



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010128611/15, 10.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.12.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
10.12.2007 US 61/007,126

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2012 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 10.06.2014 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 1293574 A2, 2003.03.19. US 005846702 A, 1998.12.08. WO 03044511 A2, 2003.05.30. US 20050183953 A1, 2005.08.25. RU 2258922 C2, 2005.08.20

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 12.07.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2008/086214 (10.12.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/076433 (18.06.2009)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.поп. А.В.Миц, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

ЧУ Эми Х. (US),
МАРФЕРТ Карен Л. (US),
ТЮДОР Бренда (US),
ВАРЧАЛ-ВИНДХАМ Мэри Эллен (US),
ЧЖУ Бору (US)

(73) Патентообладатель(и):

БАЙЕР ХЕЛТКЭА ЭлЭлСи (US)

RU 2 518 310 C2

RU 2 518 310 C2

(54) РЕАГЕНТЫ И СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и представляет собой реагент для детектирования глюкозы, содержащий фермент FAD-глюкозодегидрогеназу, фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор, по меньшей мере один сурфактант, полимер и буфер. Реагент используется с электрохимическим тест-сенсором,

содержащим множество электродов, при этом тест-сенсор обладает высокой скоростью заполнения и точностью. Реагент является стабильным и характеризуется более низким фоновым током тест-сенсоров. 6 н. и 13 з.п. ф-лы, 2 табл., 13 ил., 9 прим.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010128611/15, 10.12.2008

(24) Effective date for property rights:
10.12.2008

Priority:

(30) Convention priority:
10.12.2007 US 61/007,126

(43) Application published: 20.01.2012 Bull. № 2

(45) Date of publication: 10.06.2014 Bull. № 16

(85) Commencement of national phase: 12.07.2010

(86) PCT application:
US 2008/086214 (10.12.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/076433 (18.06.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, stroenie 3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mits, reg.N 364

(72) Inventor(s):

ChU Ehmi Kh. (US),
MARFERT Karen L. (US),
TJuDOR Brenda (US),
VARChAL-VINDKhAM Mehri Ehllen (US),
ChZhU Boru (US)

(73) Proprietor(s):

BAJER KhELTKEhA EhI EhI Si (US)

R U 2 5 1 8 3 1 0 C 2

(54) REAGENTS AND METHODS FOR DETECTING ANALYTES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and represents a reagent for detecting glucose containing an enzyme FAD-glucose dehydrogenase, a phenothiazine or phenoxazine mediator, at least one surfactant, a polymer and a buffer. The reagent is used with an

electrochemical test sensor comprising a number of electrodes with the test sensor possessing high filling rate and accuracy.

EFFECT: reagent is stable and characterised by lower background current of the test sensors.

19 cl, 2 tbl, 13 dwg, 9 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится в общем случае к реагентам, способам и устройствам для измерения аналитов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к реагентам, способам и устройствам для измерения глюкозы в образцах 5 крови.

Уровень техники

Количественное определение аналитов в жидкости организма очень важно для диагностики и поддержания определенных физических состояний. Например, у некоторых людей необходимо постоянно контролировать уровень лактата, холестерина 10 и билирубина. В частности, для людей, страдающих диабетом, важно часто проверять уровень глюкозы в жидкости организма с целью регулирования потребления глюкозы в своей диете. Результаты таких тестов могут использоваться для определения, если это требуется, инсулина или других обязательных для приема препаратов. В одном из 15 типов систем тестирования глюкозы в крови для тестирования образца крови используются тест-сенсоры.

Тест-сенсор содержит биочувствительный или реактивный материал, который реагирует, например, с глюкозой крови. Предназначенный для проведения теста конец сенсора выполнен с возможностью размещения в нем тестируемой жидкости (например, крови, выделяемой на пальце человека после его прокола). Жидкость может быть 20 втянута в проходящий до сенсора капиллярный канал из тест-конца до реактивного материала под действием капиллярных сил так, чтобы в сенсор попало достаточное количество тестируемой жидкости. Тесты обычно выполняют с помощью оптических или электрохимических способов тестирования.

Электрохимические тест-сенсоры основаны на катализируемых ферментами 25 химических реакциях, в которых принимает участие интересующий аналит. В случае контроля глюкозы релевантной химической реакцией является окисление глюкозы в глюконолактон или соответствующую кислоту. Это окисление катализируется множеством ферментов, некоторые из которых могут использовать коферменты, такие как никотинамид аденин динуклеотид(фосфат) (НАД(Ф)), в то время как другие могут 30 использовать коферменты, такие как flavин аденин динуклеотид (FAD) или пирролохинолинхинон (PQQ).

В случае использования тест-сенсора окислительно-восстановительные эквиваленты, образуемые в процессе окисления глюкозы, перемещаются к поверхности электрода, генерируя таким образом электрический сигнал. Затем происходит корреляция величины 35 электрического сигнала с концентрацией глюкозы. Перемещение окислительно-восстановительных эквивалентов из участка химической реакции на ферменте к поверхности электрода происходит благодаря участию медиаторов переноса электронов.

Медиаторы переноса электронов, которые ранее использовали с FAD-глюкозодегидрогеназой (FAD-GDH), включают феррицианид калия, феназин-40 метосульфат (PMS), метокси феназин-метосульфат, феназин метилсульфат и дихлориндофенол (DCIP). Однако, оказалось, что эти соединения очень восприимчивы к условиям окружающей среды, включая температуру и влажность, что приводят к низкой стабильности реагентов тест-сенсора. Например, при хранении в результате взаимодействия окисленного медиатора с ферментативной системой может образоваться 45 восстановленный медиатор. Чем больше медиатора или фермента, тем больше образуемого восстановленного медиатора. Из-за высокой концентрации восстановленного медиатора к концу срока годности сенсорной пластины, как правило, увеличивается фоновый ток, который возрастает со временем. Увеличенный фоновый

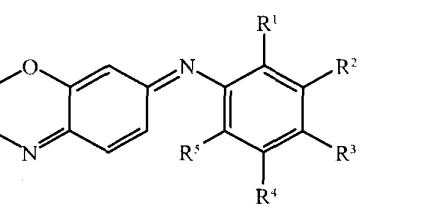
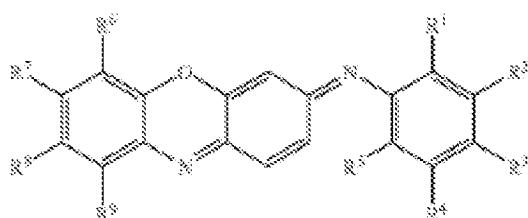
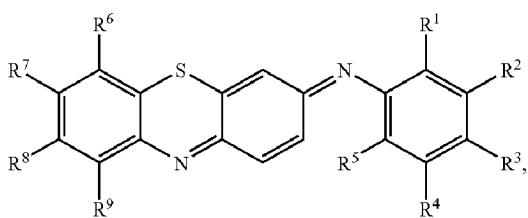
ток может уменьшать достоверность и точность измерений тест-сенсора и, таким образом, может приводить к ограниченному сроку годности тест-сенсоров.

Другим недостатком, связанным с имеющимися сегодня тест-сенсорами, является относительно медленная скорость заполнения. Достижение быстрой скорости заполнения сенсора желательно для более быстрой и однородной повторной гидратации реагента. Таким образом, более быстрая скорость заполнения, как правило, приводит к более точным, стабильным тест-сенсорам, подверженным меньшим изменениям.

Следовательно, существует потребность в реагенте, в котором отсутствует один или несколько указанных недостатков.

10 Сущность изобретения

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения реагент для детектирования аналита содержит флавопротеиновый фермент, медиатор, выбранный из группы:



30 или их комбинации. $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ и R^9 являются одинаковыми или разными и независимо выбираются из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбокси, карбоксиалкила, алcoxикарбонила, арилоксикарбонила, ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, алcoxи, арилокси, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинации. Реагент дополнительно содержит по меньшей мере один сурфактант, полимер и буфер. По меньшей мере один из сурфактанта или буфера, включает неорганическую соль, причем отношение общего количества неорганической соли к медиатору составляет менее, чем примерно 3:1.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения реагент для детектирования аналита в жидким образце содержит FAD-глукозодегидрогеназу с активностью от примерно 0,1 ед./мкл до примерно 10 ед./мкл. Реагент дополнительно содержит медиатор 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин с концентрацией от примерно 5 мМ до примерно 120 мМ. Реагент дополнительно содержит сурфактант с концентрацией от примерно 0,05% вес. до примерно 0,5% вес. реагента. Реагент дополнительно содержит полимер гидроксиэтилцеллулозу с концентрацией от примерно

0,1% вес. до примерно 4% вес. реагента и буфер. По меньшей мере один из сурфактанта или буфера, содержит неорганическую соль, причем отношение общего количества неорганической соли к медиатору составляет менее, чем примерно 3:1.

Согласно другому варианту настоящего изобретения электрохимический тест-сенсор

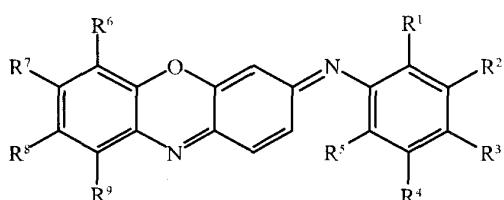
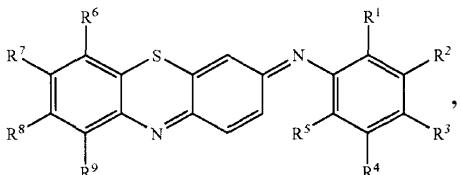
- 5 содержит рабочий электрод, имеющий поверхность. Тест-сенсор дополнительно содержит противоэлектрод, имеющий поверхность. Тест-сенсор дополнительно содержит реагент, покрывающий по меньшей мере часть поверхности рабочего электрода и по меньшей мере часть поверхности противоэлектрода. Реагент включает флавопротеиновый, фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор, буфер и по меньшей мере один сурфактант и полимер. По меньшей мере один из сурфактанта или буфера содержит неорганическую соль, причем отношение общего количества неорганической соли к медиатору составляет менее, чем примерно 3:1.

Согласно одному из способов по настоящему изобретению способ обнаружения аналита в жидким образце, где анализ вступает в химическую реакцию, включает стадию

- 15 предоставления поверхности электрода. Способ дополнительно включает стадию, облегчающую течение жидкого образца на поверхности электрода с помощью сурфактанта. Способ дополнительно включает стадию катализа химической реакции флавопротеиновым ферментом. Способ дополнительно включает стадию образования окислительно-восстановительного эквивалента в результате химической реакции.
- 20 Способ дополнительно включает стадию передачи окислительно-восстановительного эквивалента на поверхность электрода посредством фенотиазинового или феноксазинового медиатора. Максимальная кинетическая характеристика составляет менее чем примерно 3 секунды.

Согласно другому способу детектирование аналита в жидким образце включает

- 25 предоставление поверхности электрода. Предоставляется реагент, который содержит флавопротеиновый фермент, и медиатор, выбранный из группы:



или их комбинации, где $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ и R^9 являются одинаковыми или

- 40 различными и независимо выбираются из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбокси, карбоксиалкила, аллоксикарбонила, арилоксикарбонила, ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, алкокси, арилокси, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинации; по меньшей мере один сурфактант, и буфер; реагент, находящийся в контакте с поверхностью 45 электрода. Жидкий образец контактирует с реагентом. Определяют концентрацию аналита. Максимальная кинетическая характеристика составляет менее чем примерно 3 секунды.

Вышеприведенное краткое описание настоящего изобретения не предназначено для

представления каждого варианта осуществления или каждого аспекта по настоящему изобретению. Дополнительные признаки и преимущества настоящего изобретения с очевидностью следуют из подробного описания и чертежей, приведенных ниже.

Краткое описание рисунков

5 На Фиг.1а показан тест-сенсор согласно одному из вариантов осуществления.

На Фиг.1б показан вид сбоку тест-сенсора по Фиг.1а.

Фиг.2 представляет собой линейный график зависимости измеренного значения тока от концентрации глюкозы.

На Фиг.3 приведена гистограмма сравнения времени заполнения тест-сенсора,

10 содержащего сурфактант гептаноил-N-метилглюкамид (MEGA 8), с сенсором, не содержащим сурфактант MEGA 8.

На Фиг.4 приведена гистограмма сравнения фонового тока сенсоров, содержащих сурфактант MEGA 8, с сенсорами, не содержащими сурфактант MEGA 8.

15 На Фиг.5 приведена гистограмма времени заполнения тест-сенсоров в зависимости от различных составов, содержащих и не содержащих сурфактанты.

Фиг.6 представляет собой график зависимости измеренного значения тока от времени в составе, содержащем сурфактант.

20 На Фиг.7 приведена гистограмма пикового времени для 50 мг/дл глюкозы, медиаторов с различными концентрациями сульфата и различных концентраций фосфатного буфера.

На Фиг.8 приведена гистограмма пикового времени для 100 мг/дл глюкозы, медиаторов с различными концентрациями сульфата и различных концентраций фосфатного буфера.

25 На Фиг.9 приведена гистограмма пикового времени для 400 мг/дл глюкозы, медиаторов с различными концентрациями сульфата и различных концентраций фосфатного буфера.

Фиг.10а и 10б представляют собой графики зависимости измеренного значения тока от времени в составах, содержащих разные концентрации неорганических солей.

30 На Фиг.11 представлена таблица выраженного в % CV для растворов реагентов с низким содержанием соли и составов реагентов с высоким содержанием соли.

Хотя могут быть сделаны различные модификации изобретения и использованы его альтернативные формы, конкретные варианты осуществления показаны в виде примера на чертежах и подробно описаны в настоящем документе. Однако следует иметь в виду, что изобретение не ограничено конкретными раскрытыми формами. Напротив, 35 изобретение должно охватывать все модификации, эквиваленты и альтернативные варианты, соответствующие сути и покрываемые объемом настоящего изобретения.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

Настоящее изобретение относится к реагентам, способам и устройствам для измерения 40 аналитов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к реагенту тест-сенсора для детектирования аналита, содержащему (1) флавопротеиновый фермент, (2) фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор, (3) буфер, (4) сурфактант или комбинацию сурфактантов и/или (5) полимер на основе целлюлозы.

Описанные в настоящем документе реагенты могут использоваться для определения концентрации аналита в жидким образце. Природа контролируемого аналита по 45 настоящему изобретению не ограничена при условии, что анализ подвержен химической реакции, катализируемой флавопротеиновым ферментом. Некоторые примеры типов аналита, которые могут быть собраны и проанализированы, включают глюкозу, липидные профили (например, холестерин, триглицериды, LDL и HDL), микроальбумин,

5 гемоглобин, А_{1С}, фруктозу, лактат или билирубин. Предполагается, что могут быть определены концентрации других аналитов. Анализы могут находиться, например, в образце цельной крови, образце сыворотки крови, образце плазмы крови, других жидкостях организма, таких как ISF (интерстициальной жидкости), моче и жидкостях, не относящихся к организму.

10 Описанные в настоящей работе тест-сенсоры представляют собой электрохимические тест-сенсоры. Используемые с электрохимическими тест-сенсорами устройства измерения могут иметь оптические аспекты для детектирования калибровочной информации и электрохимические аспекты для определения информации, относящейся 15 к аналиту (например, концентрации аналита) в жидком образце. Один из неограничивающих примеров электрохимического тест-сенсора приведен на Фиг.1а. На Фиг.1а изображен тест-сенсор 10, содержащий основу 11, капиллярный канал и множество электродов 16 и 18. Участок 12 показывает область, которая определяет 20 капиллярный канал (например, после размещения крышки на основе 11). Множество электродов включает противоэлектрод 16 и рабочий электрод 18. Электрохимический тест-сенсор может также включать по меньшей мере три электрода, такие как рабочий электрод, противоэлектрод, триггерный электрод, или другой электрод для 25 детектирования интерферирующих веществ (например, гематокрита, аскорбата, мочевой кислоты) в жидком образце. Рабочий электрод, используемый в тест-сенсорах согласно 30 вариантам осуществления настоящего изобретения, может быть заменен подходящими электродами, включая без ограничения, углерод, платину, палладий, золото, рутений, родий и их комбинации.

Электроды 16, 18 соединены с множеством проводников 15а,б, которые, в иллюстративном варианте осуществления, заканчиваются большими областями, 25 обозначенными как контакты 14а и 14б тест-сенсора. Капиллярный канал обычно расположен в принимающей жидкость области 19. Примеры электрохимических тест-сенсоров, включая их работу, можно найти, например, в патенте США №6531040, правообладателем которого является компания Bayer Corporation. Предполагается, что с вариантами по настоящему изобретению могут использоваться другие 30 электрохимические тест-сенсоры.

35 Принимающая жидкость область 19 содержит по меньшей мере один реагент для превращения интересующего аналита (например, глюкозы) в жидком образце (например, крови) в химическое соединение, которое измеряется электрохимическим способом, в терминах генерируемого им электрического тока, с помощью компонентов электродного элемента. Реагент обычно содержит специфический по отношению к аналиту фермент, 40 который реагирует с аналитом и с акцептором электронов, образуя электрохимически измеряемое соединение, которое может детектироваться электродами. Реагент содержит медиаторы или другие вещества, которые участвуют в передаче электронов между аналитом и проводником, связующим агентом, который удерживает вместе фермент и медиатор, другими инертными ингредиентами или их комбинации.

Жидкий образец (например, кровь) может наноситься на принимающую жидкость 45 область 19. Жидкий образец реагирует по меньшей мере с одним реагентом. После реакции с реагентом и столкновения с множеством электродов жидкий образец генерирует электрические сигналы, которые участвуют в определении концентрации аналита. Проводники 15а,б передают электрический сигнал в направлении второго противоположного конца 42 тест-сенсора 10, откуда электрические сигналы по контактам 14а,б тест-сенсора передаются в устройство измерения.

На Фиг.1б показан вид сбоку тест-сенсора 10 по Фиг.1а. Как показано на Фиг.1б,

тест-сенсор 10 также содержит крышку 20 и промежуточный элемент 22. Основа 11, крышка 20 и промежуточный элемент 22 могут быть изготовлены из множества материалов, таких как полимерные материалы. Неограничивающие примеры полимерных материалов, которые могут использоваться при изготовлении основы 11, 5 крышки 20 и промежуточного элемента 22, включают поликарбонат, полиэтилентерефталат (PET), полиэтиленнафталат (PEN), полиимид и их комбинации. Предполагается, что при изготовлении основы 11, крышки 20 и/или промежуточного элемента 22 могут использоваться и другие материалы.

Для формирования тест-сенсора 10 по Фиг.1а и 1б основу 11, промежуточный элемент

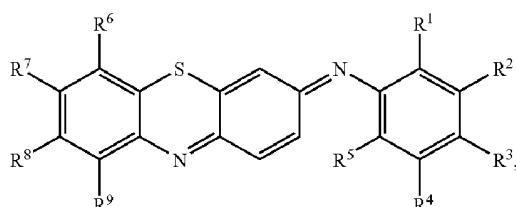
10 крышки 20 соединяют, например, с помощью адгезива или термосклейванием. При соединении основы 11, крышки 20 и промежуточного элемента 22 формируется принимающая жидкость область 19. Принимающая жидкость область 19 обеспечивает проток для введения жидкого образца в тест-сенсор 10. Принимающая жидкость область 19 формируется на первом конце, или конце 40 тестирования, тест-сенсора 10. Тест- 15 сенсоры вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть сформированы с помощью основы и крышки без промежуточного элемента, при этом принимающая жидкость область формируется непосредственно на основе и/или крышке.

Флавопротеины по настоящему изобретению включают любые ферменты, имеющие флавоновые кофакторы. Некоторые неограничивающие примеры флавопротеинов

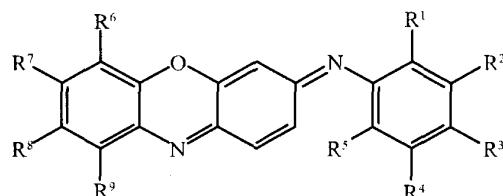
20 включают FAD-глюкозооксидазу (классификационный номер фермента 1.1.3.4), флавингексоза-оксидазу (ЕС №1.1.3.5) и FAD-глюкозодегидрогеназу (ЕС №1.1.99.10).

Дополнительные ферменты, оксидазы, для использования по настоящему изобретению включают, без ограничения, лактатоксидазу, холестериноксидазу, алкогольоксидазу (например, метанолоксидазу), оксидазу d-аминокислоты, холиноксидазу и их FAD- 25 производные. Предпочтительный флавопротеин для использования по настоящему изобретению представляет собой FAD-глюкозодегидрогеназу (FAD-GDH).

Медиаторы по настоящему изобретению включают фенотиазины, имеющие формулу:



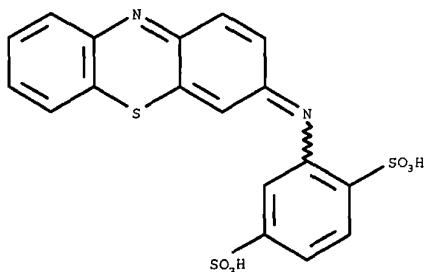
35 и феноксазины, имеющие формулу:



где R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ являются одинаковыми или разными и независимо выбираются из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбокси, 45 карбоксиалкила, аллоксикарбонила, арилоксикарбонила, ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, аллокси, арилокси, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинации. Предполагается, что из них также могут быть сформированы изомеры.

Одним из предпочтительных примеров фенотиазина, который был получен и, как обнаружилось, имел подходящие свойства в качестве НАДФ медиатора, является растворимая в воде соль натрия или аммония 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазина, имеющая формулу:

5



10

15

20

25

30

35

40

45

3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин ассоциируется с практически низким фоновым током, который дает улучшенное отношение сигнала к шуму. Другим желательным примером является медиатор 3-(3',5'-дикарбоксифенилимино)-3Н-фенотиазин, который был получен и, как обнаружилось, имел подходящие свойства в качестве НАДФ-медиатора. Обнаружилось, что фоновый ток этих фенотиазинов существенно ниже фонового тока ранее использованных медиаторов.

Другие фенотиазины и феноксазины, которые были получены и, как обнаружилось, имели подходящие свойства в качестве НАДФ-медиаторов, представляют собой: 3-(4'-хлорфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-диэтиламинофенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-этилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-трифторметилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-метоксикарбонилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-нитрофенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-метоксифенилимино)-3Н-фенотиазин; 7-ацетил-3-(4'-метоксикарбонилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 7-трифторметил-3-(4'-метоксикарбонилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'- ω -карбокси- η -бутилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-аминометилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-(2''-(5''-(пара-аминофенил)-1,3,4-оксадиазол)фенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'- β -аминоэтилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 6-(4'-этилфенил)амино-3-(4'-этилфенилимино)-3Н-фенотиазин; 6-(4'-[2-(2-этанолокси)этокси]этоксифенил)амино-3-(4'-[2-(2-этанолокси)этокси]этоксифенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-[2-(2-этанолокси)этокси]этоксифенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-фенилимино)-3Н-фенотиазинборная кислота, 3-(3',5'-дикарбоксифенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(4'-карбоксифенилимино)-3Н-фенотиазин; 3-(3',5'-дикарбоксифенилимино)-3Н-феноксазин; 3-(2',5'-фенилимино)-3Н-фенотиазиндисульфокислота; и 3-(3'-фенилимино)-3Н-фенотиазинсульфокислота.

В одном из примеров медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин получали растворением фенотиазина (1,53 моль, 1,1 эквивалент, 306 г) в 6,0 л тетрагидрофурана (THF), одновременно перемешивая, и затем охлаждали до 0°C. Анилин-2,5-дисульфокислоту (1,38 моль, 350 г) растворяли в 7,0 л воды и 1М гидроксиде натрия (NaOH) (128 мл), одновременно перемешивая. Раствор анилин-2,5-дисульфокислоты медленно добавляли, в течение примерно 2 часов, к раствору фенотиазина, получая белую мутную суспензию. Суспензию фенотиазин/анилин получали при температуре примерно 0-4°C. Персульфат натрия (5,52 моль, 4 эквивалента, 1314 г) растворяли в 4,0 л воды, получая раствор персульфата натрия.

Раствор персульфата натрия добавляли по каплям в течение более 3 часов к суспензии фенотиазин/анилин при температуре примерно 0-3°C и получали очень темный раствор. Очень темный раствор выдерживали на холоде, используя ледяную баню, и перемешивали в течение ночи. Затем содержимое переносили в ротационный испаритель

Buchi и удаляли тетрагидрофуран в течение примерно 2 часов при температуре ниже 35°C. После стадии испарения оставшийся раствор переносили в 25-л сепаратор и обезжиривали этилацетатом. Оставшийся раствор обезжиривали 3 раза, каждый раз используя 2 л этилацетата. Реакционные жидкости охлаждали при перемешивании до -3°C в бане с раствором ацетон/CO₂. Выпавшее в осадок твердое вещество фильтровали через два слоя ткани в двух 24-см воронках Бюхнера в тот же день. Выпавшее в осадок твердое вещество оставляли на ночь в воронках, чтобы дать ему высохнуть, а затем переносили в колбу, содержащую 2 л ацетонитрила, и перемешивали в течение примерно 1 часа при комнатной температуре. Для удаления остаточной воды образец фильтровали и промывали большим количеством ацетонитрила. Медиатор сушили до получения постоянного веса в вакуумном шкафу при 35°C.

Благодаря низкому фоновому току, достигаемому при использовании реагентов, содержащих медиаторы 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин, один и тот же состав реагента можно наносить и на рабочий электрод и на противоэлектрод 15 электрохимического тест-сенсора. Нанесение одного и того же реагента и на рабочий электрод и на противоэлектрод упрощает производственный процесс и таким образом уменьшать связанные с этим затраты. Дополнительно, низкий фоновый ток способствует получению точных зарегистрированных показателей глюкозы, особенно в образцах, имеющих низкие концентрации глюкозы, что особенно важно при анализе глюкозы в 20 крови новорожденных.

Реагенты согласно вариантам осуществлений настоящего изобретения также включают сурфактант или комбинацию сурфактантов и/или полимер на основе целлюлозы. Сурфактант или комбинация сурфактантов повышает скорость заполнения сенсора кровью и скорость повторной гидратации сухого реагента. Более быстрая 25 скорость заполнения кровью и скорость повторной гидратации реагента желательны для ускорения процесса тестирования (например, менее 5-секундного анализа) в пределах примерно 20-70% гематокрита.

Сурфактант желательно выбирать из биосовместимых веществ, включая сурфактанты на основе сахаридов или сурфактанты на основе фосфорилхолина. Одним из 30 неограничивающих примеров сурфактанта на основе сахаридов является гептансоил-N-метилглюкамид (MEGA 8, Sigma-Aldrich of St. Louis, MO). Сурфактанты, такие как MEGA 8, способствуют увеличению термостойкости тест-сенсоров. Дополнительно, сурфактанты, такие как MEGA 8, способствуют быстрой скорости заполнения даже для образцов крови с высоким уровнем гематокрита. Использование сурфактантов, 35 таких как MEGA 8, с другими инертными компонентами (например, полимером гидроксиэтилцеллюлозой и/или в буфере с нейтральным pH) в составе реагента дает сенсоры, имеющие высокую стабильность даже при повышенных температурах. Неограничивающие примеры сурфактантов на основе фосфорилхолина включают серию Lipidure (NOF Corporation, Япония).

Сурфактанты также могут быть выбраны из обычных нейтральных сурфактантов, таких как этоксилированный олеиловый спирт (Rhodasurf ON870 от Rhodia Inc. в Cranbury, Нью-Джерси). Сурфактанты также могут быть выбраны из анионных сурфактантов, таких как метилкокоилтаурат натрия (Geropon TC-42 от Rhodia Inc.) и фосфат алкилированного фенолэтоксилата (Phospholan CS131 от Akzo-Nobel Surface Chemistry LLC в Чикаго, Иллинойс). Предполагается, что в составе реагента могут использоваться и другие сурфактанты.

В качестве альтернативы или дополнительно, реагенты согласно вариантам осуществления настоящего изобретения включают полимер. Реагенты могут включать

полимер на основе целлюлозы, такой как полимер гидроксиэтилцеллюлоза. В некоторых вариантах осуществления полимер на основе целлюлозы представляет собой полимер на основе целлюлозы с низкой-средней молекулярной массой. Полимер, такой как полимер на основе целлюлозы, способствует получению реагтива с увеличенной

5 стабильностью и адекватной вязкостью с тем, чтобы высущенный реагент сохранял свое начальное положение на субстрате сенсора. Предполагается, что могут использоваться другие полимеры, такие как, например, поливинилпирролидин (PVP).

Реагент также может включать буфер (например, фосфатный буфер) и/или другие инертные компоненты. Неограничивающие примеры подходящих буферных растворов 10 включают, но не ограничиваются, буферы Гуда (например, HEPES (т.е. N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота), MOPS (т.е. 3-(N-морфолино)пропансульфокислота), TES (т.е. N-три(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфокислота)), буферы Мак-Илвейна (McIlvaine), их комбинации и т.п.

Для получения нужной точности анализа, термостойкости и максимальной 15 кинетической характеристики отношение неорганических солей к медиатору должно быть меньше, чем примерно 3:1. Источником неорганических солей может быть буфер и/или медиатор. Более предпочтительно, когда отношение неорганических солей к медиатору составляет менее, чем примерно 2:1, или даже менее, чем примерно 1,5:1.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения для 20 достижения улучшенной характеристики и стабильности сенсора реагент включает FAD-GDH, фенотиазиновый медиатор с низким фоном, сурфактант или комбинацию сурфактантов, полимер на основе целлюлозы и буфер. Реагент может использоваться для определения концентрации глюкозы в биологическом образце, таком как кровь, плазма, сыворотка или моча. В одном из вариантов осуществления фенотиазиновый 25 медиатор представляет собой 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин. В другом варианте осуществления сурфактант представляет собой MEGA 8, а полимер представляет собой гидроксиэтилцеллюлозу. В одном из вариантов осуществления реагент содержит FAD-GDH с активностью от примерно 0,1 ед./мкл до примерно 10 ед./мкл, от примерно 5 mM до примерно 120 mM медиатор 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин, от примерно 0,05% вес. до примерно 0,5% вес. сурфактант MEGA 8, от примерно 0,1% вес. до примерно 4% вес. гидроксиэтилцеллюлозу и от примерно 25 mM до примерно 200 mM буфер, имеющий pH от примерно 4 до примерно 8. В другом варианте осуществления реагент содержит FAD-GDH с активностью от примерно 0,5 ед./мкл до примерно 2,5 ед./мкл, от примерно 30 mM до примерно 60 mM медиатор 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин, от примерно 0,1% вес. до примерно 0,4% вес. сурфактант MEGA 8, от примерно 0,01 до примерно 0,1% вес. Гегорон TC-42, от примерно 0,2% вес. до примерно 0,5% вес. гидроксиэтилцеллюлозу и от примерно 50 mM до примерно 150 mM буфер, имеющий pH от примерно 6 до примерно 7.

Пример 1

40 Как показано на Фиг.2, анализировали химическую реактивность четырех партий сенсоров, получая кривую доза глюкозы - ответ для сенсоров, содержащих фермент FAD-GDH с активностью примерно 1,75 ед./мкл, примерно 40 mM медиатор 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин, примерно 0,2% вес. сурфактант MEGA 8, примерно 0,25% вес. гидроксиэтилцеллюлозу и примерно 100 mM фосфатный буфер с pH примерно 6,5. Проводили тестирование сенсоров с образцами цельной крови, имеющей примерно 40% уровень гематокрита. Концентрация глюкозы в образцах крови составляла примерно 0 мг/дл, 38 мг/дл, 67 мг/дл, 112 мг/дл, 222 мг/дл, 339 мг/дл и 622 мг/дл. Для каждой партии сенсоров отбирали по десять экземпляров каждого образца

крови. Как показано на Фиг.2, для каждой партии сенсоров строили график зависимости среднего тока для каждого образца от концентрации глюкозы (мг/дл) в образце, измеренной с помощью анализатора глюкозы Yellow Springs (YSI, Inc, Yellow Springs, Огайо). Наклон линий доза-ответ составлял примерно 20 нА/мг/дл, который указывает

5 на относительно высокую чувствительность тест-сенсоров. Точки-пересечения с осью Y находились относительно близко к 0 нА, что указывает на низкий уровень фонового шума. Эти результаты показывают, что при использовании тест-сенсоров, содержащих описанный в настоящем документе реагент, можно достичь точных показаний.

Для каждого из десяти экземпляров партий сенсоров, использованных для получения 10 графика по Фиг.2, определяли коэффициент изменчивости. В нижеприведенной таблице 1 показан средний коэффициент изменчивости в процентах (%CV) для четырех партий сенсоров.

Таблица 1

| | Концентрация глюкозы | | | | | |
|-----|----------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 38 мг/дл | 67 мг/дл | 112 мг/дл | 222 мг/дл | 339 мг/дл | 622 мг/дл |
| %CV | 3,1 | 2,1 | 3,4 | 2,5 | 2,1 | 1,2 |

15 Из-за низкого фонового шума сенсоров, содержащих реагент согласно варианту осуществления настоящего изобретения, среднее значение %CV было ниже 3,5% даже для образцов с низкой концентрацией глюкозы. Таким образом, значения %CV были 20 значительно ниже 5%, которое, как предполагается, является принятым стандартным пределом. Такой низкий %CV указывает на высокую точность тест-сенсоров. Кроме того, низкий %CV связан с низкой изменчивостью тест-сенсоров, что является необходимым для получения результатов последовательных тестов.

Пример 2

25 На Фиг.3 показан график, иллюстрирующий аффект сурфактанта MEGA 8 на скорость заполнения сенсора для 60% уровня гематокрита в цельной крови. Использованные тест-сенсоры на Фиг.3, содержали FAD-GDH с активностью примерно 1 ед./мкл (примерно 192 ед./мг), примерно 4% вес. (примерно 120 мМ) медиатор феррицианид калия, примерно 1,6% вес. реагент 4% вес. гидроксиэтилцеллюлозы и примерно 35 мМ 30 цитратный буфер с pH примерно 5,0. Медиатор феррицианид калия использовался с целью проверки, влияет ли нужным образом сурфактант MEGA 8 без медиатора 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин на тест-сенсоры. Скорость заполнения группы из тридцати тест-сенсоров, содержащих примерно 0,2% вес. сурфактант MEGA 8, сравнивали с контрольной группой из тридцати тест-сенсоров, не содержащих 35 сурфактант MEGA 8. Измеряли исходные скорости заполнения десяти сенсоров в каждой из двух групп. Десять сенсоров из каждой группы подвергали воздействию температуры примерно -20°C в течение примерно двух недель. Последние десять сенсоров из каждой группы подвергали воздействию температуры примерно 50°C в течение примерно двух 40 недель. Вычисляли показанное на Фиг.3 среднее время заполнения в каждой группе и подгруппе тест-сенсоров. Кровь с 60% уровнем гематокрита в образце цельной крови заполняла реакционную камеру тест-сенсора, содержащего реагент с сурфактантом, менее, чем за 0,3 секунды. Как показано на Фиг.3, скорость заполнения сенсоров, содержащих сурфактант MEGA 8, была по меньшей мере в два раза быстрее, а время 45 - примерно в четыре раза короче, чем у сенсоров, не содержащих сурфактант MEGA 8.

Пример 3

Фоновый ток находившихся под воздействием температуры сенсоров, содержащих сурфактант MEGA 8, сравнивали с фоновым током находившихся под воздействием

температуры сенсоров, не содержащих сурфактант MEGA 8. Использованные тест-сенсоры на Фиг.4 содержали FAD-GDH с активностью примерно 1 ед./мкл, примерно 50 мМ медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, примерно 0,75% вес. реагента гидроксиэтилцеллюлозы и примерно 50 мМ буфер с pH примерно 7. Первая 5 группа из сорока тест-сенсоров не содержала сурфактант MEGA 8. Вторая группа из сорока тест-сенсоров содержала примерно 0,2% вес. сурфактанта MEGA 8. Каждая из первой и второй групп включала две подгруппы: первая подгруппа, включающая двадцать тест-сенсоров, содержащих FAD-GDH от Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Япония), и вторая подгруппа, включающая двадцать тест-сенсоров, содержащих FAD-GDH от 10 Toyobo Co. (Осака, Япония). По десять тест-сенсоров из каждой из подгрупп хранили при температуре примерно 50°C в течение примерно двух недель. Оставшиеся тест-сенсоры хранили при температуре примерно -20°C в течение примерно двух недель. Затем определяли фоновый ток сенсоров, используя образцы цельной крови с 40% 15 уровнем гематокрита, имеющие концентрацию глюкозы, равную примерно 0 мг/дл. Отбирали по десять экземпляров на образец. На Фиг.4 показан график, иллюстрирующий средний фоновый ток сенсоров из десяти экземпляров. Как показано на Фиг.4, тест-сенсоры, содержащие сурфактант MEGA 8, имели значительно более низкое изменение фонового тока сенсора по сравнению с тест-сенсорами, не 20 содержащими сурфактант MEGA 8, что указывает на более высокую стабильность реагента при добавлении к нему сурфактанта MEGA 8.

Пример 4

Также тестировали термостойкость тест-сенсоров согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Тест-сенсоры, использованные в этом примере, включали FAD-GDH с активностью примерно 2 ед./мкл, примерно 40 мМ медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, примерно 0,2% вес. сурфактанта MEGA 8, примерно 0,25% вес. реагента гидроксиэтилцеллюлозы и примерно 100 мМ буфер с pH примерно 6,5. Первую группу тест-сенсоров хранили при температуре примерно 50°C в течение примерно двух недель. Вторую группу тест-сенсоров хранили при температуре примерно -20°C в течение примерно двух недель. Затем оценивали характеристику 25 сенсоров в каждой группе, используя образцы цельной крови с 40% уровнем гематокрита, имеющие концентрации глюкозы примерно 50 мг/дл, примерно 100 мг/дл и примерно 400 мг/дл. Отбирали по десять экземпляров на образец. Вычисляли разницу в концентрации глюкозы между тест-сенсорами, хранившимися при температуре 50°C и при -20°C, и сравнивали с несколькими различными типами систем контроля, 30 предназначеными для самостоятельного тестирования уровня глюкозы в крови. Систематическая ошибка анализа глюкозы у тест-сенсоров согласно вариантам осуществления настоящего изобретения была незначительной. Таким образом, не было никаких явных изменений в результатах анализа глюкозы даже после хранения сенсоров при относительно экстремальных температурах в течение двух недель. Напротив, 35 систематическая ошибка анализа глюкозы у коммерчески доступных сравниваемых тест-сенсоров, как правило, находилась в пределах от примерно 5% до примерно 12%. Таким образом, термостойкость тест-сенсоров согласно вариантам осуществлений настоящего изобретения была значительно лучше термостойкости существующих тест-сенсоров.

Пример 5

Используя тест-сенсоры, выполняли тесты по определению скорости их заполнения образцами крови с высоким содержанием гематокрита. Более конкретно, как показано на Фиг.5, проверяли составы без сурфактанта (состав 1) и с сурфактантом (составы 2-

7). Составы приведены ниже в таблице 2.

Таблица 2

| | Состав | Состав | Состав | Состав | Состав | Состав | Состав |
|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | Медиатор (мМ) | 60 | 60 | 60 | 60 | 50 | 90 |
| 10 | Буфер (мМ) | 75 | 75 | 75 | 75 | 100 | 112 |
| | FAD-GDH (ед./мкл) | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 1,25 | 3,75 |
| | Полимер (HEC) (%) | 0,38 | 0,38 | 0,38 | 0,38 | 0,63 | 0,60 |
| | MEGA 8 (% вес.) | | 0,10 | 0,05 | | | 0,225 |
| | Rhodasurf (% вес.) | | | | 0,10 | 0,05 | |
| | Zwittergent 312 (% вес.) | | | | | 0,30 | |
| | Фосфолан CS131 (% вес.) | | | | | | 0,10 |
| 15 | Медиатор = 3-(2',5'-дисульфоенилимино)-3Н-фенотиазин. Буфер = Фосфатный, кроме состава 6, где использовался TES. TES = (N-три(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфокислота). HEC = гидроксиэтилцеллюлоза. | | | | | | |

Более конкретно, составы 2 и 3 содержали сурфактант MEGA 8, в то время как составы 4 и 5 содержали сурфактант Rhodasurf. Состав 6 содержал сурфактант Zwittergent, и состав 7 содержал сурфактанты MEGA 8 и Фосфолан CS131. Составы 1-7 были подвержены воздействию двух различных условий. Более конкретно, составы 1-7 в течение 2 недель подвергались воздействию температуры -20°C и также в течение 2 недель подвергались воздействию температуры 50°C.

После воздействия указанных условий составы 1-7 были помещены на электроды тест-сенсоров. Сенсоры тестировали в вертикальном (90°) положении с использованием цельной крови, содержащей 60-70% гематокрита. Во время заполнения сенсоров производили съемку и это время измеряли. Время, требуемое для полного заполнения реакционной камеры сенсоров, содержащих составы 1-7, кровью с высоким уровнем гематокрита, показано на Фиг.5. Время заполнения сенсора, содержащего состав 1 (без сурфактанта), составляло примерно 0,6 секунды, а для сенсоров, хранившихся при температурах -20°C и 50°C в течение 2 недель, 0,7 секунды, соответственно. С другой стороны, для составов 2-7 время заполнения как сенсоров, хранившихся в течение 2 недель при температуре -20°C, так и при температуре 50°C, было равно примерно 0,5 секундам или меньше. Для большинства из составов 2-7 время заполнения сенсоров, хранившихся в течение 2 недель как при температуре -20°C, так и при температуре 50°C, составляло примерно 0,4 секунды, при этом некоторые из них имели время, меньшее, чем примерно 0,3 секунды. Таким образом, составы 2-7 с сурфактантами в значительной степени улучшают время заполнения по сравнению с составом 1 без сурфактанта.

Пример 6

Проводили тестирование реагента для определения его максимальной кинетической характеристики.

Реагент содержал 40 мМ 3-(2',5'-дисульфоенилимино)-3Н-фенотиазин, 50 мМ фосфатный буфер, 2,00 ед./мкл FAD-GDH, 0,25% вес. гидроксиэтилцеллюлозу (HEC) и 0,20% вес. сурфактант MEGA 8.

На Фиг.6 показаны выходные сигналы тест-сенсоров, содержащих образцы крови с концентрацией глюкозы 400 мг/дл и 70% уровнем гематокрита. Сигнал, подаваемый на сенсорную пластину с устройством измерения, представлял собой последовательность амперометрических стробирующих импульсов, которая включала восемь импульсов возбуждения, разделенных семью периодами релаксации, как описано в заявке на патент США №2008/0173552. Длительность возбуждений составляла менее 1 секунды. Во время каждого возбуждения регистрировали по три значения выходного тока.

Для определения корреляции значений выходного тока, связанного с входным сигналом, и концентрации аналита в образце значение начального тока возбуждения предпочтительно было больше, чем значения, которые следовали при уменьшении. Выходные сигналы сенсорной пластины на Фиг.6, показывали высокое значение

5 начального тока, которое уменьшалось примерно за две секунды после нанесения образца крови на пластину. Таким образом, в выходном токе 110 наблюдали первые выходные токи, имеющие высокое значение начального тока, с последующим уменьшением значений тока.

Для определения корреляции значений выходного тока, связанного с входным

10 сигналом, и концентрации аналита в образце, различные концентрации аналита в образце также предпочтительно должны демонстрировать по существу постоянную разницу между значениями тока выходного сигнала. Предпочтительно, значение или значения выходного тока, коррелируемые с концентрацией аналита в образце, также брали из периода уменьшения, включая данные тока, отражающие максимальную кинетическую

15 характеристику сенсорной пластины. Кинетика окислительно-восстановительной реакции, лежащая в основе формирования выходных токов, зависит от многих факторов. Эти факторы могут включать скорость, с которой реакционная композиции подвергается повторной гидратации, скорость, с которой ферментативная система реагирует с аналитом, скорость, с которой ферментативная система передает электроны медиатору,

20 и скорость, с которой медиатор передает электроны на электрод. Предполагается, что самое большое влияние на выходной ток из этих и других кинетических факторов, влияющих на выходные токи, оказывает скорость, с которой реактивная композиция подвергается повторной гидратации.

Максимальная кинетическая характеристика сенсорной пластины может быть

25 достигнута во время возбуждения последовательности амперометрических стробирующих импульсов, когда значение начального тока возбуждения с убывающими значениями тока является самым большим для множества возбуждений. Это также может называться пиковым временем сенсора. Предпочтительно, максимальная кинетическая характеристика сенсорной пластины достигается, когда последнее по

30 времени значение тока, получаемое для возбуждения, имеющего убывающие значения тока, является последним по времени самым большим значением тока, полученным для множества возбуждений. Более предпочтительно, максимальная кинетическая характеристика сенсорной пластины достигается, когда значение исходного тока возбуждения, имеющего убывающие значения тока является самым большим для

35 множества возбуждений, и последнее по времени значение тока, полученное для того же самого возбуждения, является последним по времени самым большим значением тока, полученным для множества возбуждений.

Предпочтительно, чтобы максимальная кинетическая характеристика сенсорной пластины была меньше, чем примерно 3 секунды, и более предпочтительно - меньше, 40 чем примерно 2 секунды.

Последовательность амперометрических стробирующих импульсов, используемая для определения максимальной кинетической характеристики сенсорной пластины, включала по меньшей мере семь полных циклов, в которых периоды возбуждения составляли примерно 0,4 секунды, а периоды релаксации составляли примерно 1 секунду 45 и включали нулевой ток через образец, и выполнялись путем размыкания цепи. Во время каждого возбуждения измеряли по меньшей мере три значения выходного тока. Потенциал, подаваемый на сенсорную пластину, поддерживали по существу постоянным, при 250 мВ, и температура образца составляла 23°C. Перед полными циклами

прикладывали 400 мВ импульс в течение 0,9 секунд.

Сенсорная пластина с 400 мг/дл глюкозы по Фиг.6 достигала максимальной кинетической характеристики во время уменьшения возбуждения, которое включало выходные токи 120 и 125 между 3 и 4 секундами с момента введения образца в сенсорную пластины. Было установлено, что самое большое исходное значение и самое большое последнее по времени значение тока, полученные из возбуждения, имеющего убывающие значения тока, присутствовали в цикле, который включал выходные токи 120 и 125. Сравните начальный выходной ток 120 с выходными токами 110, 130, 140, 150, 160 и 170, и также сравните последний по времени выходной ток 125 с выходными токами 115, 135, 145, 155, 165 и 175. Таким образом, сенсор достигает своей максимальной кинетической характеристики между 3 и 4 секундами даже для образца крови с 70% гематокрита.

Пример 7

На Фиг.7-9 показано, что состав реагента также может влиять на максимальную кинетическую характеристику для крови с различными уровнями гематокрита. Согласно Фиг.7 при концентрации глюкозы 50 мг/дл максимальная кинетическая характеристика с использованием пикового времени сенсора увеличивалась по мере увеличения уровня гематокрита. Медиатор, содержащий меньший процент сульфата (5% сульфат), вообще имел намного более быстрое пиковое время для сравниваемых уровней гематокрита и концентраций буфера. См. например, данные для уровня гематокрита 60% с использованием 50 мМ фосфатного буфера (сравните 3,5 секунды с медиатором, содержащим 5% сульфат, и 7,5 секунд с медиатором, содержащим 20% сульфат). Состав реагента, например сила буфера и остаточное содержание сульфата в медиаторе, сильно влияет на пиковое время реакции сенсора, особенно в образцах с высоким уровнем гематокрита (>40%). Таким образом, высокое содержание неорганической соли (в буфере или в медиаторе, в терминах концентрации сульфата) в составе сенсора увеличивает пиковое время сенсора (т.е. замедляет реакцию сенсора). На Фиг.8 показаны аналогичные результаты для концентрации глюкозы 100 мг/дл. Использование высокой концентрации глюкозы 400 мг/дл, Фиг.9, показывает максимальную кинетическую характеристику с использованием пикового времени сенсора обычно ниже примерно 3 или 3,5 секунд, с несколькими пиковыми временами сенсора, равными 2 секундам. У сенсора с 5%-м сульфатом и 100 мМ фосфатным буфером при высоких уровнях гематокрита была максимальная кинетическая характеристика с пиковым временем сенсора, составляющим примерно 4,5 или 5 секунд.

Таким образом, как показано, при концентрациях глюкозы 50 мг/дл и 100 мг/дл для достижения быстрой повторной гидратации реагента и реакции глюкозы в образцах с высоким содержанием гематокрита содержание соли в составах реагента должно быть понижено.

Пример 8

Проводили тестирование максимальной кинетической характеристики двух составов после хранения тест-сенсоров в стрессовых условиях (-20°C и 50°C в течение 4 недель). Состав, показанный на Фиг.10а, содержал 50 мМ фосфатный буфер и 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, содержащий 5% вес. сульфата. Состав по фиг.10б содержал 100 мМ фосфатный буфер и 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, содержащий 20% вес. сульфата. Последовательность амперометрических стробирующих импульсов, используемая в этом примере, была аналогична последовательности, описанной выше в примере 6.

Как показано на Фиг.10а, максимальная кинетическая характеристика составляла

примерно 2 секунды для образцов, которые находились при температуре -20°C в течение 4 недель. Максимальная кинетическая характеристика составляла примерно 3,5 секунды для образцов, которые находились при температуре -50°C в течение 4 недель. Согласно Фиг.10b максимальная кинетическая характеристика составляла примерно 3,5 секунды для образцов, которые находились при температуре -20°C в течение 4 недель, и примерно 5 секунд для образцов, которые находились при температуре -50°C в течение 4 недель. Таким образом, составы, имеющие более низкое количество неорганических солей (например, Фиг.10a), имели улучшенную максимальную кинетическую характеристику по сравнению с составами, содержащими более высокое количество неорганических солей (например, Фиг.10b).

Кроме того, проводили тестирование большого количества составов, использованных на Фиг.10a, имеющих 2-секундное пиковое время сенсора, для определения систематической ошибки или выраженной в % систематической ошибки. Выраженная в % систематическая ошибка для концентраций глюкозы, превышающих 100 мг/дл, была меньше чем примерно $\pm 2\%$. Выраженная в % систематическая ошибка для 400 мг/дл концентрации глюкозы была примерно $\pm 4\%$. Также определяли систематическую ошибку анализа для большого количества составов, используемых на Фиг.10b, с пиковым временем сенсора 3-4 секунды. Выраженная в % систематическая ошибка для концентрации глюкозы, не превышающей 100 мг/дл, была меньше чем примерно $\pm 3\%$. Выраженная в % систематическая ошибка для 400 мг/дл концентрации глюкозы была примерно $\pm 10\%$. Таким образом, систематическая ошибка анализа для партии, имеющей пиковое время сенсора 3-4 секунды, была больше, чем для партии, имеющей пиковое время сенсора 2 секунды.

Пример 9

На Фиг.11 показан выраженный в % коэффициент изменчивости (%CV) в образцах цельной крови с 40% уровнем гематокрита при различных концентрациях глюкозы. Концентрации глюкозы колебались от 36 мг/дл до 627 мг/дл. Растворы реагентов партии с низким содержанием соли, сравнивали с растворами реагентов партии с высоким содержанием соли. Партия с низким содержанием соли включала 50 мМ фосфатный буфер с pH 6,5, 2 ед./мкл FAD-GDH, 40 мМ 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин, содержащий 5% вес. сульфата, 0,25% гидроксиэтилцеллюлозу-300k и 0,2% сурфактант MEGA. Партия с высоким содержанием соли включала 100 мМ фосфатный буфер с pH 6,5, 2 ед./мкл FAD-GDH, 40 мМ 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин, имеющий 20% вес. сульфата, 0,25% гидроксиэтилцеллюлозу-300k и 0,2% сурфактант MEGA 8. %CV вычисляли, исходя из среднего значения максимальной кинетической характеристики, используя пиковые времена сенсора, и путем деления на стандартное отклонение таких пиковых времен сенсора. Полученное значение умножали на 100, получая %CV. В общей сложности было проверено 40 образцов как для растворов реагентов с низким содержанием соли, так и для растворов реагентов с высоким содержанием соли.

Раствор реагента с низким содержанием соли, достигавший максимальной кинетической характеристики с пиковыми временами сенсора, меньшими чем 3 секунды, давал лучший %CV для образцов цельной крови с 40% уровнем гематокрита по сравнению с раствором реагента с более высоким содержанием соли. Растворы реагента с низким содержанием соли имели намного более лучший %CV при более низких концентрациях глюкозы в образцах.

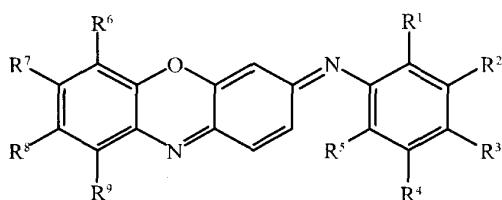
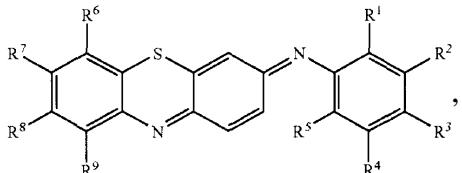
Хотя описанные в настоящей работе примеры относятся к *in vitro* приложениям реагентов тест-сенсора по настоящему изобретению, предполагается, что эти реагенты

также могут быть выполнены с возможностью осуществления контроля содержания аналита *in vivo* с использованием химически иммобилизованных медиаторов (например, с помощью химической реакции в одной или нескольких группах заместителей на ароматических кольцах), и путем введения иммобилизованных медиаторов в устройство, 5 которое может быть введено пациенту подкожно. Реагенты вариантов осуществления, описанные в настоящей работе, также можно использовать с системами непрерывного контроля содержания аналита.

Альтернативный вариант осуществления А

Реагент для детектирования аналита, содержащий

10 флавопротеиновый фермент;
медиатор, выбранный из группы



или их комбинации, где R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ являются одинаковыми или 25 разными и независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбокси, карбоксиалкила, аллоксикарбонила, арилоксикарбонила, ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, алкокси, арилокси, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинаций;

по меньшей мере один сурфактант;

30 полимер; и

буфер.

Альтернативный вариант осуществления В

Реагент альтернативного варианта осуществления А, в котором флавопротеиновый фермент представляет собой FAD-глюкозодегидрогеназу.

Альтернативный вариант осуществления С

Реагент альтернативного варианта осуществления А, в котором медиатор содержит 3-(2',5'-дисульфофенилимино)-3Н-фенотиазин.

Альтернативный вариант осуществления D

Реагент альтернативного варианта осуществления А, в котором сурфактант содержит 40 сурфактант на основе сахаридов или сурфактант на основе фосфорилхолина.

Альтернативный вариант осуществления E

Реагент альтернативного варианта осуществления А, в котором полимер представляет собой полимер на основе целлюлозы.

Альтернативный вариант осуществления F

45 Реагент альтернативного варианта осуществления А, в котором буфер содержит фосфатный буфер.

Альтернативный вариант осуществления G

Реагент для детектирования аналита в жидком образце, содержащий

FAD-глюкозодегидрогеназу с активностью примерно от 0,1 ед./мкл до примерно 10 ед./мкл;

медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, имеющий концентрацию примерно от 5 мМ до примерно 120 мМ;

5 сурфактант гептаноил-N-метилглюкамид, имеющий концентрацию от примерно 0,05% вес. до примерно 0,5% вес. реагента; и

полимер гидроксиэтилцеллюлозу, имеющую концентрацию от примерно 0,1% вес. до примерно 4% вес. реагента.

Альтернативный вариант осуществления Н

10 Реактив альтернативного варианта осуществления G, дополнительно содержащий фосфатный буфер.

Альтернативный вариант осуществления I

Реактив альтернативного варианта осуществления H, в котором концентрация фосфатного буфера составляет от примерно 25 мМ до примерно 200 мМ и pH от 15 примерно 4 до примерно 8.

Альтернативный вариант осуществления J

Реактив альтернативного варианта осуществления I, в котором концентрация фосфатного буфера составляет от примерно 50 мМ до примерно 150 мМ и pH от примерно 6 до примерно 7.

20 Альтернативный вариант осуществления K

Реактив альтернативного варианта осуществления G, в котором реагент содержит FAD-глюкозодегидрогеназу с активностью примерно от 0,5 ед./мкл до примерно 2,5 ед./мкл; медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, имеющий концентрацию примерно от 30 мМ до примерно 60 мМ; сурфактант гептаноил-N-метилглюкамид,

25 имеющий концентрацию от примерно 0,1% вес. до примерно 0,4% вес. реагента; и полимер гидроксиэтилцеллюлозу, имеющую концентрацию от примерно 0,2% вес. до примерно 0,5% вес. реагента.

Альтернативный вариант осуществления L

Электрохимический тест-сенсор, содержащий 30 рабочий электрод, имеющий поверхность; противоэлектрод, имеющий поверхность; и реагент, покрывающий по меньшей мере часть поверхности рабочего электрода и по меньшей мере часть поверхности противоэлектрода, причем реагент содержит флавопротеин, фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор, буфер, и по меньшей мере один сурфактант и полимер.

Альтернативный вариант осуществления M

Сенсор альтернативного варианта осуществления L, в котором флавопротеин включает FAD-глюкозодегидрогеназу.

Альтернативный вариант осуществления N

40 Сенсор альтернативного варианта осуществления L, в котором фенотиазиновый медиатор включает 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин.

Альтернативный вариант осуществления O

Сенсор альтернативного варианта осуществления L, в котором по меньшей мере один сурфактант включает гептаноил-N-метилглюкамид.

45 Альтернативный вариант осуществления P

Сенсор альтернативного варианта осуществления L, в котором полимер представляет собой полимер на основе целлюлозы.

Альтернативный способ O

Способ детектирования аналита в жидким образце, причем аналит подвергается химической реакции, способ, содержащий стадии, на которых

предоставляют поверхность электрода;

облегчает течение жидкого образца на поверхности электрода, используя по меньшей

5 мере один сурфактант;

катализируют химическую реакцию с помощью флавопротеинового фермента;

генерируют окислительно-восстановительный эквивалент химической реакции и передают окислительно-восстановительный эквивалент на поверхность электрода, используя фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор.

10 Альтернативный способ R

Способ альтернативного способа Q, в котором поверхность электрода включает рабочий электрод и противоэлектрод, причем поверхность электрода включает реагент, содержащий по меньшей мере один сурфактант, флавопротеиновый фермент, фенотиазиновый медиатор и буфер.

15 Альтернативный способ S

Способ альтернативного способа R, в котором реагент дополнительно содержит полимер на основе целлюлозы.

Альтернативный способ T

Способ альтернативного способа S, в котором полимер представляет собой полимер

20 на основе целлюлозы.

Альтернативный способ U

Способ альтернативного способа R, в котором буфер включает фосфатный буфер.

Хотя настоящее изобретение может быть модифицировано или может иметь альтернативные формы, конкретные варианты его осуществления и способы показаны

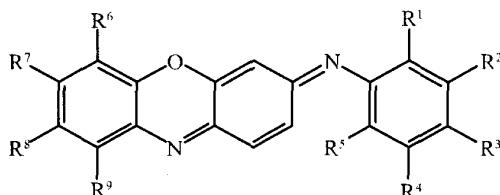
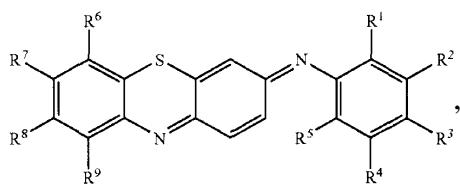
25 в виде примера на чертежах и подробно описаны в настоящей работе. Однако очевидно, что они не предназначены для ограничения изобретения конкретными раскрытыми формами и способами, а напротив, изобретение охватывает все модификации, эквиваленты и альтернативы, соответствующие сути и попадающие в объем изобретения.

30 Формула изобретения

1. Реагент для детектирования глюкозы, содержащий

фермент FAD-глюкозодегидрогеназу;

медиатор, выбранный из группы



45 или их комбинации, где R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ являются одинаковыми или разными и независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбоксила, карбоксиалкила, алcoxикарбонила, арилоксикарбонила,

ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, алcoxси, арилокси, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинации;

полимер; и
буфер,

5 причем по меньшей мере один из медиатора и буфера содержит неорганическую соль, при этом молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

2. Реагент по п.1, в котором медиатор содержит 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин.

10 3. Реагент по п.1, дополнительно содержащий сурфактант.

4. Реагент по п.1, в котором молярное отношение общего количества неорганической соли к медиатору меньше, чем 2:1.

5. Реагент для детектирования глюкозы в жидким образце, содержащий FAD-глюкозодегидрогеназу с активностью от 0,1 ед./мкл до 10 ед./мкл;

15 медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин, имеющий концентрацию от 5 мМ до 120 мМ;

сурфактант, имеющий концентрацию от 0,05% вес. до 0,5% вес. реагента;

полимер гидроксиэтилцеллюлозу, имеющую концентрацию от 0,1% вес. до 4% вес. реагента, и буфер,

20 причем по меньшей мере один из медиатора и буфера содержит неорганическую соль, при этом молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

6. Реагент по п.5, в котором FAD-глюкозодегидрогеназа имеет активность от 0,5 ед./мкл до 2,5 ед./мкл; медиатор 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин имеет

25 концентрацию от 30 мМ до 60 мМ; сурфактант гептanoил-N-метилглюкамид имеет концентрацию от 0,1% вес. до 0,4% вес. реагента; и полимер гидроксиэтилцеллюлозы имеет концентрацию от 0,2% вес. до 0,5% вес. реагента.

7. Электрохимический тест-сенсор, содержащий
рабочий электрод, имеющий поверхность;

30 противоэлектрод, имеющий поверхность; и

реагент, покрывающий по меньшей мере часть поверхности рабочего электрода и по меньшей мере часть поверхности противоэлектрода, причем реагент содержит фермент FAD-глюкозодегидрогеназу, фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор, буфер, и полимер, причем по меньшей мере один из медиатора и буфера, содержит

35 неорганическую соль, при этом молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

8. Тест-сенсор по п.7, в котором фенотиазиновый медиатор включает 3-(2',5'-дисульфенилимино)-3Н-фенотиазин.

9. Способ детектирования глюкозы в жидким образце, причем глюкоза подвергается химической реакции, содержащий стадии, на которых

предоставляют поверхность электрода, которая включает реактив, содержащий по меньшей мере один сурфактант, фермент FAD-глюкозодегидрогеназу, фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор и буфер;

облегчают течение жидкого образца на поверхности электрода, используя по

45 меньшей мере один сурфактант;

катализируют химическую реакцию с помощью фермента FAD-глюкозодегидрогеназу;

генерируют окислительно-восстановительный эквивалент химической реакцией; и

передают окислительно-восстановительный эквивалент на поверхность электрода, используя фенотиазиновый или феноксазиновый медиатор,

причем максимальная кинетическая характеристика меньше, чем 3 секунды и по меньшей мере один из медиатора и буфера содержит неорганическую соль, при этом 5 молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

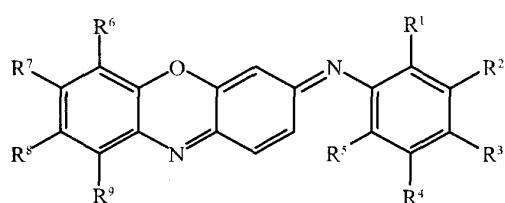
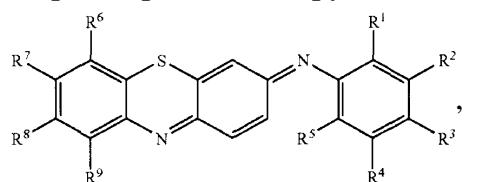
10. Способ по п.9, в котором поверхность электрода включает рабочий электрод и противоэлектрод, причем поверхность электрода включает реактив, содержащий по меньшей мере один сурфактант, фермент FAD-глюкозодегидрогеназу, фенотиазиновый 10 медиатор и буфер.

11. Способ по п.9, в котором максимальная кинетическая характеристика меньше, чем 2 секунды.

12. Способ детектирования глюкозы в жидким образце, включающий стадии, на которых

15 предоставляет поверхность электрода;

предоставляет реактив, содержащий фермент FAD-глюкозодегидрогеназу и медиатор, выбранный из группы



или их комбинации, где R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ являются одинаковыми или

30 разными и независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбокси, карбоксиалкила, алcoxикарбонила, арилоксикарбонила, ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, алcoxис, арилоксис, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинации; по меньшей 35 мере один сурфактант; и буфер; реагент, находящийся в контакте с поверхностью электрода;

контактирование с жидким образцом, содержащим реагент; и определение концентрации глюкозы,

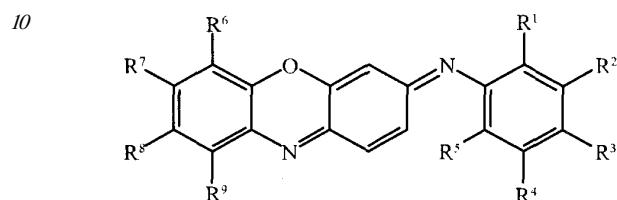
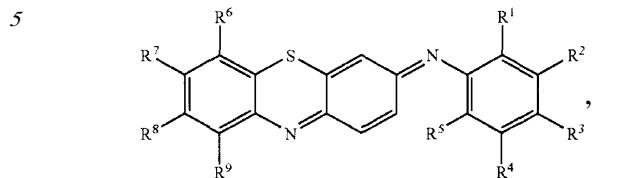
причем максимальная кинетическая характеристика меньше, чем 3 секунды, и по 40 меньшей мере один из медиатора и буфера содержит неорганическую соль, при этом молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

45 13. Способ по п.12, в котором по меньшей мере один из медиатора и буфера включает неорганическую соль, причем молярное отношение общего количества неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

14. Тест-сенсор для детектирования концентрации глюкозы в жидким образце, включающий:

основу, имеющую по меньшей мере два электрода;

второй слой, образующий вместе с основой капиллярный канал;
реагент, включающий:
фермент FAD-глюкозодегидрогеназу;
mediator, выбранный из группы



15 или их комбинации, где $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ и R^9 являются одинаковыми или разными и независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, циклической группы, гетероцикла, галогена, галогеналкила, карбокси, карбоксиалкила, алcoxикарбонила, арилоксикарбонила, ароматической кетогруппы, алифатической кетогруппы, алcoxиси, арилокси, нитро, диалкиламино, аминоалкила, сульфо, дигидроксибора и их комбинации; и
20 буфер,

где систематическая ошибка при определении концентрации глюкозы с использованием тест-сенсора составляет менее чем $+/-10\%$, и по меньшей мере один из
25 медиатора и буфера содержит неорганическую соль, при этом молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

15. Тест-сенсор по п.14, где реагент дополнительно содержит по меньшей мере один сурфактант.

16. Тест-сенсор по п.14, где реагент дополнительно содержит по меньшей мере один
30 полимер.

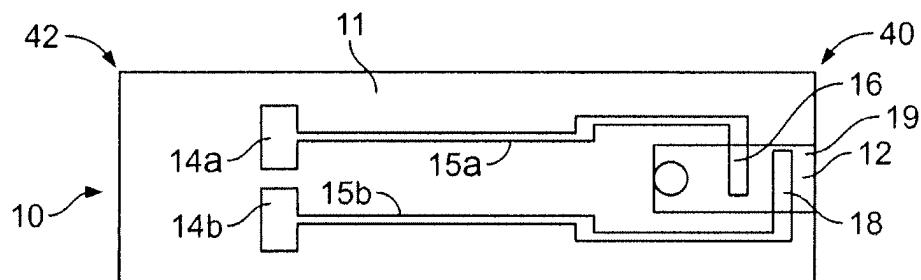
17. Тест-сенсор по п.14, где по меньшей мере один из медиатора и буфера содержит неорганическую соль, при этом молярное отношение общего содержания неорганической соли к медиатору меньше, чем 3:1.

18. Тест-сенсор по п.14, где систематическая ошибка при определении концентрации
35 глюкозы с использованием тест-сенсора составляет менее чем $+/-4\%$.

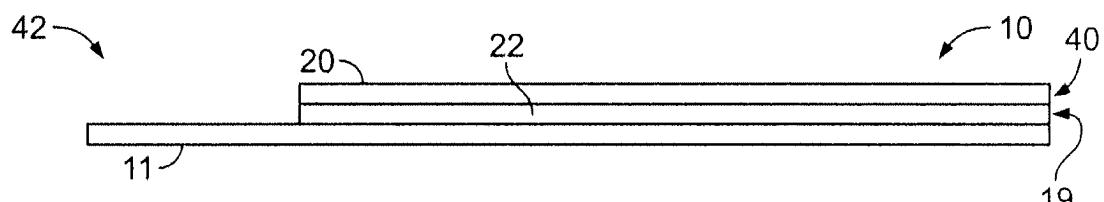
19. Тест-сенсор по п.14, где систематическая ошибка при определении концентрации глюкозы с использованием тест-сенсора составляет менее чем $+/-2\%$.

40

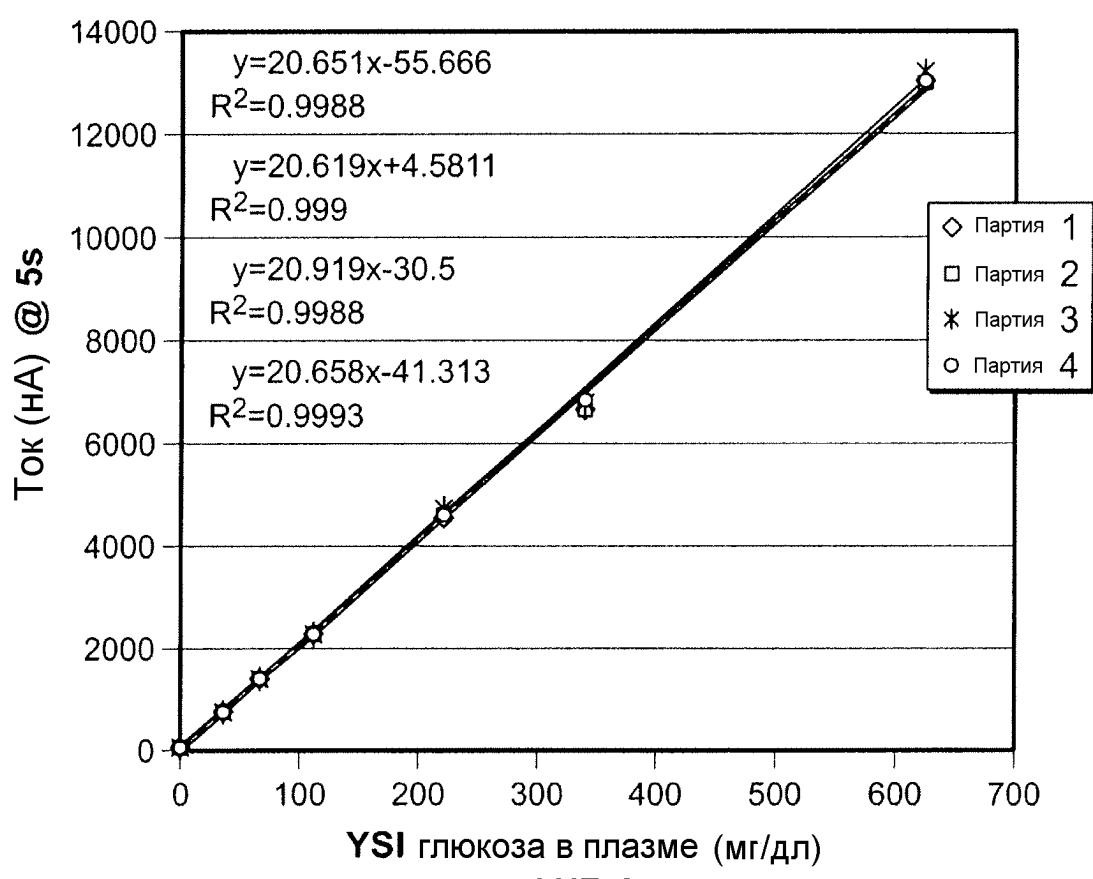
45



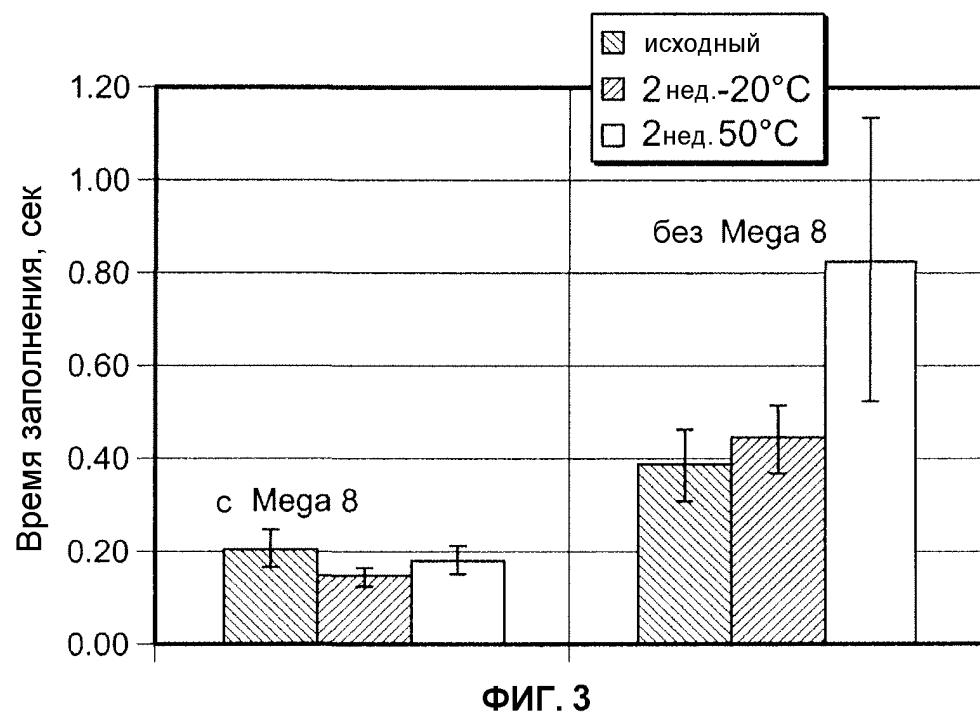
ФИГ. 1А



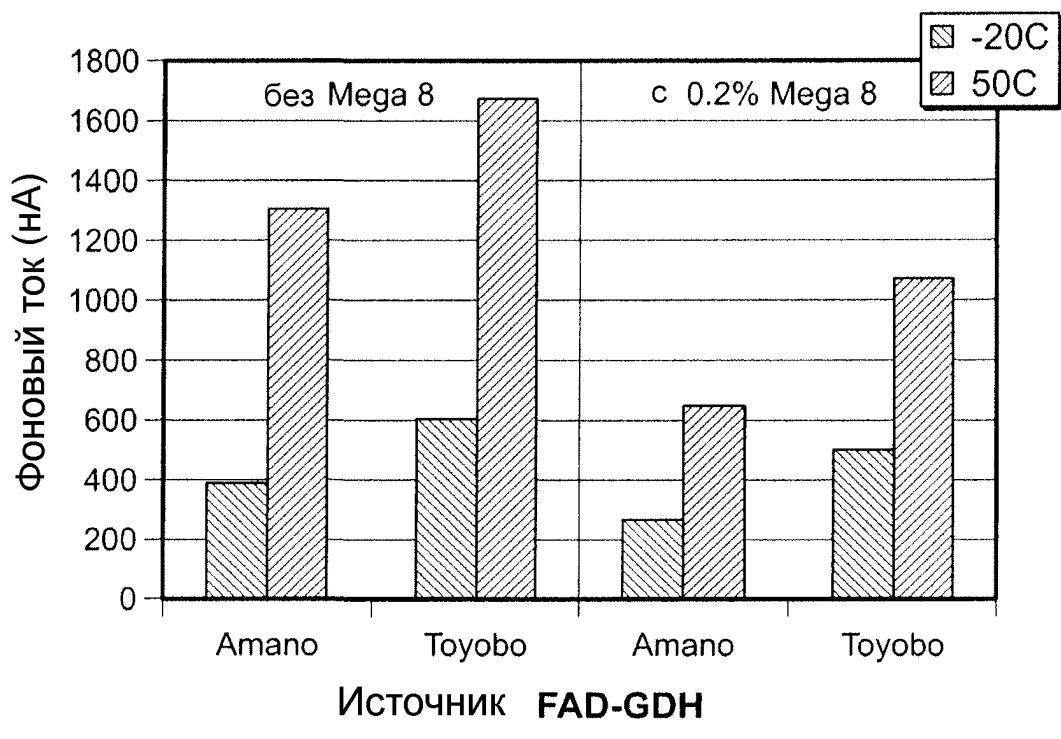
ФИГ. 1В



ФИГ. 2

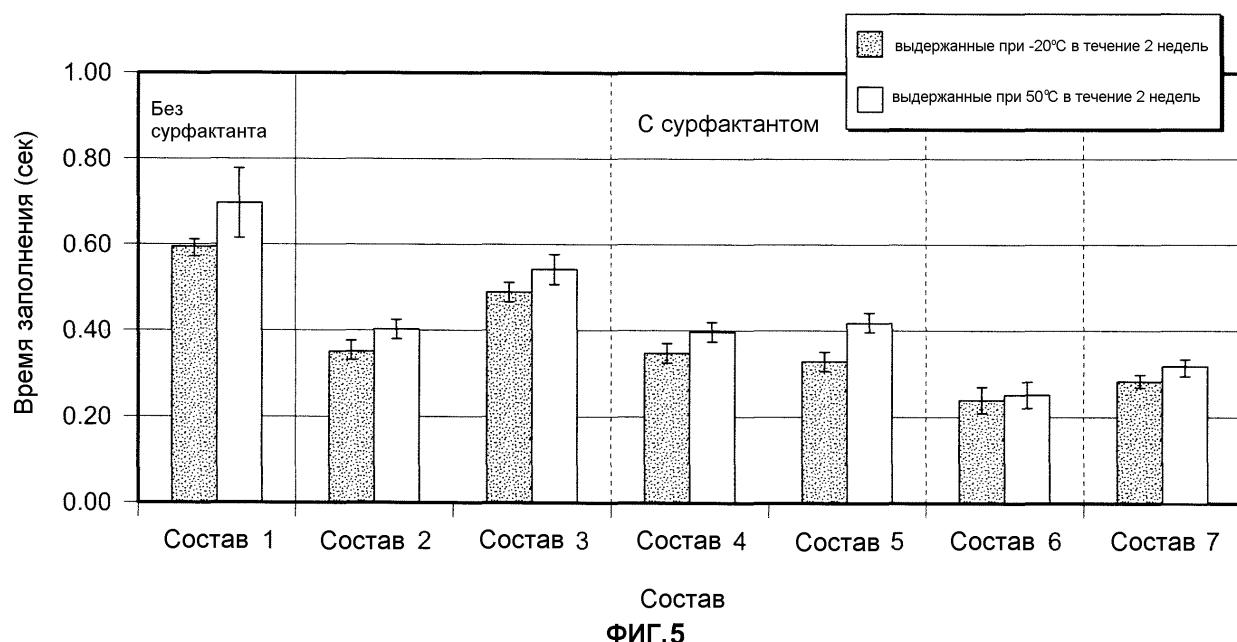


ФИГ. 3

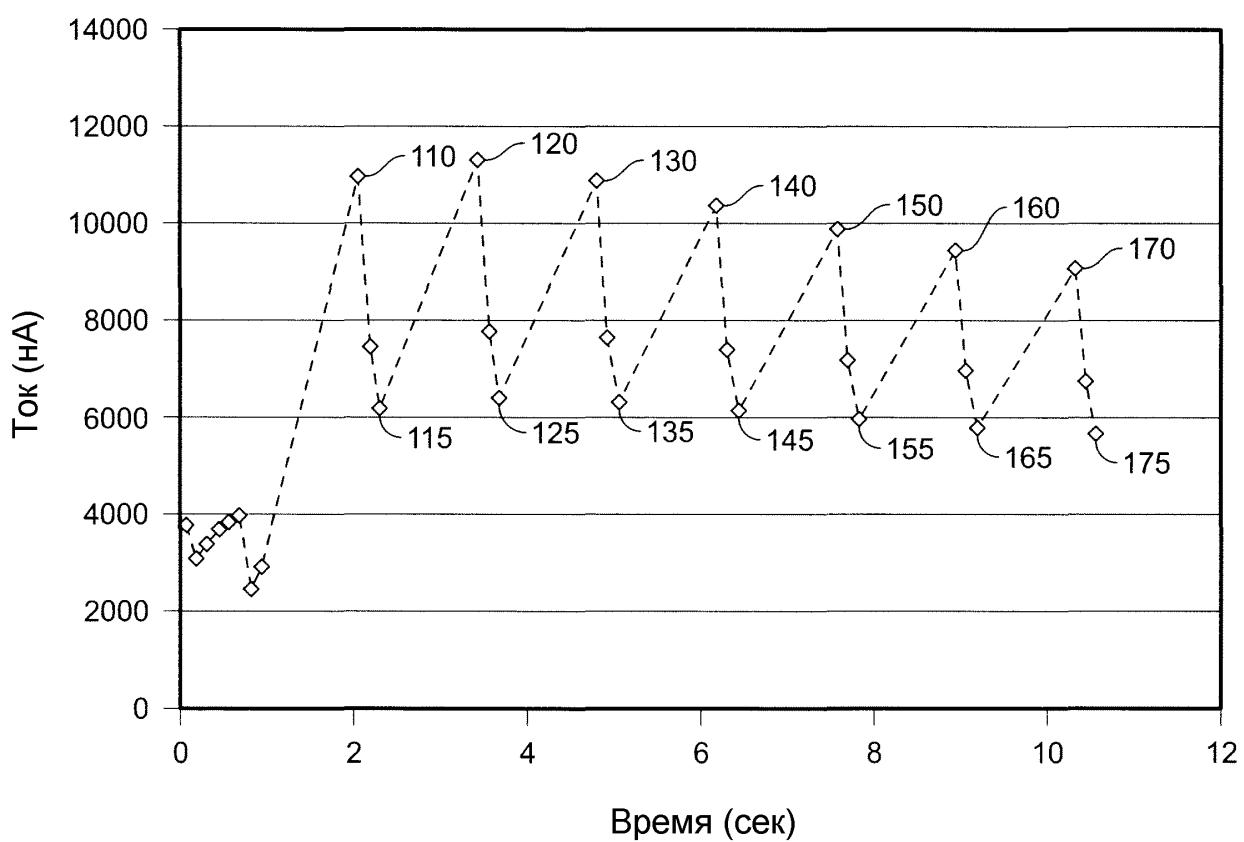


ИСТОЧНИК FAD-GDH

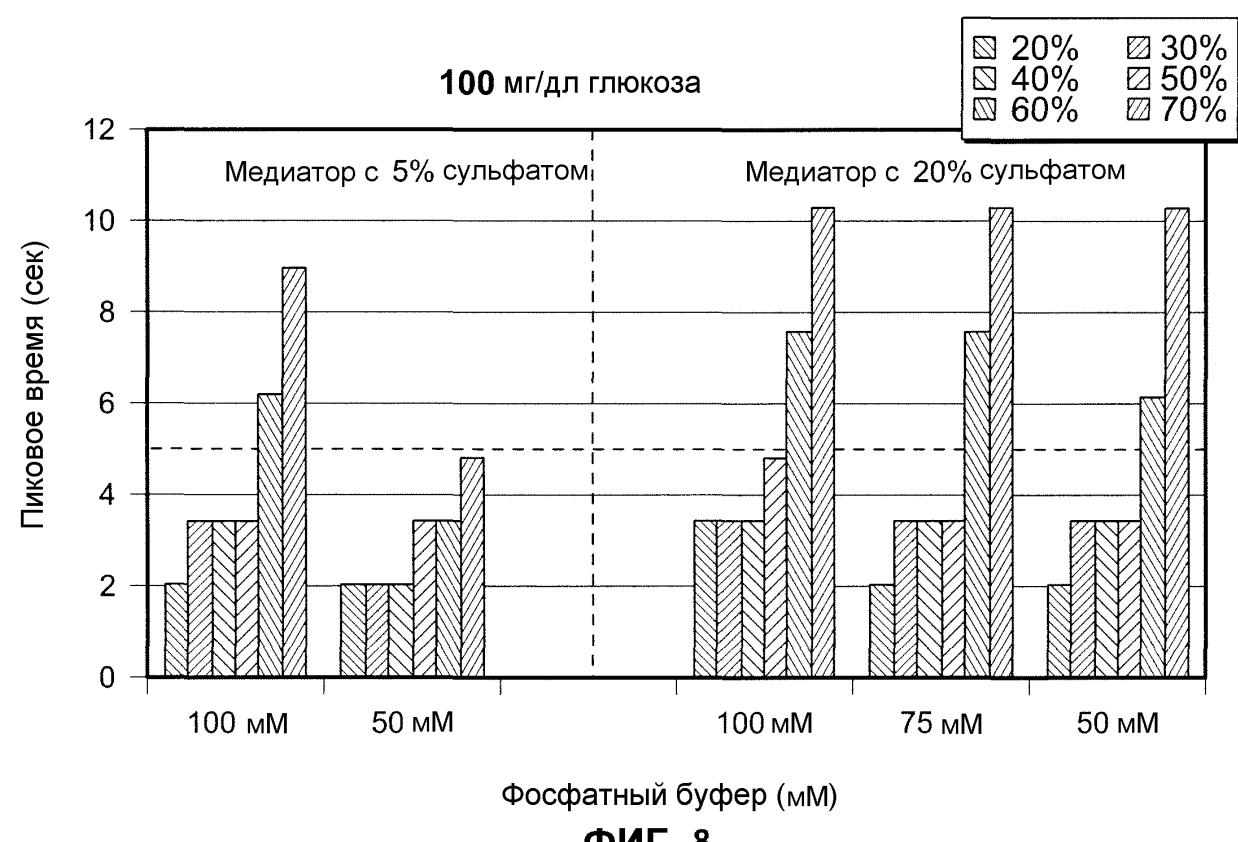
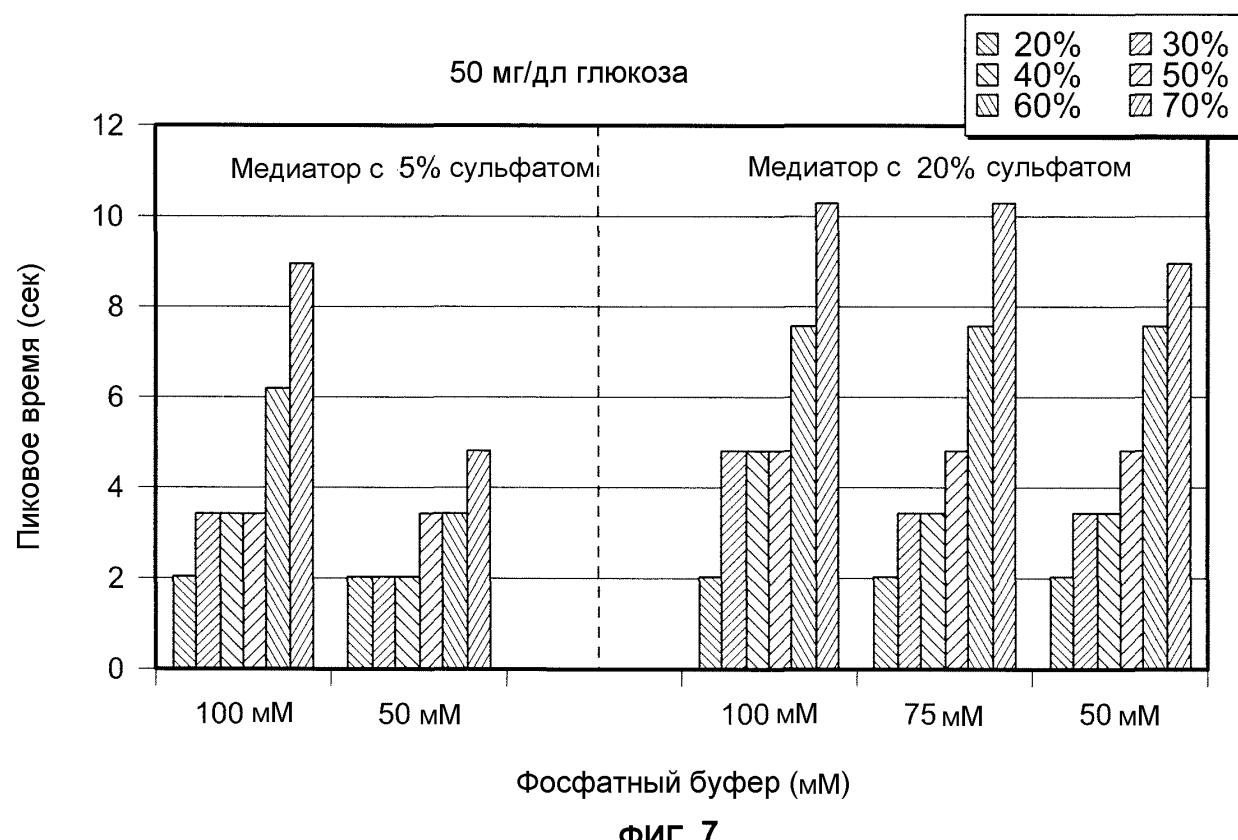
ФИГ. 4

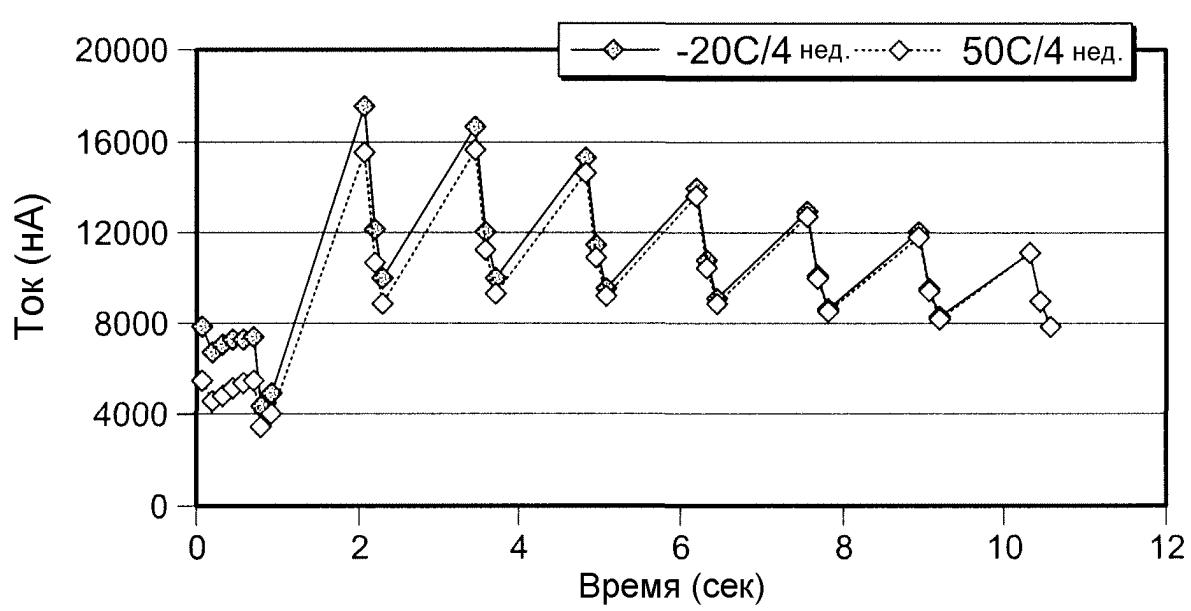
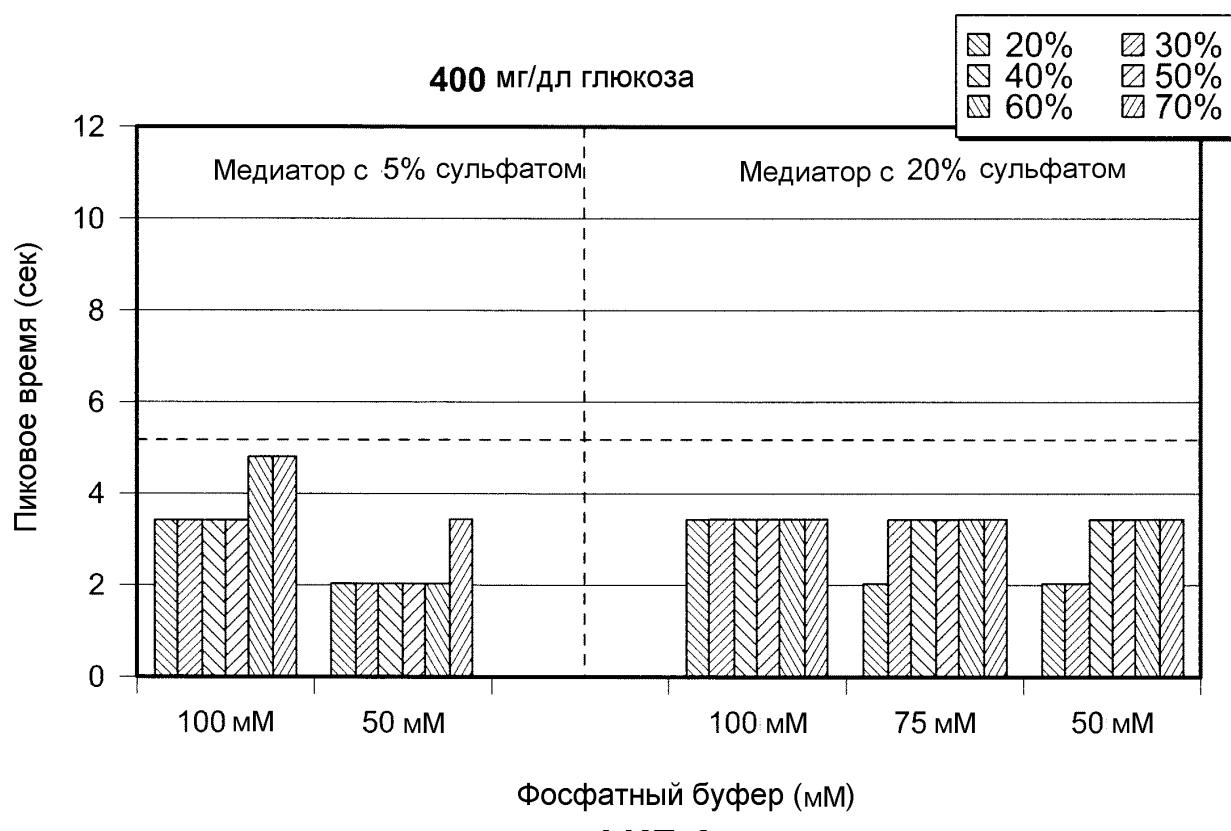


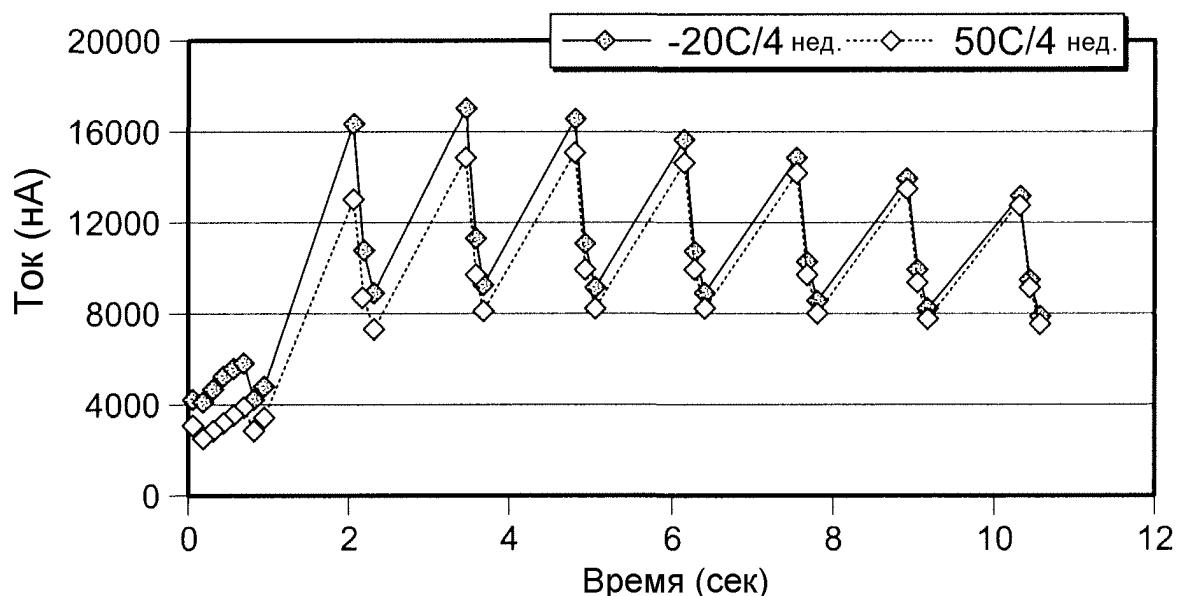
ФИГ. 5



ФИГ. 6







ФИГ. 10В

| | %CV для цельной крови с 40% гематокритом | | | | | |
|-----------------------------------|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Сенсор | 36 мг/дл | 66 мг/дл | 110 мг/дл | 220 мг/дл | 330 мг/дл | 627 мг/дл |
| Партия с низким содержанием соли | 1.4 | 2.7 | 2.1 | 1.4 | 1.8 | 2.1 |
| Партия с высоким содержанием соли | 5.5 | 4.9 | 4.3 | 5.0 | 1.8 | 2.1 |

ФИГ. 11