物(H⁻)的受体的分子。优选地,氧化还原辅因子是PQQ, NAD或FAD。应当理解,本发明的组合中包括的氧化还原辅因子依赖于所设想的脱氢酶的性质。例如,在根据本发明的一种组合中PQQ与PQQ依赖性葡萄糖脱氢酶组合,在根据本发明的一种组合中NAD与NAD依赖性葡萄糖脱氢酶组合,以及在根据本发明的一种组合中FAD与FAD依赖性葡萄糖脱氢酶组合。根据本发明的氧化还原辅因子优选还可以是PQQ, NAD或FAD的衍生物。优选的NAD衍生物是在W0 2007/012494中公开的那些,通过引用关于所公开的NAD/NADH和/或NADP/NADPH衍生物特此将其并入。更优选地,根据本发明的氧化还原辅因子是如W0 2007/012494中所公开的carba-NAD。

[0025] 四氢嘧啶(CAS号:96702-03-3)是本领域熟知的在细菌中天然存在的有机化合物,其具有结构式C₆H₁₀N₂O₂。它也被称为(S)-2-甲基-3,4,5,6-四氢嘧啶-4-羧酸。四氢嘧啶可以从多种细菌,特别是盐单胞菌科和硬壁菌门的属,通过本领域熟知的技术获得(参见W01994/15923)。

[0026] 根据本发明所称四氢嘧啶的“衍生物”是在溶液中或在干燥状态下能阻止本文所称的至少一种酶的酶活性的降低的结构相关的有机分子。优选地,所述酶活性的降低以与对四氢嘧啶所发现相似或相同的方式和/或与其相似或相同的程度被阻止。更优选地,四氢嘧啶的衍生物,如果存在于根据本发明的组合中,将能够阻止在制造和/或储存期间,特别是在室温或更高温度例如45℃或50℃或者甚至是高达60℃的温度储存期间发生的酶活

性的降低,并达到统计学显著的程度。优选地,该衍生物,如果存在于组合物中,与没有所述四氢嘧啶衍生物的对照组合物中发现的酶活性相比,应能够维持组合物中至少一种酶的酶活性的至少60%,至少70%,至少80%或至少90%。对于干燥条件下酶活性降低的阻止可以如本文其它部分所述的,例如在所附的实施例中所述的被测定。优选地,所述四氢嘧啶的衍生物选自羟基四氢嘧啶,homoectoine,羟基四氢嘧啶酯,羟基四氢嘧啶醚,四氢嘧啶的磺酰基衍生物,四氢嘧啶的酯化磺酰基衍生物和四氢嘧啶磺酰基衍生物酰胺。关于四氢嘧啶,羟基四氢嘧啶可以从多种细菌,特别是盐单胞菌科和硬壁菌门的属,通过本领域熟知的技术获得(参见W01994/15923)。其它前述的四氢嘧啶衍生物可以例如通过在体外对羟基四氢嘧啶进行化学衍生化获得。

[0027] 本文所提及的至少一种相容性溶质意味着在本发明的组合物中可以一起使用两种或更多种相容性溶质。优选地,在本发明的组合物中可以应用四氢嘧啶和其一或多种衍生物。在本文中,羟基四氢嘧啶是优选的衍生物。而且,还可以应用四氢嘧啶的衍生物的组合,例如羟基四氢嘧啶和homoectoine。

[0028] 本文使用的术语“氧化还原当量”是指从脱氢酶底物被转移给氧化还原辅因子的氢化物(H⁻)或者从氧化还原辅因子被转移给指示剂的电子。

[0029] 术语“在存在氧化还原当量的条件下能引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂”指在存在氧化还原当量的条件下能诱导指示剂中的至少一种光学性质的改变的分子。应当理解,根据本发明,该试剂还可以引起指示剂的一种以上的光学性质的变化,所述变化随后可以被检测。本文所称光学性质指可以被光学检测的指示剂的性质,例如光吸收或发射,再发射(remission),折射或偏振以及与其相关的性质。应当理解本文所使用的至少一种光学性质的这种变化包括检测到之前无法检测到的性质的存在,检测到之前已检测到的性质的缺失以及对性质的定量变化的检测,即对与至少光学性质变化的程度相关的信号强度变化的检测。本发明设想的优选的光学性质是颜色,荧光,化学发光或折射法。根据本发明设想的被试剂改变的光学性质取决于指示剂的类型。根据所期望的要检测的光学性质和组合物中使用的试剂,普通技术人员无需费事就能够选择合适的指示剂,特别是在本文其它部分所提及的那些中进行选择。

[0030] 以上所称试剂,优选地,能够直接地或间接地(即通过另外的媒介物),将氧化还原当量从氧化还原辅因子转移给指示剂。氧化还原当量的所述转移的结果是,指示剂被改变,以至于发生至少一种光学性质的变化。例如,在氧化状态下无色的或无荧光的指示剂在还原态下通过试剂介导的氧化还原当量的转移可以被转化为有色的或有荧光的指示剂。氧化还原当量的转移可以是直接的,即氧化还原当量可以由试剂转移给指示剂,或者可以是间接的。在后者的情况下,氧化还原当量从试剂转移给中间的媒介物,该媒介物随后将氧化还原当量转移给指示剂。应当理解,优选地,可以使用一个以上的媒介物。例如,试剂可以将氧化还原当量转移给第一媒介物,第一媒介物随后将氧化还原当量转移给第二媒介物,所述第二媒介物然后将氧化还原当量转移给指示剂。应当理解,在这种媒介物级联中,可以使用两个以上的媒介物。使用一个或多个媒介物将氧化还原当量转移给指示剂的优点在于可以提高光学检测的时间控制。

[0031] 可以在本发明背景下应用的媒介物是本领域熟知的,并包括例如铁氰化钾、醌衍生物、尼罗蓝(Nile blue)(CAS no.: 3625-57-8)、麦尔多拉蓝(Meldola's blue)(CAS

no.: 7057-57-0)、钼配合物,如EP 1 457 572 B1(通过引用将其合并入本文)中所公开的,或者过渡金属配合物例如氯化六氨合钨。

[0032] 根据本发明优选设想的试剂是吩嗪。更优选地,所述吩嗪是吩嗪硫酸乙酯(phenazinethosulfate),吩嗪硫酸甲酯,1-(3-羧丙氧基)-5-吩嗪鎗三氟甲磺酸乙酯或1-甲氧基吩嗪硫酸甲酯。可以应用这些吩嗪用于引起指示剂的至少一种光学性质变化。关于检测和如何应用这些吩嗪的细节可以在EP 0 654 079 A1中找到,通过引用将其合并入本文。

[0033] 另外,本文所设想的试剂优选是醌。更优选地,所述醌是菲醌、二氮菲醌或苯并[h]-喹啉醌(chinolinquinone)。

[0034] 本文所设想的另一种试剂是亚硝基苯胺。更优选地,所述亚硝基苯胺是[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二甲醇-盐酸盐。

[0035] 此外,本发明优选设想的是能在存在氧化还原当量的条件下引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂,所述试剂是能够催化氧化还原当量从氧化还原辅因子转移给指示剂的酶。更优选地,根据本发明,本文中设想的酶是黄递酶(EC号1.6.99.2),优选地,硫辛酰胺脱氢酶或NADH脱氢酶或其酶活性突变体。优选的黄递酶来自于猪心脏,克氏梭菌(*Clostridium kluyverii*)或嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)。所述酶的结构是本领域熟知的,并在例如DE 2 061 984中描述。酶活性突变体可以如本文其它部分所述的被提供。根据本发明所设想的特别优选的黄递酶是如US2007/196899所公开的具有提高的热稳定性和催化性质的那些酶,通过引用将其相应的公开内容并入本文。

[0036] 优选地,相容性溶质减少干燥条件下组合物中至少一种酶的酶活性的降低。更优选地,所述至少一种酶是脱氢酶。更优选地,所述至少一种酶可以是,然而也可以是兼有,脱氢酶以及应用在本发明的组合物中作为能在存在氧化还原当量的条件下引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂的酶,优选如上述的黄递酶。更优选地,与没有所述相容性溶质的对照组合物相比,在上面提及的在室温或更高温度下制造和/或储存期间本发明组合物中酶活性的降低被至少一种相容性溶质阻止或者至少显著减少,使得一种或两种酶的酶活性的至少60%,至少70%,至少80%或至少90%得以维持。

[0037] 本文所使用的术语“指示剂”指由于氧化还原当量的转移而被修饰,以至于至少一个光学性质发生变化的分子或分子实体。

[0038] 应用于本发明组合物中的优选的指示剂包括杂多酸,优选2,18-磷钨酸,醌类,优选刃天青,二氯酚靛酚,和/或四唑盐,优选商业可获得的WST-3, WST-4和WST-5盐(Dojindo, Inc. US)。这些指示剂在氧化还原当量转移后被还原,并且这种还原伴随着至少一种光学性质,且特别是颜色的变化。

[0039] 根据本发明设想的进一步优选的指示剂是氧化还原当量转移后其荧光发生变化的试剂,例如荧光素。合适的荧光素包括,尤其是黄素核苷酸和烟碱-腺嘌呤-二核苷酸,在本文中提及也称为氧化还原辅因子。如果在本发明的组合物中应用氧化还原辅因子例如carba-NAD或NAD作为指示剂,本发明的组合物的组分(b), (c)和(d)均可以由同样的分子表示,即carba-NAD或NAD。相应地,本发明组合物中的组分(b), (c)和(d)可以由同样的化学实体表示。而且,优选可以使用如EP 0 620 283 B1或EP 0 831 327 B1中所公开的修饰的亚硝基苯胺作为组分(c)和组分(d),通过引用将这两篇文献各自公开的内容合并入本

文。因此,本发明组合物中的组分(c)和组分(d)可以由同样的化学实体表示。

[0040] 本文所称从组合物中除去溶剂的步骤,且特别是热处理,已知会影响酶活性,特别是敏感酶如脱氢酶的酶活性。而且,在干燥条件下,酶例如脱氢酶变得对氧化过程以及所伴随的酶变性更敏感(Andersson 2000, Biotechnol. Appl. Biochem 32: 145-153)。相应地,用于酶检测试验的复杂的干燥组合物的制造及其储存通常伴随着由于变性、聚集或其它过程导致的酶失活的增加。在含溶剂环境中重构酶之后,常常观察到降低的酶活性。有利地,在本发明进行的研究中发现,在本发明的复杂干燥组合物的制造和/或储存过程中发生的所述酶活性的降低可以通过加入本文其它部分详细描述至少一种相容性溶质而被显著阻止。该发现是令人惊讶的,这是因为四氢嘧啶及其衍生物已被报道不足以阻止例如乳酸脱氢酶的聚集,这种聚集也会导致酶活性的降低(Andersson 2000, loc cit.)。而且,还令人惊讶的是即使是在本发明的相当复杂的不含溶剂的组合物中的氧化还原敏感条件下也发生保护效果。有趣并令人惊讶的是,对于所研究的脱氢酶而言,四氢嘧啶的保护作用在溶液中未被观察到。特别地,在本发明的基础研究中已发现,在具有本发明组合物除至少一种相容性溶质外的组分的干燥组合物中存在的酶活性在干燥状态下以及在干燥条件和高于4℃的温度下储存期间降低。特别地,已发现在45℃储存3周后例如葡萄糖脱氢酶只存在大约50%的酶活性,在所述条件下例如黄递酶只维持大约55%的酶活性。但是,在本发明的基础研究中,当组合物中存在至少一种相容性溶质,即四氢嘧啶或其衍生物时,可以维持显著更高的酶活。本发明组合物的另一个优点是组合物中应用的相容性溶质不干扰光学检测系统。特别是,它不干扰产生的光学信号,也不损害指示剂,氧化还原辅因子或能引起至少一种光学变化的试剂的稳定性或功能。而且,酶转化和转化率优选不被相容性溶质损害。

[0041] 在本发明组合物的优选实施方案中,相容性溶质以至少3 (w/w)%,至少4 (w/w)%,至少5 (w/w)%,至少6 (w/w)%,至少7 (w/w)%或至少8 (w/w)%的量存在。

[0042] 在本发明组合物的优选实施方案中,所述组合物进一步包含至少一种稳定剂、去垢剂、膨胀剂、成膜剂和/或固体颗粒。本发明组合物中使用的合适的稳定剂、去垢剂、膨胀剂、成膜剂、氧化剂和/或固体颗粒是普通技术人员已知的。

[0043] 优选地,所述至少一种稳定剂是聚乙烯吡咯烷酮,并且更具体是PVP K25。

[0044] 优选地,所述至少一种去垢剂选自N-甲基-N-油酰基牛磺酸钠,N-辛酰基-N-甲基-葡萄糖胺,Mega 8 (N-甲基-N-辛酰基葡萄糖胺),二辛基磺基琥珀酸钠(DONS),Rhodapex® (优选C0-433或C0-436)。

[0045] 优选地,所述至少一种膨胀剂选自甲基乙烯基醚马来酸酐共聚物,黄原胶和甲基乙烯基醚马来酸共聚物。

[0046] 优选地,所述至少一种成膜剂选自聚丙烯酸乙酯分散体,聚乙烯酯,聚乙酸乙烯酯,聚丙烯酸酯,聚甲基丙烯酸,聚乙烯酰胺,聚酰胺,聚苯乙烯,而且混合的聚合产物也是合适的,例如丁二烯,苯乙烯或马来酸酯的混合的聚合产物。

[0047] 优选地,所述至少一种固体颗粒选自硅石颗粒,特别是二氧化硅,硅酸钠或硅酸铝,硅藻土,金属氧化物,特别是氧化钛和/或氧化铝,合成氧化物材料,特别是氧化物材料的纳米颗粒例如二氧化硅,氧化铝或氧化钛的纳米颗粒,高岭土,玻璃粉,无定型硅石,硫酸钙和硫酸钡。

[0048] 在本发明组合物的特别优选的实施方案中,所述组合物包含所附的实施例的表1

中列举的组分,并且更优选地,基本上由这些组分组成。

[0049] 本文上述对术语作出的所有定义和解释比照适用地应用于下述的实施方案。下面进一步作出的其它定义和解释也比照适用地应用于本说明书所述的所有实施方案。

[0050] 本发明涉及用于测定来自体液样品的被分析物的诊断性测试元件,其包含本发明的组合物和载体。

[0051] 本发明背景下使用的术语“载体”指本发明组合物可以应用于其上的固体支持物。优选地,组合物可以被固定在载体上。而且,还设想组合物可以被空间排列于载体上。载体必须以这样的方式排列,以允许能够检测指示剂的至少一种光学性质的变化,即它优选不包含会干扰所述至少一种光学性质的检测的组分或空间排列。合适的载体可以包括含有本发明组合物的小瓶,例如以孔板形式排列的小瓶。其它检测可以使用光波导或半导体板。但是,优选的载体,是那些用于试纸条的载体。所述试纸条通常包含形成固体载体的一个或多个层。

[0052] 本文使用的术语“体液样品”指已知含有或者怀疑含有要测定的被分析物的所有体液。优选的已知包含多种诊断相关被分析物的体液是血液(包括全血、血浆和血清)、尿液、唾液、乳汁液(liquor)、滑膜液和汗液。更优选地,根据本发明的体液样品是全血样品。

[0053] 本文使用的术语“被分析物”指体液样品中存在的生物分子,其存在,不存在或量将会根据本发明被测定。由于本文所述的测定是基于脱氢酶的酶活性,应当理解,所述被分析物是组合物包含的脱氢酶的底物。根据本发明所设想的要被测定的,例如通过前述的诊断性测试元件被测定的优选的被分析物是葡萄糖,麦芽糖,甘露糖,半乳糖,谷氨酸盐,葡萄糖-6-磷酸,乙醇或乳糖,并且更优选地,是葡萄糖。

[0054] 优选地,本发明的诊断性测试元件包含含有所述组合物的测试区域,其中测试区域具有体液样品被应用于其上的点样端,以及当被分析物与组合物反应时允许检测光学性质变化的检测端。样品将会被应用于点样端上,并且优选设想的是,血液样品中存在的细胞例如红细胞,不会到达检测端。

[0055] 这种测试元件及其制造的细节可以在EP 0 821 234 B1中找到,通过引用将其合并入本文。根据本发明设想的进一步的测试元件是EP 1 035 919 B1或EP 1 035 920 B1中公开的那些,通过引用将它们分别公开的内容合并入本文。

[0056] 特别地,本发明的诊断性测试元件的测试区域包括,优选地,透明薄片,第一和第二膜层被应用于其上,以这个顺序放置在彼此的上面。重要的是位于透明薄片上的第一层对光的散射大大少于覆盖于其上的第二层。透明薄片没有被覆盖的一端被称为检测端,且与置于第一层上部的第二层的一端相对的第二层的另一端被称为点样端。

[0057] 根据本发明的诊断性测试元件的膜层是由聚合物成膜剂的分散体或乳液产生的。分散体成膜剂含有微小的聚合物颗粒,其在载液(通常是水)中是不溶并在载液中高度分散。如果在成膜过程中通过蒸发除去液体,那么颗粒互相靠近并相互紧密接触,在这个过程中发生的巨大作用力和成膜所伴随的表面能量的增长导致颗粒发展为基本上封闭的膜层。或者还可以使用成膜剂的乳液,其中它溶解于溶剂中。溶解的聚合物在与溶剂不相混的载液中被乳化。聚乙烯酯、乙酸乙烯酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯酰胺、聚酰胺和聚苯乙烯特别适合作为这种成膜剂的聚合物。除了均聚物,混合的聚合产物也是合适的,例如丁二烯,苯乙烯或马来酸酯的混合的聚合产物。

[0058] 根据本发明的诊断性测试载体的测试区域中,两个所谓的膜层位于透明薄片之上。为此,考虑那些不能渗透液体的塑料薄片。聚碳酸酯薄片被证明是特别合适的。

[0059] 可以用含有相同聚合物成膜剂的涂层化合物生产两个膜层,或者它们可以用含有不同聚合物成膜剂的涂层化合物生产。

[0060] 尽管第一层含有膨胀剂以及任选地弱光散射填料,但是第二层需要膨胀剂以及无论如何至少一种强散射光的色素。此外,第二层还可以含有无孔填料以及多孔填料。

[0061] 通过添加膨胀良好的膨胀剂(即当其吸收水分的时候体积增加的物质),不仅能够获得可以被样品液体相对快速渗透的层,而且还具有良好的细胞(例如红细胞以及另外还有血色素)的分离性质,尽管膨胀剂具有开放效果。膨胀性质应当是良好的,以使得对于其中至少一种光学性质的变化主要依赖于样品液体对层的渗透的测试来说,光学性质的变化在最多一分钟之后是可测量的。特别合适的膨胀剂已证明是甲基乙烯基醚马来酸酐共聚物,黄原胶和甲基乙烯基醚马来酸共聚物。

[0062] 第二层中的强光散射色素的量相对于测试区域的干燥即用双层为按重量计至少25%。由于弱光散射填料和强光散射色素对于膜层的光学性质是必需的,第一和第二膜层具有不同的填料和色素。

[0063] 第一膜层应当不含填料或者含有那些折射率与水折射率相近的填料。二氧化硅,硅酸盐和硅酸铝已被证明特别适合于此。商品名为Transpafill.RTM®的硅酸铝钠是特别优选的。其具有按重量计66%的SiO₂,按重量计26%的Al₂O₃,按重量计7%的Na₂O以及按重量级1%的SO₃的平均组成。特别优选的原始颗粒的平均粒径是大约0.06 μm。

[0064] 根据本发明,第二层应非常强地散射光。理想地,第二膜层中色素的折射率应当是至少2.5。因此优选使用二氧化钛。平均直径为大约0.2-0.8μm的颗粒已证明是特别有利的。以锐钛矿改性形式存在的易于加工的二氧化钛类型是非常特别优选的。

[0065] 本发明的组合物可以被包含在一个膜层中,优选第一膜层。但是,本发明的组合物也可以在两个膜层中都存在。

[0066] 为了优化根据本发明的诊断性测试载体中的测试区域,已证明特别有利的是两个膜层都含有不使红细胞溶解的湿润剂。为此,中性的,即不带电荷的湿润剂是特别优选的。N-辛酰基-N-甲基葡萄糖胺是最特别优选的。

[0067] 为了产生根据本发明的诊断性测试元件的测试区域,每个膜层分别由所述组分的均匀分散体依次产生。为此,使用透明薄片作为基底形成第一膜层的涂层化合物。第一膜层的涂层化合物已应用特定的层厚度之后,干燥该层。然后,具有薄的层厚度的第二层的涂层化合物被应用到该层上并被干燥。干燥之后第一和第二膜层的厚度应总共不超过0.20 mm,优选不超过0.12 mm,特别优选不超过0.08 mm。

[0068] 以这种方式产生的测试区域可以被装载在支持层上以更好操作,考虑用于这种层的那些材料不吸收要被检测的液体。这是所谓的非吸收性材料,例如由聚苯乙烯,聚氯乙烯,聚酯,聚碳酸酯或聚酰胺制成的塑料薄片是特别优选的。金属薄片或玻璃适合作为进一步的支持材料。

[0069] 在根据本发明的测试元件的优选实施方案中,被用于观察和测量指示剂的至少一种光学性质的测试区域的检测端通过支持层应当是可见的,以测定身体样品中要被检测的被分析物。这可以通过透明的支持层实现。但是,支持层也可以具有穿孔,该穿孔被测试区

域的检测端覆盖。然后检测端透过该穿孔是可见的。优选地,在根据本发明的诊断性测试元件中,在测试区域的检测端下方的支持层中有孔,透过该孔可以观察测试区域的检测端。该孔的直径比测试区域的最小线性尺寸略小,以使得孔外的测试区域放置的支持层上并可以附着在该处。

[0070] 本发明进一步涉及制造诊断性测试元件的方法,其包括在固体载体上产生根据本发明的组合物的步骤。

[0071] 在本发明的所述方法的优选实施方案中,所述产生包括以下步骤:

[0072] (i) 将包含本发明组合物的组分(a)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域;以及

[0073] (ii) 从组合物中除去所述溶剂;

[0074] 或者

[0075] (i) 将包含本发明组合物的组分(a), (b), (d)和(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域的第一层中;

[0076] (ii) 从第一层的组合物除去所述溶剂;

[0077] (iii) 将包含本发明组合物的组分(c)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于第一层上的第二层中;以及

[0078] (iv) 从第二层的组合物除去所述溶剂;

[0079] 或者

[0080] (i) 将包含本发明组合物的组分(a), (b), (d)和(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域的第一层中;

[0081] (ii) 从第一层的组合物除去所述溶剂;

[0082] (iii) 将包含本发明组合物的组分(b)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于第一层上的第二层中;以及

[0083] (iv) 从第二层的组合物除去所述溶剂;

[0084] 或者

[0085] (i) 将包含本发明组合物的组分(a), (d)和(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域的第一层中;

[0086] (ii) 从第一层的组合物除去所述溶剂;

[0087] (iii) 将包含本发明组合物的组分(b)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于第一层上的第二层中;以及

[0088] (iv) 从第二层的组合物除去所述溶剂;

[0089] 或者

[0090] (i) 将包含本发明组合物的组分(c)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域的第一层中;

[0091] (ii) 从第一层的组合物除去所述溶剂;

[0092] (iii) 将包含本发明组合物的组分(a), (b), (d)和(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于第一层上的第二层中;以及

[0093] (iv) 从第二层的组合物除去所述溶剂。

[0094] 或者

[0095] (i) 将包含本发明组合物的组分(b)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域的第一层中;

[0096] (ii) 从第一层的组合物除去所述溶剂;

[0097] (iii) 将包含本发明组合物的组分(a), (b), (d)和(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于第一层上的第二层中;以及

[0098] (iv) 从第二层的组合物除去所述溶剂。

[0099] 或者

[0100] (i) 将包含本发明组合物的组分(b)-(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于载体上的测试区域的第一层中;

[0101] (ii) 从第一层的组合物除去所述溶剂;

[0102] (iii) 将包含本发明组合物的组分(a), (d)和(e)的组合物和溶剂(即包含处于溶解状态而不是干燥状态的组分的组合物)应用于第一层上的第二层中;以及

[0103] (iv) 从第二层的组合物除去所述溶剂。

[0104] 优选地,组合物应用于在测试区域中的检测层。检测层具体可以通过至少一种湿化学合成方法产生,更具体是由一种或多种分散体,具体是本发明组合物的水分散体产生。这种由一种或多种分散体成层的过程对于所属领域的普通技术人员来说基本上是已知的,示例性地可以依次参考例如上述现有技术,更具体是EP 0 821 234 B1。

[0105] 在所述组合物被应用到测试元件的测试区域之后,可以通过所有已知用于除去溶剂的技术,包括热处理,蒸发或冻干从所述组合物除去溶剂。优选地,步骤(b)中的所述溶剂通过热处理被基本上除去。

[0106] 而且,优选地,所述相容性溶质减少组合物中至少一种酶的酶活性的降低,并且特别是在例如通过热处理实现步骤(b)中的溶剂的基本去除期间,以及在测试元件上在干燥条件下组合物的维持期间。

[0107] 原则上本发明还考虑至少一种相容性溶质,即四氢嘧啶或其衍生物在阻止干燥条件下组合物中至少一种酶的酶活性的降低中的用途,其中所述组合物包含脱氢酶,氧化还原辅因子,在存在氧化还原当量的条件下能引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂,以及指示剂。

[0108] 优选地,干燥条件下组合物中的所述至少一种相容性溶质包含在诊断性测试元件中,优选包含在上述详细描述的诊断性测试元件中。

[0109] 本发明还涉及测定体液样品中被分析物的存在或量的方法,其包括以下步骤:

[0110] (a) 使本发明的诊断性测试元件与怀疑含有被分析物的体液在适合于使至少一种酶转化为重构状态的条件接触;

[0111] (b) 在诊断性测试元件上测量湿组合物中指示剂的至少一种光学性质的变化,其中所述湿组合物包含处于重构状态的至少一种酶,以此确定体液样品中被分析物的存在或量。

[0112] 如本文其它部分已经描述的,依赖于诊断性测试元件上的组合物中所使用的脱氢酶的底物特异性,可以用本发明的方法测定不同的被分析物。

[0113] 如本文所用的接触是指体液样品以这样的方式被应用到载体上,以允许载体所包含的本发明组合物与体液样品物理接触。特别地,接触一段时间并在足以允许脱氢酶重构

(即变湿并溶解并从而变得有生物活性)的条件下。合适的条件取决于诊断性载体,并且是本领域所已知的。应用于测试元件的体液样品,优选地,具有小于2微升,更特别地小于1微升的体积。

[0114] 在所述生物活性脱氢酶重构后,酶应结合其底物,即体液样品中包含的被分析物,并将其转化为相应的产物和氧化还原当量。脱氢酶产生的氧化还原当量允许确定脱氢酶活性,因为脱氢酶催化的酶转化产生的氧化还原当量在存在组合物中包含的氧化还原当量的条件下由能引起指示剂的至少一种光学性质变化的试剂转移给指示剂。然后可以测定指示剂的至少一种光学性质的变化。依赖于诊断性测试元件,对光学性质变化的测量可以通过本文其它部分更详细描述的不同技术进行。为了检测光学性质例如颜色的变化,可以使用空间分辨光学检测仪。应当理解,空间分辨光学检测仪是指具有许多光学传感器,能够记录不完全一致的检测层的检测端区域的光学检测仪。更特别地,空间分辨光学检测仪可以包含至少一个图像传感器,即光学检测仪阵列,其可以是一维的或者是二维的。更特别地,光学检测仪因此可以包含CCD芯片和/或CMOS芯片。此外,空间分辨光学检测仪可以包含用于使检测端和/或检测层在空间分辨光学检测仪的图像敏感表面上成像的至少一个光学元件。

[0115] 由上述方法测量的至少一种光学性质的变化将指示被分析物的存在。普通技术人员应当理解,为了测定被分析物的量,可能需要比较光学性质变化的程度。为了这个目的,进一步可能需要将所检测到的伴随着光学变化的信号与伴随着由已知量的被分析物引起的光学变化的信号,即校准信号进行比较。如何可以建立这种校准对本领域普通技术人员来说是熟知的。

[0116] 本文所使用的术语“量”指被应用到诊断性测试元件的样品中存在的被分析物的绝对或相对量。根据本发明优选的相对量是浓度,即相对于体积的量。

[0117] 本说明书中所引用的所有参考文献特此通过引用就其全部公开内容以及上面提及的具体的公开内容并入。

[0118] 附图

[0119] 图1:显示与稳定剂(相容性溶质)的量相比的活性的平均值。已减去在没有稳定剂的测试元件中测定的活性。

[0120] 图2:四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶对于葡萄糖脱氢酶和黄递酶的稳定作用的图示。

[0121] 图3:储存温度与作为酶活性指示的测量的葡萄糖水平相比的图示。A)无稳定剂;B)四氢嘧啶,1g/100g组合物;C)羟基四氢嘧啶,1g/100g组合物。

[0122] 图4:涂层组合物中使用的不同缓冲液的影响。A) P04-缓冲液 pH 6,8,没有稳定剂;45天后;45°C-4°C;B) P04-缓冲液 pH 6.8,2g四氢嘧啶/100g RF;45天后;45°C-4°C;C) HEPES pH 7.1,没有稳定剂;45天后;45°C-4°C;D) HEPES pH 7.1,2g四氢嘧啶/100g RF;45天后;45°C-4°C。

[0123] 图5:在45°C 3周后四氢嘧啶对于Gluc-DOR和Gluc-DOR 31突变体的稳定效果已经可以观察到。

实施例

[0124] 实施例1:试纸条的产生

[0125] 产生用于测定葡萄糖水平的四种不同的反应膜,并基本按照EP 0 821 234实施例1所述涂覆于薄片上。组合物的配方如下述表1所示。

[0126] 表1:干燥前每100g第一涂层膜的组分

[0127]

来自枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶	1,09 g	1,09 g	1,09 g	1,09 g
来自枯草芽孢杆菌的黄递酶	0,77 g	0,77 g	0,77 g	0,77 g
NAD	0,58 g	0,58 g	0,58 g	0,58 g
Na/K磷酸盐缓冲液或HEPES	0,35g	0,35g	0,35g	0,35g
四氢嘧啶或羟基四氢嘧啶	0,00 g	1,00 g	2,00 g	4,00 g
黄原胶	0,29 g	0,29 g	0,29 g	0,29 g
硅石 FK 320DS	5,80 g	5,80 g	5,80 g	5,80 g
N-甲基-N-油酰基牛磺酸钠	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g
N-辛酰基-N-甲基-葡糖胺	0,17 g	0,17 g	0,17 g	0,17 g
聚乙烯吡咯烷酮	0,86 g	0,86 g	0,86 g	0,86 g
四乙基氯化铵	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g
2,18-磷钼酸六钠盐	0,33 g	0,33 g	0,33 g	0,33 g
聚丙烯酸乙酯-分散体 (水中的50 Gew.-%)	5,00 g	5,00 g	5,00 g	5,00 g
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,01 g	0,01 g	0,01 g	0,01 g
2-甲基-2丁醇	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g
加水至100g				

[0128] 调节pH为6.8,组合物在聚碳酸酯薄片(125微米)上涂覆为膜(大约120微米)。涂覆组合物然后在50℃干燥。

[0129] 如下所述,将第二涂层应用到薄片上的第一涂层上:

[0130] 表2:第二涂层膜的组分

[0131]

Gantrez	1,47 g
N-甲基-N-油酰基牛磺酸钠	0,03 g
PVP K25	2,01 g
Mega 8	0,37 g
四乙基氯化铵	0,45 g
硅石 FK 320DS	2,00 g
Titandioxide E171	22,00 g
聚丙烯酸乙酯-分散体 (水中的50 Gew.-%)	6,25 g
双-(2-羟乙基)-(4-羟基环己-2,5-二烯亚基)-氯化铵	0,48 g
2,18-磷钼酸六钠盐	1,41 g
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,01 g
2-甲基-2丁醇	1,00 g

加水至100g

[0132] 调节pH为6.8,组合物被涂覆到薄片上的第一膜上作为第二膜(大约25微米)。涂覆的组合物然后在50℃干燥。如EP 0 821 234,([0063 - 0067])节所述产生用于葡萄糖测定试纸条。

[0133] 实施例2:测试元件中酶活性的测定

[0134] 测试元件在存在干燥剂的条件下在塑料小瓶在45℃保存6周。在随后的步骤中,测试元件的测试区域用洗脱缓冲液通过超声洗脱。在上清液中测定酶活性。

[0135] 表3:不同酶活性的洗脱液和检测技术

[0136]

	洗脱缓冲液	检测技术
葡萄糖脱氢酶	Tris/HCl, NaCl, NAD; pH 8,5	在340 nm 进行UV-检测
黄递酶	Tris/HCl, NaCl, Triton; pH 8,8	INT → Tetrazolium alsz;在492 nm检测

[0137] 结果显示于图1。该图表明浓度大于每100g涂层组合物0.3g的四氢嘧啶具有显著的稳定效果(大于10%)。图2表明羟基四氢嘧啶可以观察到同样的效果。而且,该图表明脱氢酶和黄递酶都被稳定化。

[0138] 实施例3:测试元件中酶活性的测定

[0139] 测试元件在存在干燥剂的条件下在塑料小瓶在4℃(KS), 24℃(RT), 35℃(DT), 和45℃(HT)保存63天。测试元件被用于测定多个静脉血样品中的血液葡萄糖水平。样品平行地用参考方法(Hitachi)测量。结果关于KS保存的测试元件进行标准化。

[0140] 在图3中,显示出储存温度以及所测量的葡萄糖水平作为对酶活性的指示。很明显,四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶起稳定剂的作用并保护酶活性。

[0141] 实施例4:用不同缓冲液的测试元件中酶活性的测定

[0142] 基本如实施例3所述储存和处理测试元件。不同的缓冲液,即磷酸盐缓冲液6,8,无稳定剂,磷酸盐缓冲液pH 6,8,2g四氢嘧啶/100g第一涂层膜,HEPES缓冲液pH 7,1,无稳定剂,和HEPES缓冲液pH 7,1,2g四氢嘧啶/100g第一涂层膜,用于图4所示的涂布组合物中。从图中明显看出,观察到的四氢嘧啶的稳定活性不依赖于缓冲液系统。

[0143] 实施例5:溶液中葡萄糖脱氢酶突变体2的酶活性的测定以及对四氢嘧啶或羟基四氢嘧啶的依赖

[0144] 如W02011/020856中公开的包含葡萄糖脱氢酶突变体2的等份溶液与不同量的四氢嘧啶或羟基四氢嘧啶组合,如表4所示。

[0145] 表4:稳定溶液

[0146]

编号	内容物	稳定剂和浓度
1	葡萄糖脱氢酶突变体2 3000 U/ml,NAD 10 mg/ml;磷酸钾钠15 mM, pH 6.8.	0(参考)
2	同上	四氢嘧啶 4% (w/v)
3	同上	四氢嘧啶 2% (w/v)
4	同上	四氢嘧啶 1% (w/v)
5	同上	羟基四氢嘧啶 4% (w/v)
6	同上	羟基四氢嘧啶 2% (w/v)
7	同上	羟基四氢嘧啶 1% (w/v)

[0147] 等分样品在不同的储存条件(8天,4℃;8天35℃,4天4℃然后4天45℃)下储存,并在储存后测定酶活性。结果显示在表5中。在溶液中无四氢嘧啶或羟基四氢嘧啶的稳定作用

可以测定。

[0148] 表5:结果

[0149]

编号	注		单位	8天4℃	8天35℃	4天4℃,4天45℃
1	参考		kU/g	213	126	50
2	四氢嘧啶 大约4%		kU/g	207	137	57
3	四氢嘧啶 大约2%		kU/g	222	149	59
4	四氢嘧啶 大约1%		kU/g	222	144	60
5	羟基四氢嘧啶 大约4%		kU/g	207	131	56
6	羟基四氢嘧啶 大约2%		kU/g	221	141	60
7	羟基四氢嘧啶 大约1%		kU/g	208	122	52

[0150] 实施例6:评价具有Gluc-DOR (=PQQ-依赖性葡萄糖脱氢酶)的测试元件

[0151] 如上述实施例1所述产生具有Gluc-DOR和其突变体(Gluc-DOR 31)的测试元件。如上述实施例2所述分析测试元件。如EP 0 620 283 B1所述使用亚硝基苯胺进行酶活性的测定。如从图5中明显看出,在45℃ 3周后已经可以观察到稳定效果。

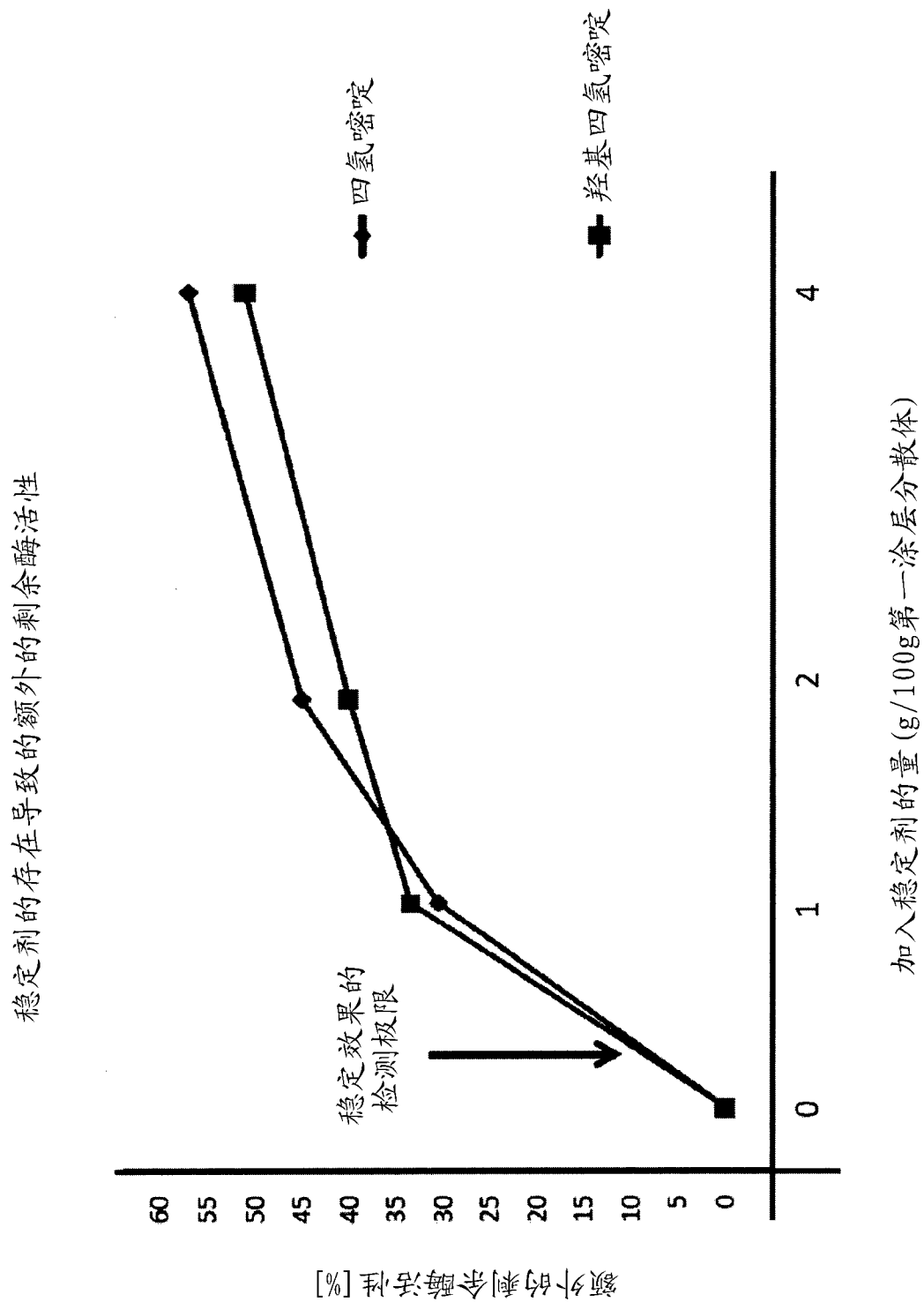


图 1

试纸条的稳定测试 - 储存63天
- 稳定效果 -

A (无稳定剂的第一涂层分散体)

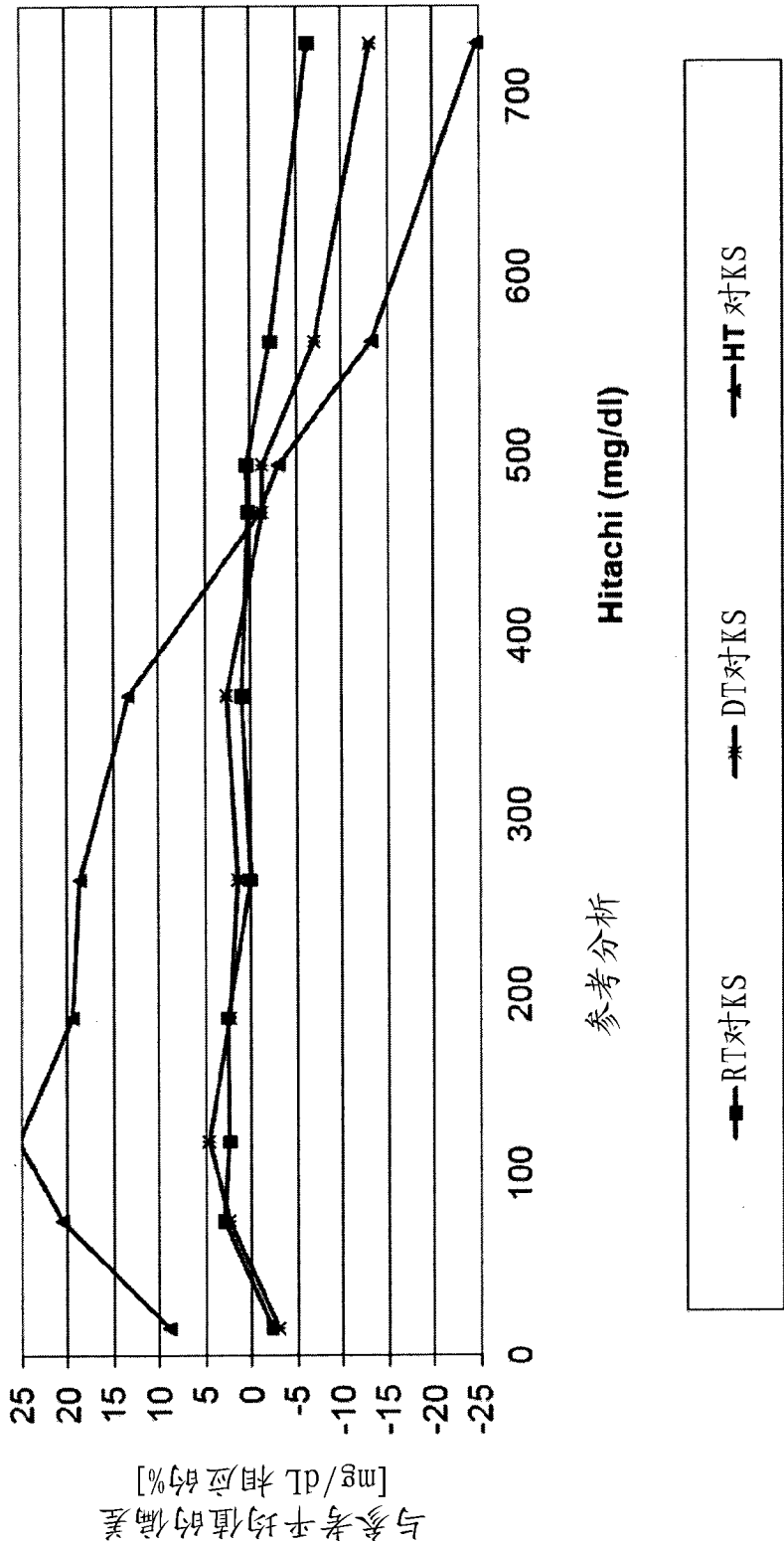


图 3

B (1g羟基四氢嘧啶/100g第一涂层分散体)

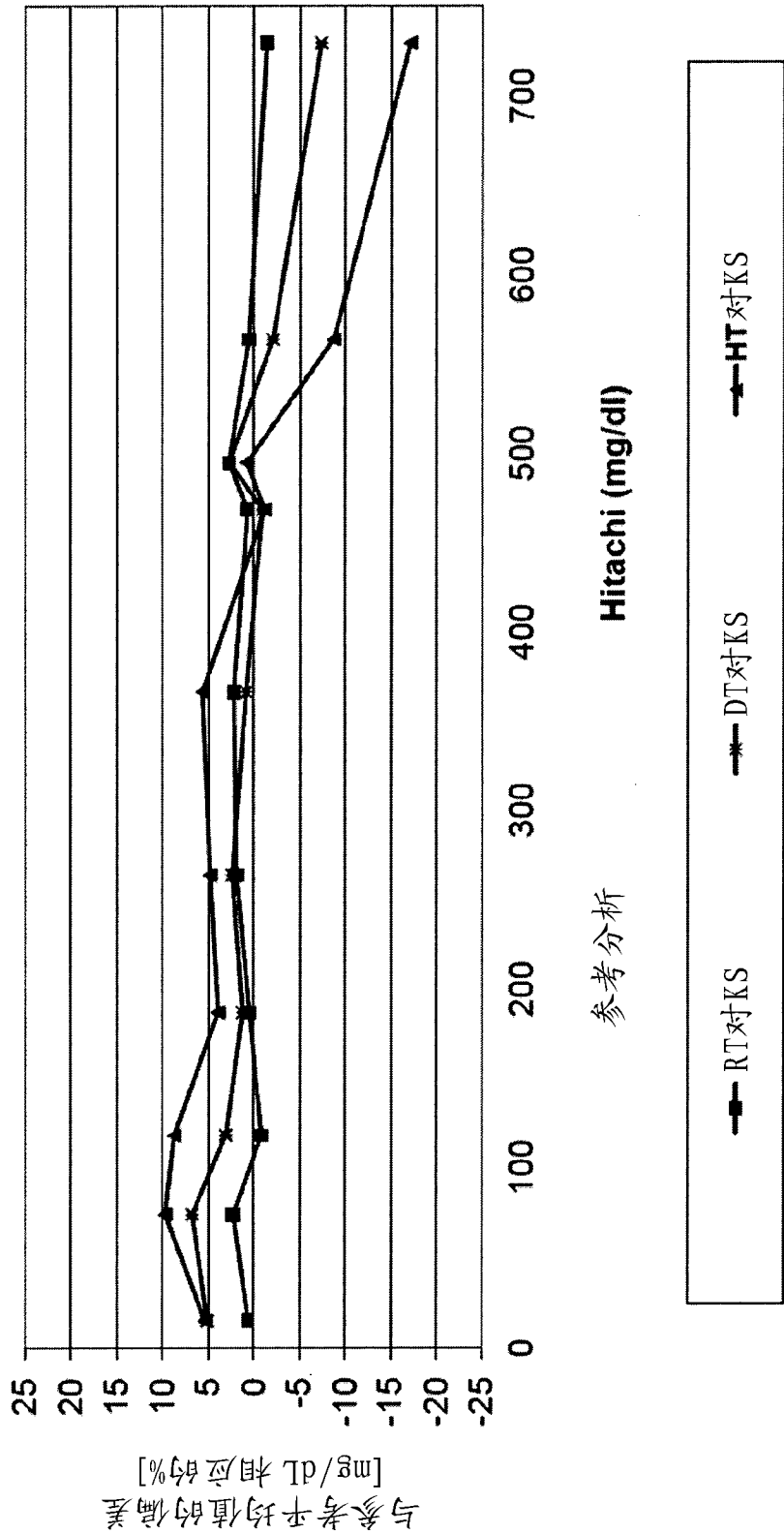


图 3续

C (1g四氢嘧啶/100g第一涂层分散体)

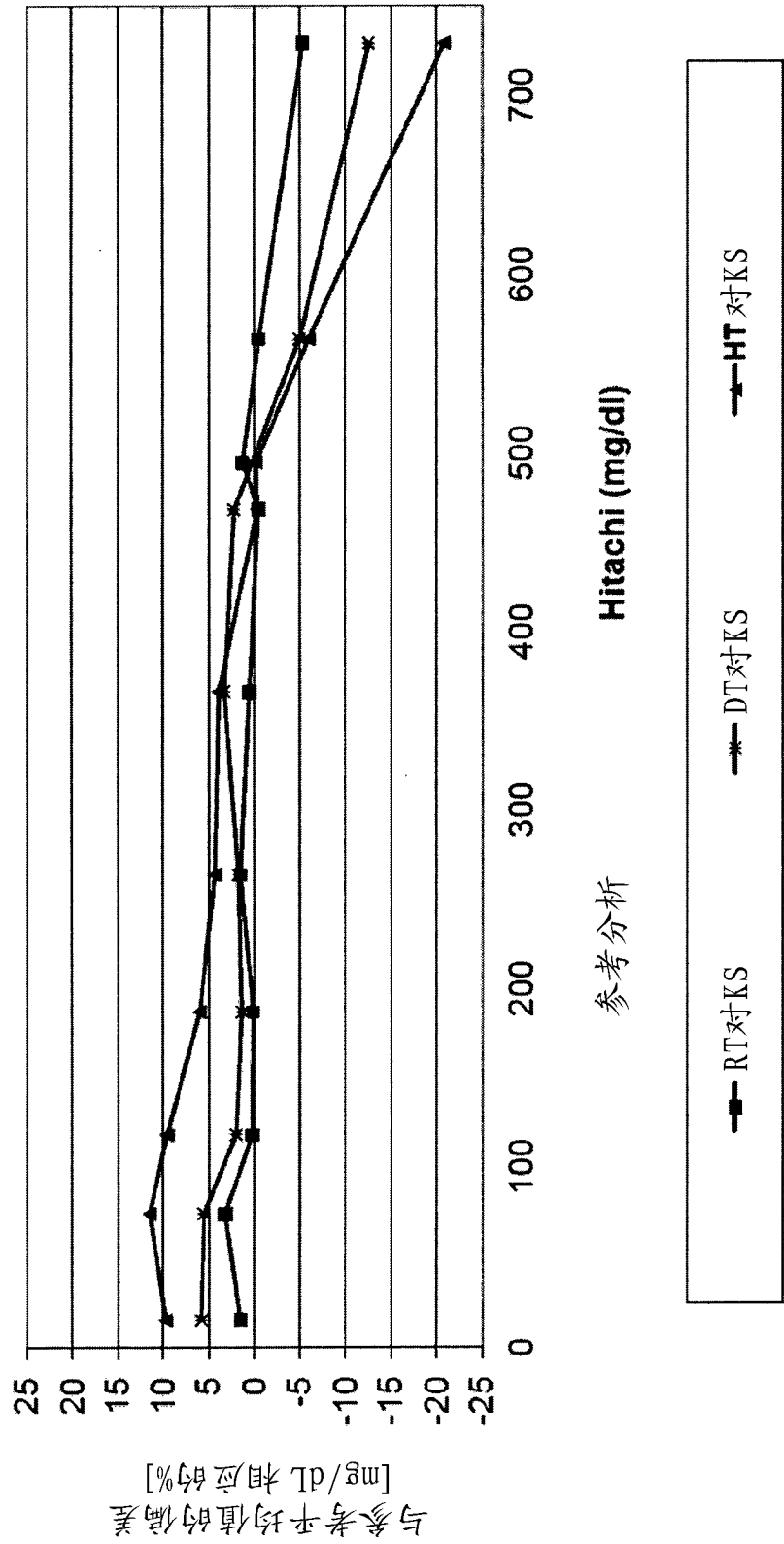


图 3续

试纸条的稳定测试-储存9周
-用不同缓冲液pH 6.8, 无稳定剂

A) 磷酸盐缓冲液 pH 6.8, 无稳定剂

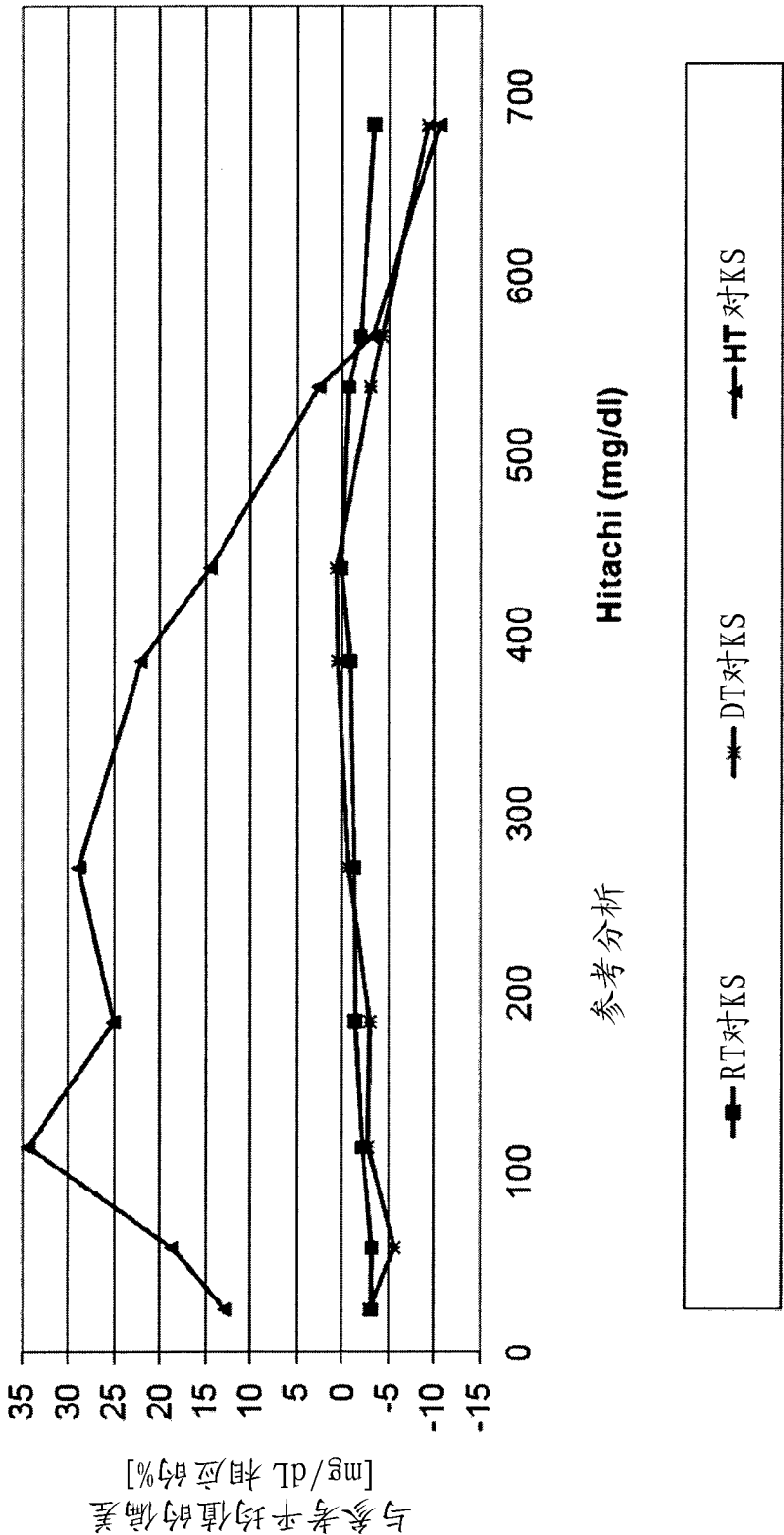


图 4

B) 磷酸盐缓冲液pH 6.8, +2g四氢嘧啶/100g第一涂层分散体

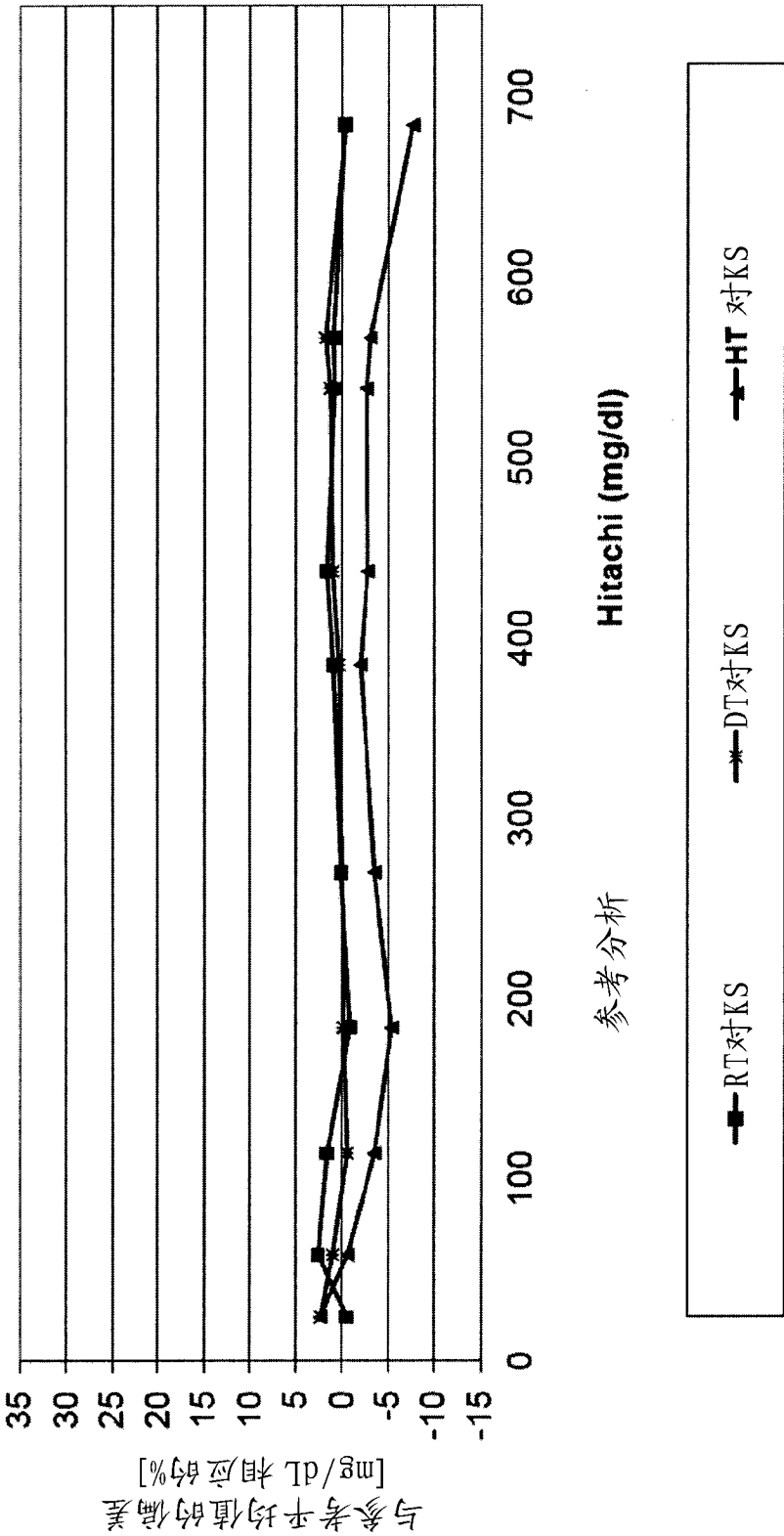


图 4续

C) HEPES pH 7.1, 无稳定剂

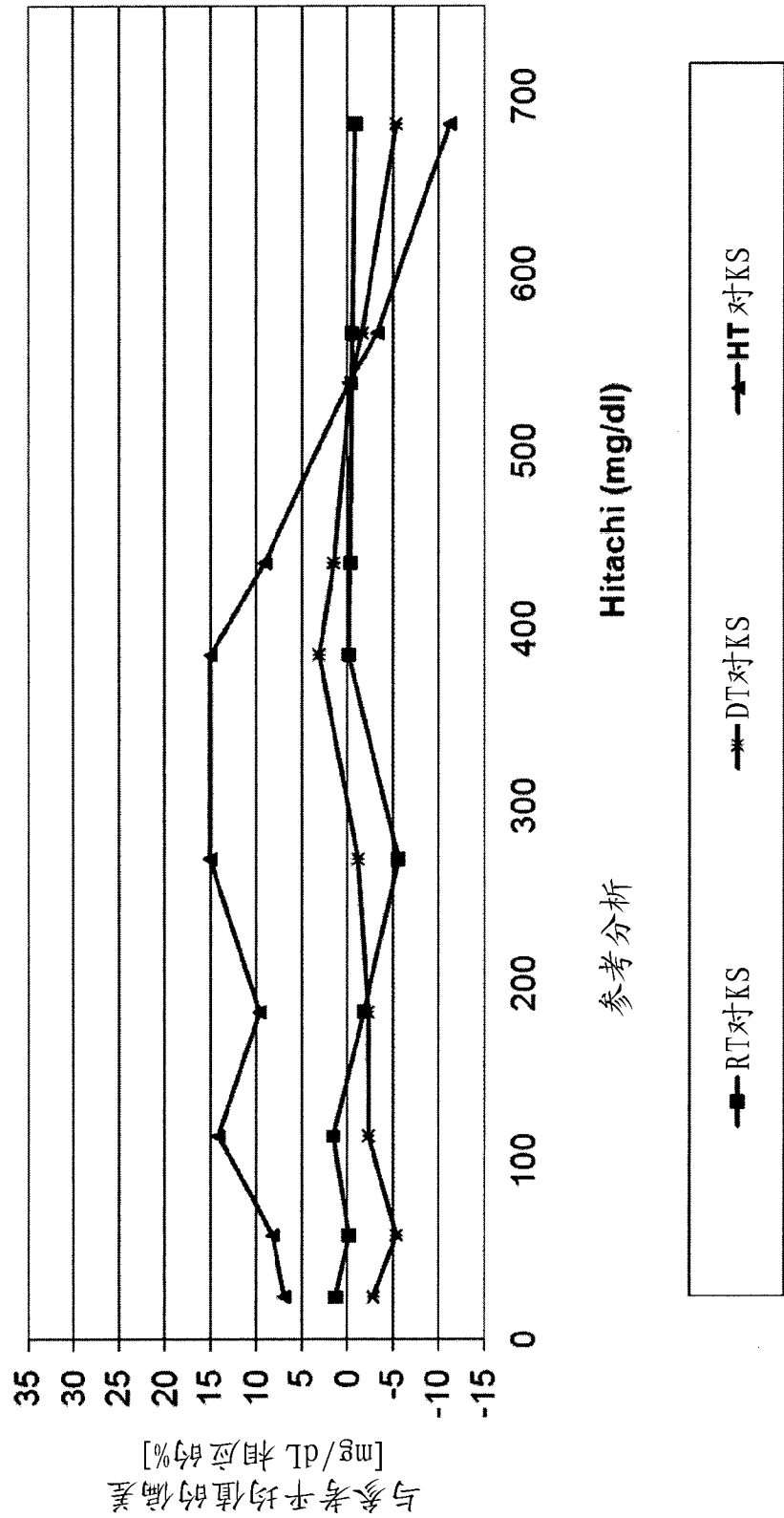


图 4续

D) HEPES pH 7.1, +2g四氢嘧啶/100g第一涂层分散体

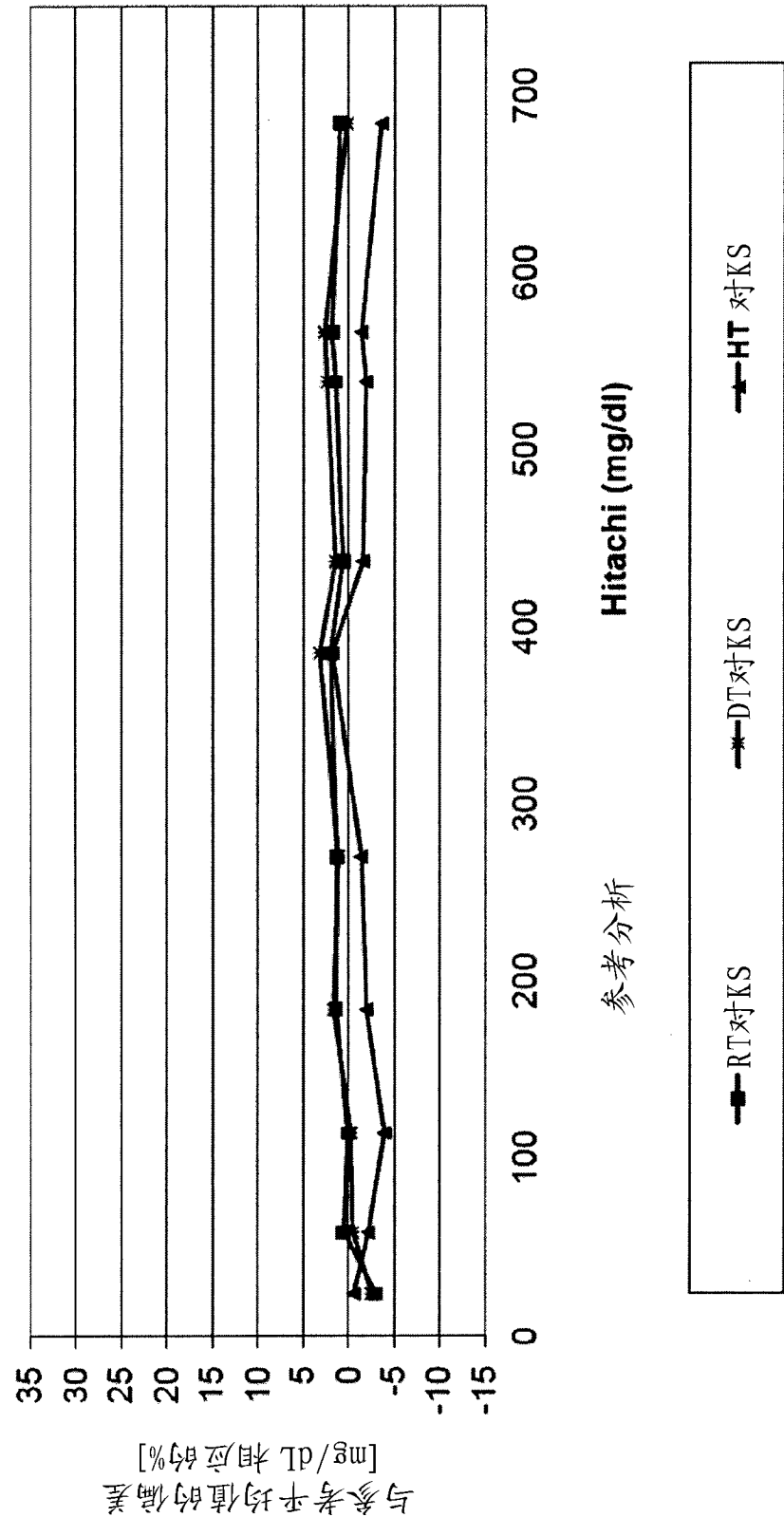


图 4续

Gluc-DOR:
与在4℃储存3周的试纸条相比，在45℃储存3周的试纸条中的剩余酶活性

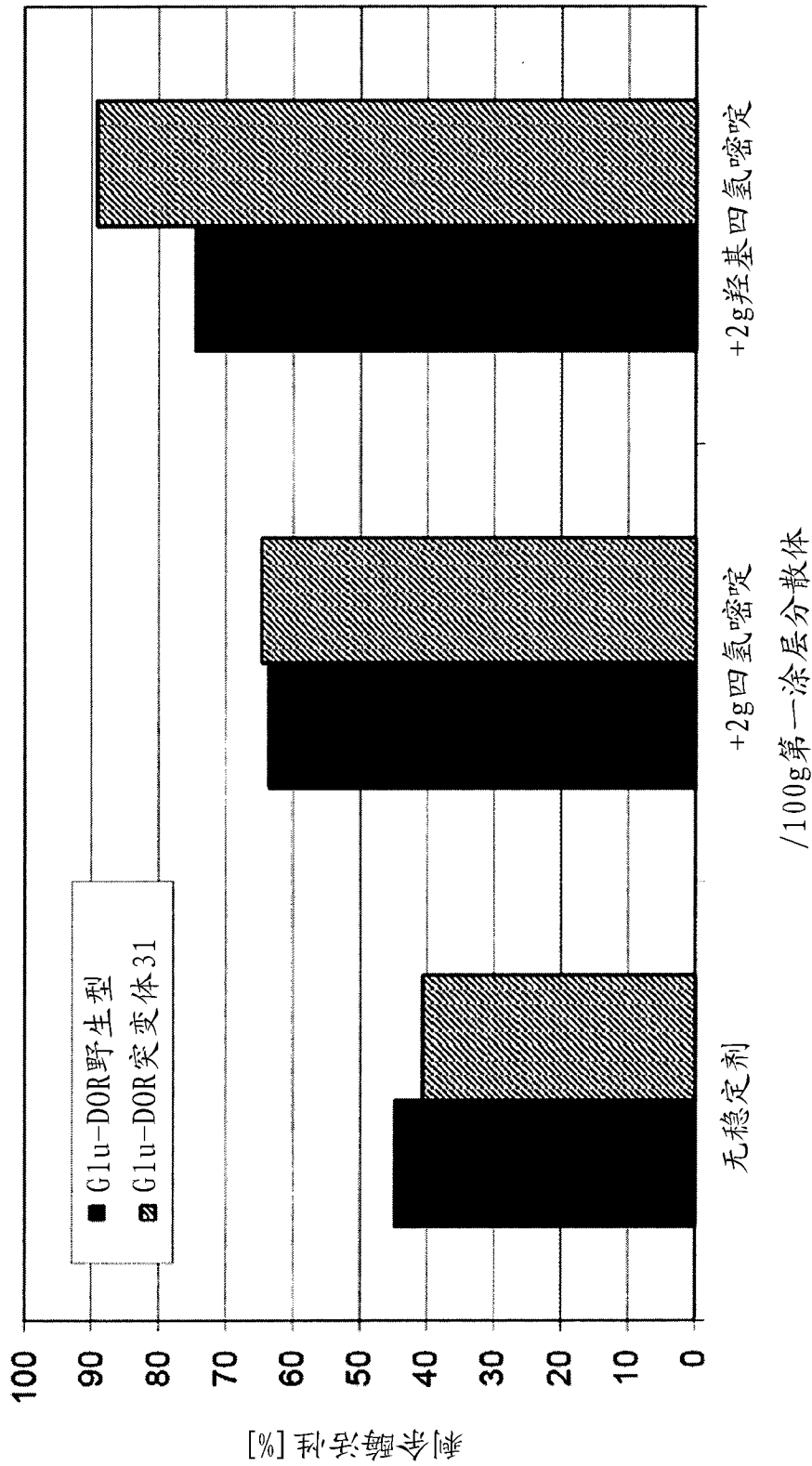


图 5