



(12) 发明专利

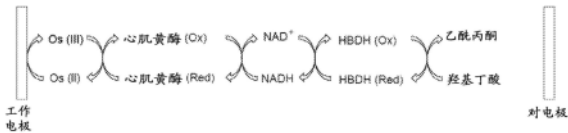
(10) 授权公告号 CN 114554955 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 03

(21) 申请号 202080070792.3	(72) 发明人 B·J·费尔德曼 T·欧阳 A·H·瓦利
(22) 申请日 2020.08.28	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 114554955 A	(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所 有限公司 11038 专利代理师 张小勇
(43) 申请公布日 2022.05.27	
(30) 优先权数据 62/894,306 2019.08.30 US	(51) Int.Cl. A61B 5/145 (2006.01) A61B 5/1473 (2006.01) A61B 5/1486 (2006.01) G01N 33/98 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2022.04.08	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2020/048497 2020.08.28	(56) 对比文件 US 2019024130 A1, 2019.01.24
(87) PCT国际申请的公布数据 W02021/041875 EN 2021.03.04	审查员 卢晓萍
(73) 专利权人 美国雅培糖尿病护理公司 地址 美国加利福尼亚	权利要求书1页 说明书20页 附图19页

(54) 发明名称
用于检测醇的分析物传感器和感测方法

(57) 摘要
用于检测个体醇浓度、特别是个体体内醇浓度的设备、方法和系统。醇感测组合物包括至少一个醇响应活性区域,该活性区域包含协同酶系统,该协同酶系统具有能够协同作用以促进醇检测的至少第一酶和第二酶。协同酶系统中的至少一种酶是酮还原酶。



1. 一种分析物传感器,其包含:
传感器尾部,其包含至少一个工作电极;和
设置在所述工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,所述至少一个醇响应活性区域至少包含(i)醛酮还原酶、(ii)心肌黄酶和(iii)作为辅因子的氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)或氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD(P)^+),
其中由所述辅因子介导的所述醛酮还原酶与心肌黄酶之间的反应产生与醇浓度成比例的信号。
2. 根据权利要求1所述的分析物传感器,其中所述醛酮还原酶是KRED-P1-A04、KRED-P2-C11、KRED-P2-G03或KRED-P2-H07。
3. 根据权利要求1所述的分析物传感器,其中在所述至少一个醇响应活性区域上设置膜。
4. 根据权利要求3所述的分析物传感器,其中所述膜是聚乙烯基吡啶、聚乙烯基咪唑或其任何共聚物中的一种。
5. 根据权利要求1所述的分析物传感器,其中所述至少一个醇响应活性区域包含聚合物。
6. 根据权利要求5所述的分析物传感器,其中所述醛酮还原酶和所述心肌黄酶与所述聚合物化学结合。
7. 根据权利要求1所述的分析物传感器,其中所述至少一个醇响应活性区域包含电子转移剂。
8. 根据权利要求1所述的分析物传感器,其中所述至少一个醇响应活性区域包含稳定剂。
9. 一种检测醇的方法,其包括:
使用分析物传感器检测与醇浓度成比例的信号,所述分析物传感器包含:
传感器尾部,其包含至少一个工作电极,所述传感器尾部配置用于植入组织中;和
设置在所述工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,所述至少一个醇响应活性区域至少包含(i)醛酮还原酶、(ii)心肌黄酶和(iii)作为辅因子的氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)或氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD(P)^+),
其中由所述辅因子介导的所述醛酮还原酶与心肌黄酶之间的反应产生与醇浓度成比例的信号。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述醛酮还原酶是KRED-P1-A04、KRED-P2-C11、KRED-P2-G03或KRED-P2-H07。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中在所述至少一个醇响应活性区域上设置膜。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述膜是聚乙烯基吡啶、聚乙烯基咪唑或其任何共聚物中的一种。
13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述至少一个醇响应活性区域包含聚合物。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述醛酮还原酶和所述心肌黄酶与所述聚合物化学结合。
15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述至少一个醇响应活性区域包含电子转移剂。
16. 根据权利要求9所述的方法,其中所述至少一个醇响应活性区域包含稳定剂。

用于检测醇的分析物传感器和感测方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年8月30日提交的标题为“用于检测醇的分析物传感器和感测方法”的美国临时申请62/894,306的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 个体体内各种分析物的检测有时能够对于监测他们的健康状况和福利是至关重要的。与正常分析物水平的偏差通常能够表明潜在的生理状况,例如代谢状况或疾病,或暴露于特定环境因素或刺激。

[0005] 可以在一段时间内定期或连续进行个体中的分析物监测。可以通过以一个或多个时间间隔抽取体液例如血液样品并离体分析进行定期分析物监测。可以使用一个或多个传感器进行连续分析物监测,所述传感器至少部分地保持植入个体的组织内,例如皮肤、皮下或静脉内,从而可以在体内进行分析。例如,植入式传感器可以根据个体的特定健康需求和/或先前测量的分析物水平,以任何规定的速率收集分析物数据。

[0006] 任何分析物都可以适用于体内分析,前提是能够鉴定合适的化学物质以感测分析物。实际上,近年来已经开发和改进了配置用于测定葡萄糖的体内电流传感器。可能同样需要监测通常受生理失调影响的其他分析物,包括但不限于乳酸、氧、pH、A1c、酮、药物水平等。

[0007] 对个体的医疗福利可能特别重要的另一种分析物是醇(alcohol)水平。事实上,与个体体内醇水平有关的信息可用于预测或监测另一种感兴趣的分析物的水平。例如,醇可能会改变个体的血糖控制,其血糖水平自然失调或在没有干预的情况下缺乏体内平衡,这可能对个体有害。可能因醇而失调的其他分析物尤其包括甘油三酯(例如,与心脏病、中风、血压、肥胖有关)、 γ -谷氨酰转移酶(GGT)(例如,与癌症、肝炎、骨病有关)和皮质醇(例如,与压力、炎症有关)。因此,需要监测个体的醇水平。

[0008] 附图简要说明

[0009] 包括以下附图以说明本公开内容的某些方面,并且不应被视为排他性实施方案。所公开的主题能够在形式和功能上进行相当大的修改、变更、组合和等效,而不脱离本公开内容的范围。

[0010] 图1显示了可以结合本公开内容的分析物传感器的示例性感测系统的图。

[0011] 图2A显示了兼容用于本文公开内容的一些实施方案中的具有单个工作电极的示例性双电极分析物传感器配置的图。图2B和2C显示了兼容用于本文公开内容的一些实施方案中的具有单个工作电极的示例性三电极分析物传感器配置的图。

[0012] 图3显示了兼容用于本文公开内容的一些实施方案中的具有两个工作电极、一个参比电极和一个对电极的示例性分析物传感器配置的图。

[0013] 图4A显示了根据本公开内容的各种实施方案的使用位于工作电极上的酮还原酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和心肌黄酶(diaphorase)的与醇检测相关的协同酶系统。

[0014] 图4B显示了根据本公开内容的各种实施方案的使用位于工作电极上的酮还原酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸和心肌黄酶的与醇检测相关的协同酶系统。

[0015] 图5A-5D显示了各种包含KRT的传感器对各种乙醇浓度的响应的图示。图5E显示了来自图5A-5C的四个包含KRT的传感器的在4mM乙醇的响应的图示,显示从基线(无EtOH暴露)到4mM乙醇的电流响应的变化(Δ)。

[0016] 图6A显示了各种包含KRT的传感器对各种乙醇浓度的响应的图示。图6B显示了图6A中测量的乙醇浓度的线性灵敏度响应。图6C显示了图6A的各种包含KRT的传感器的稳定性响应的图示。

[0017] 图7显示了各种包含KRT的传感器和ADH对照传感器对醛暴露的稳定性响应的图示。

[0018] 图8显示了与ADH对照相比的各种KRT的动力学测定结果的图示。

[0019] 图9A和9B显示了两种KRT在不同醇类型中的动力学测定结果的图示。

[0020] 图10A和10B显示了各种组成的两种包含KRT的传感器对IPA的响应的图示。

[0021] 图11A和11B显示了具有不同附加聚合物和交联剂组成的各种包含KRT的传感器的稳定性响应的图示。

[0022] 图12A显示了包含特定聚合物组成的特定包含KRT的传感器对包含各种乙醇浓度的响应的图示。图12B显示了图12A中测量的乙醇浓度的线性灵敏度响应。ADH对照是指来自信号的醇脱氢酶(ADH);图12A-12B比较了ADH与KRT A15线性度。

[0023] 图13显示了包含特定聚合物组成的特定包含KRT的传感器的稳定性响应的图示。图13比较了ADH和KRT A15烧杯(beaker)的稳定性。

[0024] 图14显示了在两种不同溶剂中具有浸渍膜的特定包含KRT的传感器的稳定性响应的图示。

[0025] 图15显示了具有不同膜组成的各种包含KRT的传感器的稳定性响应的图示。

[0026] 图16显示了具有不同膜和交联剂组成的各种包含KRT的传感器的稳定性响应的图示。

[0027] 详述

[0028] 本公开内容一般性地描述了使用酶来检测体内醇水平的分析物传感器和方法。

[0029] 分析物传感器常用于检测各种分析物,通常使用对特定底物具有特定特异性的酶。例如,葡萄糖响应分析物传感器代表了一个经过充分研究且仍在发展的领域,以帮助糖尿病个体更好地管理他们的健康。然而,其他体内分析物也很重要,并且在确定和/或监测个体健康方面可能具有重要价值,包括确定和/或监测感兴趣的分析物对其他分析物失调的影响。

[0030] 个体的体内醇浓度可基于饮酒量、醇中毒和/或基于各种生理因素而显著变化。例如,个体代谢醇的能力各不相同,因此导致每体重相同饮酒量的个体之间的醇水平不同。实际上,组织中醇的平衡浓度至少取决于含水量、血流速度和组织的质量。醇能够通过生物膜,因此醇能够很容易地从血流中向所有组织和体液流动,并且所述流动与组织和体液的含水量成正比。此外,在极少数情况下,个体可能会在没有任何饮酒的情况下通过消化系统内的内源性发酵产生大量醇。如上所述,某些浓度的醇的存在可能另外影响个体的一种或多种其他分析物的功能,从而进一步影响个体的健康。

[0031] 目前的醇测量是通过采集物理血液样品、尿液样品、唾液样品或使用呼气测试来进行的。然而,这种测量在时间上是静态的,并且在某些情况下,可能会受到假阳性或假阴

性结果的困扰,因此至少偶尔会不准确。不同的是,本公开内容提供了随时间响应于醇以促进健康管理的分析物传感器。如本文所用,术语“醇”及其语法变体是指任何伯醇、仲醇或叔醇。例如,本公开内容的醇传感器可以检测乙醇、甲醇、丁醇、丙醇、异丙醇等,及其任意组合。

[0032] 本文所述的醇传感器响应于体内醇水平并且能够提供所述醇水平的“连续”测量。即,本文所述的醇传感器能够可操作地用于在延长(连续)时间段(例如几秒、几分钟或几小时至几天、几周或几个月)内提供多个醇浓度测量值。

[0033] 醇传感器可以提供许多优点,用于监测与所得生理条件和对其他感兴趣的分析物的影响相关的醇的动态水平。例如,本公开内容的传感器利用专门的酶促反应,包括一种或多种酮还原酶(本文称为“KRT”)。本文所述的包含KRT的感测化学物质有利地克服了与个体中醇水平的典型检测相关的各种障碍,包括如下文更详细讨论的克服由于感测化学物质的一种或多种酶促反应产物引起的酶抑制。通过克服酶抑制,本公开内容的醇传感器尤其可以允许使用单个质量限制膜和制造需要较少复杂感测区域配置而不会影响有效性的更具成本效益的传感器。包含KRT的化学物质进一步有利地乐于接受伯醇和仲醇,包括对仲醇检测的特别出乎意料的亲和力。

[0034] 佩戴本文所述的连续醇传感器的个体可以访问实时醇水平信息以基于该信息做出各种决定,例如驾驶是否安全、他们的葡萄糖或其他分析物水平是否可能基于醇水平而失调并因此需要采取行动等,及其任意组合。此外,本公开内容的醇传感器可用于监测、测试和/或评估遭受醇滥用、酗酒或成瘾的个体的醇水平。这样做时,这些个体的健康可以由个体自己或由健康从业者或执法专业人员监测。与操作本文所述的传感器和感测系统(包括其显示单元或其设备(device))相关联的传感器电子器件和处理算法也可以提供关于醇浓度和基于其的建议行动的指导、指引、推荐和/或输出。合适的处理算法、处理器、存储器、电子组件等可以驻留在任何可信计算机系统、远程终端、云服务器、阅读器设备和/或传感器本身的外壳中。可以在与这些组件中的一个或多个进行电子通信的合适的显示单元或设备上显示指引、推荐、输出等。显示单元或设备可以是专用阅读器设备或个人通信设备,例如移动电话(例如,**iPhone®**或Android设备)。或者,显示单元或设备可以是第三方服务器、云服务器或远程终端,它们与各种软件相关和医疗保健相关的应用程序(例如个人健康监视器)进行通信。合适的远程终端、云服务器等可以进一步将输出中继到相关的辅助设备,例如智能家居设备、可穿戴技术、个人健康监视器等,或其组合。

[0035] 本公开内容进一步描述了包含一个或多个醇传感器的感测系统。该系统可包括各种感测组件,例如处理器和/或其中的编码指令(算法),其适于处理从醇传感器接收到的传感器数据并从中确定一个或多个醇浓度。在一些实施方案中,处理器和/或编码指令然后可以分析醇浓度以确定基于特定醇浓度的一个或多个推荐。例如,醇浓度或可从特定评估时间的醇浓度导出的其他量可用于建议是否可能对另一种健康分析物产生负面影响。在这种情况下,处理器和/或编码指令可以建议其中个体可以基于检测到的醇浓度做出反应的各种方式,包括立即和未来的行动建议。例如,根据个体的特定醇浓度,推荐可为是否驾驶机动车辆,是否执行行动以补偿另一种受影响的分析物(例如,如果分析物是葡萄糖,是否消耗碳水化合物或注射胰岛素)、是否就医等,及其任意组合。

[0036] 在更详细地描述本公开内容的醇传感器之前,将首先提供合适的体内分析物传感

器配置和采用分析物传感器的传感器系统的简要概述,以便可以更好地理解本公开内容的实施方案。应当理解的是,根据本公开内容的各种实施方案,下文描述的任何传感器系统和分析物传感器配置的特征可以是一种或多种用于检测醇并且通常用于检测体内醇的酶。

[0037] 图1显示了可以结合本公开内容的醇传感器的示例性感测系统的图。如图所示,感测系统100包括传感器控制设备102和阅读器设备120,它们被配置为通过本地通信路径或链路相互通信,本地通信路径或链路可以有线的或无线的、单向的或双向的以及加密的或非加密的。根据一些实施方案,阅读器设备120可构成用于查看由传感器104或与其相关联的处理器确定的分析物浓度和警报或通知以及允许一个或多个用户输入的输出介质。阅读器设备120可以是多功能智能手机或专用电子阅读器仪器。虽然仅示出了一个阅读器设备120,但在某些情况下可以存在多个阅读器设备120。阅读器设备120还可以分别通过通信路径/链路141和/或142与远程终端170和/或可信计算机系统180通信,通信路径/链路141和/或142也可以是有线的或无线的、单向的或双向的以及加密的或非加密的。阅读器设备120还可以或替代地通过通信路径/链路151与网络150(例如,移动电话网络、互联网或云服务器)通信。网络150可以进一步通过通信路径/链路152通信耦合至远程终端170和/或经由通信路径/链路153通信耦合至可信计算机系统180。替代地或附加地,传感器104可以直接与远程终端170和/或可信计算机系统180通信,而不存在中间阅读器设备120。例如,根据一些实施方案,如美国专利申请公开2011/0213225中所述并且其全部内容通过引用并入本文,传感器104可以通过到网络150的直接通信链路与远程终端170和/或受信任的计算机系统180通信。

[0038] 任何合适的电子通信协议可用于每个通信路径或链路,例如近场通信(NFC)、射频识别(RFID)、**蓝牙®**或低能耗**蓝牙®**协议、WiFi等。根据一些实施方案,远程终端170和/或可信计算机系统180可由对用户的醇水平感兴趣的除主要用户之外的个体访问。阅读器设备120可以包括显示器122和任选的输入组件121。显示器122可以包括例如用于输出与传感器控制设备相关的信息和由用户输入信息的触摸屏界面。

[0039] 传感器控制设备102包括传感器外壳103,其可以容纳用于操作传感器104的电路和电源。任选地,可以省略电源和/或有源电路。处理器(未示出)可通信耦合至传感器104,其中处理器物理地位于传感器外壳103或阅读器设备120内。根据一些实施方案,传感器104从传感器外壳103的下侧突出并延伸穿过粘合剂层105,粘合剂层105适于将传感器外壳103粘附到组织表面,例如皮肤。

[0040] 传感器104适于至少部分地插入感兴趣的组织中,例如在皮肤的真皮层或皮下层内。传感器104可以包括长度足以插入到给定组织中的期望深度的传感器尾部。传感器尾部可以包括至少一个工作电极和一个或多个位于至少一个工作电极上的活性区域(感测区域/感测点或感测层),它们对于感测醇(或在某些情况下一种或多种附加分析物)是有活性的。在一些实施方案中,活性区域是一个或多个离散点的形式(例如,一个点至约10个点或更多个点),其尺寸范围可以从约 0.01mm^2 至约 1mm^2 ,包括其间的任何值和子集,但是本文还考虑了更大或更小的单独的活性区域点。

[0041] 根据本公开内容的一个或多个实施方案,一个或多个活性区域可包含一种或多种酶以至少促进醇检测。活性区域可以包括聚合材料,在一些实施方案中,一种或多种(或所有)酶化学键合(例如,共价键合、离子键合等)至所述聚合材料或根据一些实施方案以其他

方式固定(例如,未结合在基质中)至所述聚合材料。在一些实施方案中,每个活性区域可以用质量限制或生物相容性膜进行外覆和/或进一步包括电子转移剂以促进至少醇检测。

[0042] 在本公开内容的各种实施方案中,至少可以监测任何感兴趣的生物流体中的醇水平,所述生物流体例如真皮液、间质液、血浆、血液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、支气管肺泡灌洗液、羊水等。在具体实施方案中,本公开内容的分析物传感器可适于测定真皮液或间质液以确定体内醇浓度。

[0043] 继续参考图1,在一些实施方案中,传感器控制单元102可以自动将通过传感器104获得的数据转发到阅读器设备120。例如,醇浓度数据可以自动并且周期性传送,例如在获得数据时以某个频率或在某个时间段已经过去之后,数据被存储在存储器中直到传送(例如,每几秒、每分钟、五分钟或其他预定时间段)。在其他实施方案中,传感器控制单元102可以以非自动方式并且不根据设定的时间表与阅读器设备120通信。例如,当传感器电子设备被带入阅读器设备120的通信范围时,可以使用NFC或RFID技术从传感器控制单元102进行数据通信。在通信到阅读器设备120之前,数据可以保持存储在传感器控制设备102的存储器中。因此,患者不必一直保持与阅读器设备120的紧密接近,而是可以在方便的时间上传数据。在其他实施方案中,可以实现自动和非自动数据传输的组合。例如,数据传输可以在自动基础上继续,直到阅读器设备120不再处于传感器控制单元102的通信范围内。虽然已经参考阅读器设备120描述了来自传感器控制单元102的自动和非自动数据传输,这样的传输机制同样适用于远程终端170和/或可信计算机系统180,而不背离本公开内容的范围。

[0044] 导引器可以短暂存在以促进将传感器104引入组织中。在示例性实施方案中,导引器可以包括针或类似的锐器。应当认识到的是,其他类型的导引器,例如护套或刀片,可以存在于替代实施方案中。更具体地,在组织插入之前,针或其他导引器可以短暂驻留在传感器104附近或与传感器104同时存在,然后随后被撤回。当存在时,针或其他导引器可通过打开供传感器104遵循的进入路径来促进传感器104插入组织中。例如,根据一个或多个实施方案,作为进入真皮的路径,针可以促进表皮的穿透,以允许发生传感器104的植入。在打开进入路径后,针或其他导引器可能会被撤回,这样就不会造成锐器危险。在示例性实施方案中,合适的针的横截面可以是实心的或空心的、斜面的或非斜面的、和/或圆形的或非圆形的。在更具体的实施方案中,合适的针在横截面直径和/或尖端设计上可以与针灸针相当,针灸针可以具有约150微米至约300微米(例如,约250微米)的横截面直径。然而,应当认识到的是,如果特定应用需要,合适的针可以具有更大或更小的横截面直径。

[0045] 在一些实施方案中,针或导引器的尖端(当存在时)可以在传感器104的末端上成角度,使得针或导引器首先穿透组织并打开用于传感器104的进入路径。在其他示例性实施方案中,传感器104可驻留在针或插入器的腔或凹槽内,其中针类似地打开用于传感器104的进入路径。在任一情况下,在促进传感器插入之后针随后被撤回。

[0046] 本文公开的醇传感器可以具有位于单个工作电极上(例如,位于单个工作电极的一侧或两侧上)或两个或更多个分开的工作电极上(例如,位于两个或更多个分开的工作电极的一侧或两侧上)的活性区域。根据本公开内容的各种实施方案并且如本文进一步描述的,单个工作电极传感器配置可以采用双电极或三电极检测图案。下文参考图2A-2C描述了以单个工作电极为特征的传感器配置。根据本公开内容的各种实施方案,这些传感器配置中的每一个都可以适当地结合一个或多个醇响应活性区域。下文参考图3和4描述以多个工

作电极为特征的传感器配置。当存在多个工作电极时,一个或多个醇响应活性区域、多个工作电极中的一个或多个(或全部)或工作电极之一可用于在检测醇水平同时检测另一种感兴趣的分析物。

[0047] 当本公开内容的醇传感器中存在单个工作电极时,三电极检测图案可以包括一个工作电极、一个对电极和一个参比电极。相关的双电极检测图案可以包括一个工作电极和一个第二电极,其中第二电极用作对电极或参比电极之一,或同时用作对电极和参比电极(即对电极/参比电极)。在双电极和三电极检测图案中,醇传感器的一个或多个活性区域可以与工作电极接触。一个或多个活性区域可以包含根据本公开内容的实施方案的一种或多种酶。在一些实施方案中,各种电极可以至少部分地堆叠(分层)在彼此之上。在一些或其他实施方案中,各种电极可以在传感器尾部上彼此横向间隔开。类似地,每个电极上的相关活性区域可以垂直堆叠在彼此之上或横向间隔开。在任一情况下,各种电极可以通过介电材料或类似的绝缘体彼此电绝缘。

[0048] 图2A显示了兼容用于根据本公开内容的实施方案检测醇的具有单个工作电极的示例性双电极传感器配置的图。如图所示,传感器200包括设置在工作电极214和对电极/参比电极216之间的基板212。或者,工作电极214和对电极/参比电极216可以位于基板212的同一侧,介电材料插入其间(配置未显示)。活性区域218作为至少一层设置在工作电极214的至少一部分上。在各种实施方案中,活性区域218可以包括被配置用于检测一种或多种感兴趣的分析物的多个点或单个点。总的来说,一种或多种酶可以存在于活性区域218中(即,在单个点或多个点中)。

[0049] 仍然参考图2A,根据一些实施方案,膜220覆盖至少活性区域218并且可以任选地覆盖工作电极214和/或对电极/参比电极216的一些或全部,或整个分析物传感器200。分析物传感器200的一个或两个面可以覆盖有膜220。膜220可以包括一种或多种聚合物膜材料,该聚合物膜材料具有将分析物通量限制到活性区域218的能力和/或生物相容性能力。传感器200可用于通过库仑法、电流法、伏安法、电位电化学法或离子电渗法(包括反向离子电渗法)检测技术中的任何一种来测定至少醇。

[0050] 图2B和2C显示了兼容用于本公开内容的实施方案中的具有单个工作电极的示例性三电极分析物传感器配置的图。除了包括附加电极(在传感器201和202中表示为电极217(图2B和2C))外,采用单个工作电极的三电极分析物传感器配置可以类似于图2A中传感器200所示的配置。使用附加电极217,对电极/参比电极216然后可以用作对电极或参比电极,并且附加电极217实现未进行其他考虑的另一电极功能。工作电极214继续履行其原始功能。附加电极217可以设置在工作电极214或电极216上,其间具有介电材料的分隔层。例如,如图2B所示,介电层219a、219b和219c将电极214、216和217彼此分开以提供电绝缘。或者,如图2C所示,电极214、216和217中的至少一个可以位于基板212的相对面上。因此,在一些实施方案中,电极214(工作电极)和电极216(对电极)可以位于基板212的相对面上,其中电极217(参比电极)位于电极214或216之一上并与其以介电材料间隔开。或者,在一些实施方案中,电极214(工作电极)和电极216(参比电极)可以位于基板212的相对面上,其中电极217(对电极)位于电极214或216之一上并与其以介电材料间隔开。在又一些实施方案中,参比电极和对电极可以位于基板212的一个面上,而工作电极位于相对面上。任选地,参比材料层230(例如,Ag/AgCl)可以存在于电极217上,其中参比材料层230的位置不限于图2B和

2C中所描绘的位置。

[0051] 与图2A中所示的传感器200一样,分析物传感器201和202中的活性区域218可以包括被配置用于检测至少醇的多个点或单个点。总的来说,一种或多种酶可存在于传感器201和202的活性区域218中。另外,分析物传感器201和202可用于通过库仑法、安培法、伏安法、电位电化学法或离子电渗法检测技术中的任何一种来分析至少醇。

[0052] 继续参考图2A和2B,并且与传感器200一样,膜220也可以覆盖传感器201和202中的活性区域218以及其他传感器组件。在一些实施方案中,附加电极217可以覆盖有膜220。尽管图2B和2C已将所有电极214、216和217描绘为覆盖有膜220,但应理解的是在一些实施方案中仅工作电极214可被覆盖或在另一些实施方案中仅工作电极214和另一个电极可被覆盖。此外,在电极214、216和/或217中的每个电极处的膜220的厚度可以相同或不同,以及电极214、216和/或217中的每个电极的膜220覆盖的表面积的量可以相同或不同。如在双电极分析物传感器配置(图2A)中,分析物传感器201和202的一个或两个面可以在图2B和2C的传感器配置中覆盖有膜220或者整个分析物传感器201和202可被覆盖。因此,图2B和2C中所示的三电极传感器配置应被理解为对本文所公开的实施方案是非限制性,替代的电极和/或层配置保留在本公开内容的范围内。

[0053] 图3显示了兼容用于本公开内容中描述的醇传感器的具有两个工作电极、一个参比电极和一个对电极的示例性分析物传感器配置的示意图。如图3所示,传感器300包括设置在基板302的相对面上的工作电极304和306。活性区域310设置在工作电极304的表面上,并且活性区域312设置在工作电极306的表面上。总的来说,一个或多个酶可以存在于被配置用于至少检测醇的活性区域310和312中。例如,活性区域310和312都可以被配置为检测醇浓度。或者,活性区域310或312中的一个可以被配置为检测醇浓度,而另一个活性区域被配置为检测另一种感兴趣的分析物(例如,葡萄糖、乳酸等)。对电极320通过介电层322与工作电极304电绝缘,而参比电极321通过介电层323与工作电极306电绝缘。外介电层330和332分别位于参比电极321和对电极320上。根据各种实施方案,膜340可以覆盖至少活性区域310和312。分析物传感器300的其他组件也可覆盖有膜340,并且如上所述,分析物传感器300的一个或两个面或其一部分可覆盖有膜340。与分析物传感器200、201和202一样,传感器300可用于通过库仑法、电流法、伏安法、电位电化学法或离子电渗法检测技术中的任何一种来测定至少醇。

[0054] 具有多个工作电极并且不同于图3所示的替代传感器配置的特征可以具有不是分开的对电极和参比电极320和321的对电极/参比电极,和/或不同于明确描绘的那些的特征层和/或膜布置。例如,对电极320和参比电极321的定位可与图3中描绘的相反。此外,工作电极304和306不必以图3所示的方式驻留在基板302的相对面上。

[0055] 尽管以上与图2和3有关的描述主要针对具有两个工作电极的分析物传感器配置,但是应当理解的是,通过本文的公开内容的扩展可以成功地包含多于两个工作电极。附加工作电极可以允许将附加活性区域和相应的感测能力赋予具有这样的特征的这样的传感器。

[0056] 此外,尽管图2和3示出了具有导电结构(例如,电极)和设置在其上的活性区域的平面基板(例如,相对平坦的),但是应当理解的是,用于本公开内容的实施方案中的分析物传感器可以具有各种其他配置,而不脱离本公开内容的范围。例如,基板可以是基本上非平

面的(例如,相对弯曲的、半球形的或球形的)、圆柱形的、螺旋形的、其他形状不规则的,及其任意组合。类似地,两个或更多个电极可以是基本上非平面的(例如,相对弯曲的、半球形的或球形的)、圆柱形的、螺旋形的、其他形状不规则的,及其任意组合。电极可以分层、同心或以其他方式布置,并且通常由一个或多个绝缘区域绝缘。设置在至少一个工作电极上的感测区域可以进一步覆盖工作电极的至少一部分(或全部)作为单层或作为各种形状的离散区域,例如正方形、圆形、半圆形、弓形、矩形、多边形或其他不规则的形状。

[0057] 根据本公开内容的各种实施方案,电子转移剂可以存在于本文公开的任何醇传感器或醇传感器配置的一个或多个活性区域中。当醇分析物(酶底物)经历氧化还原反应时,合适的电子转移剂可以促进电子向工作电极的传输。每个活性区域内电子转移剂的选择可能决定了观察到的醇分析物的氧化还原电位。

[0058] 合适的电子转移剂可以包括具有高于或低于标准甘汞电极(SCE)的氧化还原电位几百毫伏的氧化还原电位的可电还原和可电氧化的离子、络合物或分子(例如醌)。根据一些实施方案,合适的电子转移剂可以包括低电位钼络合物,例如美国专利6,134,461和6,605,200中描述的那些,其全部内容通过引用并入本文。其他实例包括美国专利6,736,957、7,501,053和7,754,093中描述的那些;其中每一篇的公开内容其全部内容通过引用并入本文。其他合适的电子转移剂可包括例如钌、钼、铁(例如聚乙烯二茂铁或六氰基铁酸盐)、钴、其茂金属化合物等的金属化合物或络合物。用于金属络合物的合适配体还可以包括例如二齿或更高齿数的配体,例如联吡啶、联咪唑、菲咯啉或吡啶基(咪唑)。其他合适的二齿配体可包括例如氨基酸、草酸、乙酰丙酮、二氨基烷烃或邻二氨基芳烃。单齿、二齿、三齿、四齿或更高齿数的配体的任何组合都可以存在于金属络合物中以实现完整的配位球。在一些实施方案中,用于本文所述的醇响应活性区域的选定电子转移剂是钼络合物。

[0059] 根据本公开内容的各种实施方案,一种或多种聚合物可以存在于本文公开的任何醇传感器或醇传感器配置的一个或多个活性区域的每一个中。例如,酶可以各自化学键合或以其他方式固定在单一聚合物中。在其他实施方案中,例如当使用多种酶时,一种或多种酶可聚合成第一聚合物并且一种或多种其他酶聚合成第二聚合物,聚合物和酶均形成醇传感器的活性区域。

[0060] 包含在活性区域中的合适聚合物可以包括但不限于聚乙烯基吡啶(例如,聚(4-乙烯基吡啶))、聚乙烯基咪唑(例如,聚(1-乙烯基咪唑))、它们的任何共聚物,及其任意组合。例如,可适合包含在活性区域中的示例性共聚物包括那些含有单体单元例如苯乙烯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺或丙烯腈的共聚物。当存在多个活性区域时,每个活性区域内的一种或多种聚合物可以相同或不同。在不脱离本公开内容的范围的情况下,也可以使用上述聚合物的任何组合。

[0061] 根据本公开内容的各种实施方案,电子转移剂可以与一个或多个活性区域中的一种或多种聚合物共价键合。共价键合的方式不认为受到特别限制。电子转移剂与一种或多种聚合物的共价键合可以通过聚合带有共价结合的电子转移剂的单体单元来发生,或者电子转移剂可以在其已经合成之后分别与一种或多种聚合物反应。根据一些实施方案,双官能团间隔物可将电子转移剂共价键合至活性区域内的一种或多种聚合物,其中第一官能团与一种或多种聚合物反应(例如,能够季铵化吡啶氮原子或咪唑氮原子的官能团)并且第二官能团与电子转移剂反应(例如,与配位金属离子的配体反应的官能团)。

[0062] 在示例性实施方案中,本文公开的醇传感器的活性区域内的一种或多种聚合物可以是聚(4-乙烯基吡啶),其中一部分单体单元被烷基羧酸酯侧链官能化,一部分单体单元与具有氨基间隔基团的钅电子转移剂相连,而一部分单体单元未被官能化。即,聚合物可以是钅修饰的聚(乙烯基吡啶)基聚合物的氧化还原聚合物,本文称为“X7”。

[0063] 类似地,根据本公开内容的一些或其他各种实施方案,一个或多个活性区域内的一种或多种酶可以共价键合至一种或多种聚合物。当多种酶存在于单个活性区域中时,所有多种酶可以共价键合至单个聚合物或两种或更多种分开的聚合物,它们可以相同或不同。例如,如果两种或更多种酶共价键合至分开的不同聚合物上,则可以将其中一种聚合物包被在另一种上以形成活性区域。在其他实施方案中,多种酶中只有一部分可以与一种或多种聚合物共价键合。例如,第一酶可以与第一聚合物共价键合,第二酶可以与第一聚合物或第二聚合物非共价缔合。

[0064] 酶与聚合物的共价键合可以通过引入合适的交联剂的交联剂发生。用于与酶中的游离氨基基团反应的合适的交联剂可以包括这样的交联剂,例如聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDGE)或其他聚环氧化物、氰尿酸氯、N-羧基琥珀酰亚胺、酰亚胺酯、表氯醇或其衍生变体。用于与酶中的游离羧酸基团反应的合适的交联剂可以包括例如碳二亚胺。交联通常是分子间的,但在一些实施方案中可以是分子内的。

[0065] 如上所述,电子转移剂和/或一种或多种酶也可以通过共价键合以外的方式与活性区域中的一种或多种聚合物缔合。在一些实施方案中,电子转移剂和/或一种或多种酶可以与一种或多种聚合物离子或配位缔合。例如,带电聚合物可以与带相反电荷的电子转移剂或酶离子缔合。在其他实施方案中,电子转移剂和/或一种或多种酶可以物理地夹带在一种或多种聚合物内而不与其键合。

[0066] 在一些实施方案中,可以将稳定剂结合至本文所述的醇传感器的活性区域中以改进传感器的功能性并实现所需的灵敏度和稳定性。例如,这样的稳定剂可以包括抗氧化剂和/或伴侣蛋白以稳定一种或多种酶。合适的稳定剂的实例可以包括但不限于血清白蛋白(例如,人或牛血清白蛋白或其他相容的白蛋白)、戊二醛交联的白蛋白、过氧化氢酶、戊二醛交联的过氧化氢酶、其他酶抗氧化剂等,及其任意组合。稳定剂可以是缀合的或非缀合的,并且可以化学结合或未结合至活性区域。稳定剂的量可以根据所选择的稳定剂的类型而变化,但可以是总活性区域的重量(即活性区域的组合组分的重量)的约1%至约50%,包括其间的任何值和子集,例如按总活性区域的重量计约1%至约25%,或约10%至约25%的量。

[0067] 在某些实施方案中,质量限制膜或生物相容性膜可以设置在活性区域的至少一部分上。合适的膜可由含有杂环氮基团的交联聚合物组成,例如聚乙烯基吡啶和/或聚乙烯基咪唑的聚合物。实施方案还包括由聚氨酯、聚醚氨基甲酸酯或化学相关材料制成的膜、由聚硅氧烷制成的膜等。

[0068] 在一些实施方案中,膜可以通过原位交联聚合物,包括上面讨论的那些聚合物,用两性离子部分、非吡啶共聚物组分和任选地亲水或疏水的另一部分改性的聚合物来形成,和/或在缓冲溶液(例如,醇缓冲溶液或其他生物缓冲溶液,例如HEPES)中具有其他所需特性。改性聚合物可以由含有杂环氮基团的前体聚合物制成。例如,前体聚合物可以是聚乙烯基吡啶和/或聚乙烯基咪唑。任选地,亲水或疏水改性剂可用于“微调”所得膜对醇或甚至特

定类型的感兴趣的醇的渗透性。任选的亲水改性剂,例如聚(乙二醇)、羟基或多羟基改性剂等,及其任意组合,可用于增强所得膜的生物相容性。

[0069] 可以通过将膜溶液的一个液滴或多个液滴放置在醇传感器的至少一个或多个工作电极上,例如通过将传感器尾部浸入膜溶液中、通过将膜溶液喷在传感器尾部、通过热压或熔化任何尺寸层(例如离散或全包围)的膜、膜溶液的气相沉积、膜溶液的粉末涂层等,及其任意组合,将膜施加在活性区域上。

[0070] 一般而言,由膜溶液的浓度、施加的膜溶液的液滴数量、传感器尾部浸入膜溶液的次數、膜溶液喷在传感器尾部的体积等,以及这些因素的任意组合,控制膜的厚度。在一些实施方案中,本文所述的膜可具有范围从约0.1微米(μm)至约1000 μm 的厚度,包括其间的任何值和子集,例如从约1 μm 至约500 μm ,或约10 μm 至约100 μm 。如上所述,膜可覆盖一个或多个活性区域,并且在一些实施方案中,活性区域可具有约0.1 μm 至约10 μm 的厚度,包括其间的任何值和子集。此外,活性区域的尺寸范围可以从约0.001 mm^2 至约1 mm^2 ,包括其间的任何值和子集。然而,应当理解的是,本文还考虑了更厚或更薄的膜,更厚和更薄的活性区域,以及更大或更小的活性区域。

[0071] 在一些实施方案中,膜可包含化合物,所述化合物包括但不限于聚(苯乙烯-共-马来酸酐)、十二烷胺和聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)(2-氨基丙基醚)与聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)双(2-氨基丙基醚)交联;聚(N-异丙基丙烯酰胺);聚(环氧乙烷)和聚(环氧丙烷)的共聚物;聚乙烯基吡啶;聚乙烯基吡啶的衍生物;聚乙烯基咪唑;聚乙烯基咪唑的衍生物;等等;及其任意组合。在一些实施方案中,膜可以由聚乙烯基吡啶-共聚苯乙烯聚合物组成,其中一部分吡啶氮原子被非交联聚(乙二醇)尾官能化并且一部分吡啶氮原子被烷基磺酸基团官能化。单独或与任何上述膜化合物组合,其他膜化合物可包含4-乙烯基吡啶和苯乙烯以及不含胺的聚醚臂的合适共聚物。在不脱离本公开内容的范围的情况下,也可以使用上述膜聚合物的任何组合。

[0072] 本文所述的膜化合物可以进一步与一种或多种交联剂交联,包括以上关于酶列出的那些交联剂。例如,合适的交联剂可以包括但不限于聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDGE)、甘油三缩水甘油醚(Gly3)、聚二甲基硅氧烷二缩水甘油醚(PDMS-DGE)或其他聚环氧化物、氰尿酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺、酰亚胺酯、表氯醇或其衍生变体,及其任意组合。具有类似末端化学物质(terminal chemistry)的支化形式也适用于本公开内容。例如,在一些实施方案中,式1可以与三缩水甘油基甘油醚和/或PEDGE和/或聚二甲基硅氧烷二缩水甘油醚(PDMS-DGE)交联。

[0073] 在一些实施方案中,用作本公开内容的传质限制层的膜组合物可包含聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚二甲基硅氧烷二缩水甘油醚(PDMS-DGE)、氨基丙基封端的聚二甲基硅氧烷等,及其任意组合,其用作流平剂(例如,用于降低膜组合物或传感元件组合物的接触角)。具有类似末端化学物质的支化形式也适用于本公开内容。可以另外包括某些流平剂,例如在美国专利No.8,983,568中见到的那些流平剂,该专利的公开内容的全部内容通过引用并入本文。

[0074] 在一些情况下,膜可以与活性区域的一种或多种元件形成一种或多种键。如本文所用,术语“键”及其语法变体是指原子或分子之间允许化学化合物彼此形成缔合的任何类型的相互作用,例如但不限于共价键、离子键、偶极-偶极相互作用、氢键、伦敦色散力等,及

其任意组合。例如,膜的原位聚合可以在膜的一种或多种聚合物与活性区域中的一种或多种聚合物之间形成交联。在一些实施方案中,膜与活性区域的交联有助于减少膜与传感器发生分层。

[0075] 如前所述,本公开内容提供了用于检测个体体液中的至少一种醇(例如,醇浓度或水平)的各种方法、系统和装置。检测可以是体外或体内利用本文所述的活性区域感测化学物质来克服制造所需醇传感器中的一个或多个障碍。

[0076] 可以使用一种或多种酶,例如醇氧化酶来检测醇。作为一个代表性的例子,醇氧化酶与醇(一般是伯醇)相互作用形成乙醛(C_2H_4O)和过氧化氢(H_2O_2)。其他伯醇和仲醇反应形成具有相应更高或更低碳含量的醛。醇氧化酶仅催化醇正向转化为乙醛并包含强结合的黄素辅因子。因此,理论上,醇氧化酶可用于分析物传感器中,用于通过测定在酶促反应中产生的乙醛或过氧化氢产物来检测醇。然而,这种方法存在两个问题。第一,乙醛和过氧化氢都对醇氧化酶有抑制作用。因此,如果这些化合物没有从传感器环境中清除,则醇氧化酶对于促进醇氧化变得无活性,从而使传感器无法用于测定醇。此外,如果乙醛和过氧化氢被隔离或与其他试剂发生猝灭(进一步使活性区域的感测组合物复杂化),则不再有物质或足够的物质可用于电化学检测。第二,醇氧化酶不与除分子氧外的氧化还原介质自由交换电子。因此,与传感器活性区域中的聚合物缔合的电子转移剂(例如本文讨论的钨和其他过渡金属络合物)对于将醇氧化酶从无活性的还原态循环到可与醇反应的氧化态是无效的。

[0077] 醇脱氢酶是另一组促进醇(一般是伯醇)转化为醛或酮的酶。作为一个代表性的例子,在氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)存在下,醇脱氢酶与乙醇相互作用形成乙醛(C_2H_4O)和还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸($NADH$)。其他伯醇和仲醇反应形成具有相应更高或更低碳含量的醛。与醇氧化酶不同,醇脱氢酶不仅催化醇正向转化为醛(本文中一般称为乙醛,但是可能产生具有更高或更低碳含量的其他醛),而且还可逆地进行反应。进一步不同于醇氧化酶,醇脱氢酶不包含结合的辅因子,因此需要外源辅因子来使酶具有活性以促进醇氧化。此外,至少部分地基于 $NADH$ 和乙醛的产物抑制作用来控制醇脱氢酶的活性(参见图4)。这些特性通常使醇脱氢酶不适合用于设计醇传感器的感测化学物质。

[0078] 本公开内容的实施方案利用氧化还原酶方案来使用本公开内容的一个或多个分析物传感器实施方案来检测醇水平。更具体地,本公开内容中描述的感测化学物质利用两种酶在工作电极上的至少一个活性区域中协同相互作用,其中一种酶是KRT。如本文所用,术语“协同酶”或“协同酶系统”及其语法变体是指至少两种彼此能够协同(联合)相互作用的酶。KRT是一种具有 $NADH$ 依赖性或 $NAD(P)H$ 依赖性催化活性的氧化还原酶,主要已知能够还原醛和酮。通常,KRT作为醇脱氢酶的效率相对较低,因为它们缺乏金属辅因子,这些辅因子用于通过醇脱氢酶来保持和定位醇基。KRT通常更倾向于 $NAD(P)H$ 而不是 $NADH$ 。因此,它们在检测个体醇水平方面的有效用途被认为是不利的。

[0079] 本公开内容的实施方案提供了适用于检测醇的协同酶系统,其中协同酶系统利用KRT。描述用于在本公开内容的感测化学物质中用于检测醇的KRT包括野生型(天然存在的)和表现出KRT功能的非天然工程改造的肽链。例如,醛KRT(aldo-KRT)家族可以适用于本公开内容的实施方案。不受理论束缚,进一步认为KRT活性位点中一个或多个残基的变化可改变其反应机制,从而改变其对检测醇的亲合力。换言之,与其他KRT相比,具体取决于它们的化学成分,某些KRT在醇检测方面可能更有效。

[0080] 更具体地,本文所述的协同酶系统利用KRT和心肌黄酶。在本公开内容的传感器配置中,KRT可以将醇和氧化的 NAD^+ 或氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD(P)^+)分别转化为醛(例如乙醛)和还原的NADH或还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD(P)H)。醛用作指示存在醇的代表性分子。NADH或 NAD(P)H 可在心肌黄酶介导下发生还原,其中在此过程中转移的电子为在一个或多个工作电极上醇检测提供了基础。

[0081] 在图4A中显示了用于醇检测的由 NAD^+ 辅因子介导的KRT和心肌黄酶之间的协同反应;在图4B中显示了用于醇检测的由 NAD(P)^+ 辅因子介导的KRT和心肌黄酶之间的协同反应。在图4A和4B中,心肌黄酶化学键合(例如共价地)至设置在工作电极(即,在醇传感器的活性区域中的工作电极)上的聚合物,并且KRT化学键合(例如,共价地)至同一聚合物(例如,通过交联剂)或分开的聚合物。例如,在一个实施方案中,心肌黄酶可以化学结合至布置在工作电极上的第一聚合物,并且KRT可以化学结合至设置在第一聚合物上的第二聚合物。膜设置在活性区域上,并且特定的辅因子(例如, NAD^+ 或 NAD(P)^+)可以与活性区域中的聚合物非共价缔合,但是在其他情况下膜受限。除了心肌黄酶和/或KRT之外,能够与酶交换电子的钌络合物或其他过渡金属络合物也化学(例如,共价地)键合至设置在工作电极上的聚合物上。例如,如上文所述,X7包含共价结合的聚合物和电子转移剂。在一些实施方案中,活性区域包含X7聚合物,心肌黄酶和KRT化学结合至X7聚合物上,并且心肌黄酶和KRT覆盖有膜。

[0082] KRT和心肌黄酶中的每一种可以以总活性区域的重量(即活性区域的组合组分的重量)的约1%至约50%,包括其间的任何值和子集,例如按总活性区域的重量计约1%至约40%,或约10%至约40%的量存在。

[0083] 如可以从图4A和4B中理解的那样,酶促形成的醛(例如乙醛)的量与醇的量成比例。因此,在醇的KRT氧化期间在工作电极处产生的电流可与存在的乙醛的量成比例,并且通过扩展,与存在的醇的量(即,醇浓度或水平)成比例。工作电极电流与醇浓度可以通过参考已知醇浓度下的电流查找表或通过使用校准曲线来发生关联。

[0084] 因此,在一些实施方案中,本公开内容提供基于酮还原酶和心肌黄酶的协同酶系统的醇响应活性区域。更具体地,本公开内容提供了分析物传感器和系统,其包括传感器尾部,该传感器尾部包括至少一个工作电极和设置在工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,醇响应活性区域包含酶系统,所述酶系统包含能够协同作用以促进醇检测的至少两种酶,其中所述至少两种酶中的一种是酮还原酶。膜可以进一步覆盖至少一个醇响应活性区域。此外,至少分析物传感器的传感器尾部可以被配置为至少部分地插入组织中,例如皮肤、皮下或静脉内,从而可以在体内进行分析。在其他实施方案中,分析物传感器(包括传感器尾部)可以完全植入组织内。因此,本公开内容提供了使用上述分析物传感器感测醇的方法。具体而言,至少一个醇响应活性区域暴露于体液,并且在用户佩戴分析物传感器的持续时间(例如,一天或更长时间,例如最多约一个月或更长时间)期间,活性区域可连续测定醇。可以从与醇浓度成比例的分析物传感器的醇响应活性区域检测信号(例如,通过电化学检测)。

[0085] 本文公开的实施方案包括:

[0086] 实施方案A:一种分析物传感器,其包含:传感器尾部,其包含至少一个工作电极;和设置在工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,至少一个醇响应活性区域包含酶系

统,所述酶系统包含能够协同作用以促进醇检测的至少第一酶和第二酶,其中第一酶是酮还原酶。

[0087] 实施方案B:一种方法,其包括:使用分析物传感器检测与醇浓度成比例的信号,该分析物传感器包含:传感器尾部,其包含至少一个工作电极,所述传感器尾部配置用于植入组织中;和设置在工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,至少一个醇响应活性区域包含酶系统,所述酶系统包含能够协同作用以促进醇检测的至少第一酶和第二酶,其中第一酶是酮还原酶。

[0088] 实施方案C:一种电极组件,其包含:至少一个工作电极;和设置在工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,至少一个醇响应活性区域包含酶系统,所述酶系统包含能够协同作用以促进醇检测的至少第一酶和第二酶,其中第一酶是酮还原酶。

[0089] 实施方案D:一种醇感测组合物,其包含:包含酶系统的至少一个醇响应活性区域,所述酶系统包含能够协同作用以促进醇检测的至少第一酶和第二酶,其中第一酶是酮还原酶。

[0090] 实施方案E:一种系统,其包含:分析物传感器,其包含:传感器尾部,其包含至少一个工作电极;和设置在工作电极表面上的至少一个醇响应活性区域,至少一个醇响应活性区域包含酶系统,所述酶系统包含能够协同作用以促进醇检测的至少第一酶和第二酶,其中第一酶是酮还原酶;和接收器,其被配置为从分析物传感器接收与醇浓度成比例的信号。

[0091] 实施方案A、B、C、D和E中的每一个实施方案可以具有以下任意组合的一个或多个附加元素:

[0092] 元素1:其中第二酶是心肌黄酶。

[0093] 元素2:其中酮还原酶是醛酮还原酶(aldo-ketoreductase)。

[0094] 元素3:其中酮还原酶是由**Codexis®**制造的KRED-P1-A04、KRED-P2-C11、KRED-P2-G03或KRED-P2-H07。

[0095] 元素4:其中在至少一个醇响应活性区域上设置膜。

[0096] 元素5:其中在至少一个醇响应活性区域上设置膜,并且膜是聚乙烯基吡啶、聚乙烯基咪唑(polyvinylimidazone)或其任何共聚物中的一种。

[0097] 元素6:其中至少一个醇响应活性区域包含聚合物。

[0098] 元素7:其中至少一个醇响应活性区域包含聚合物,并且第一酶的酮还原酶和第二酶与聚合物化学结合。

[0099] 元素8:其中至少一个醇响应活性区域包含电子转移剂。

[0100] 元素9:其中至少一个醇响应活性区域包含稳定剂。

[0101] 作为非限制性示例,适用于A、B、C、D和E的示例性组合包括:

[0102] 元素1和2;1和3;1和4;1和5;1和6;1和7;1和8;2和3;2和4;2和5;2和6;2和7;2和8;3和4;3和5;3和6;3和7;3和8;4和5;4和6;4和7;4和8;5和6;5和7;5和8;6和7;6和8;7和8;以及1、2、3、4、5、6、7和8中的一种、多于一种或全部的任何非限制性组合。

[0103] 为了便于更好地理解本文描述的实施方案,包括如上所述的醇传感器的优点以及与其他醇检测化学物质相比的优点,给出了各种代表性实施方案的以下实施例。绝不应将以下实施例理解为限制或定义本发明的范围。

[0104] 实施例1:实施例1使用双层活性区域系统评估了包含KRT的醇传感器的功能。实施

例1用于筛选用于醇传感器的24种候选KRT。

[0105] 醇传感器制备。使用双层活性区域系统制备了包含各种实验性KRT的醇响应活性区域。将活性区域包被到碳工作电极(要注意,根据本公开内容的实施方案可以使用其他电极表面类型)上,其中第一层组合物(下表1)最初直接包被在碳工作电极上,而第二层组合物(下表2)包被在第一层组合物上,第一层和第二层包含活性区域。在第一层组合物沉积之后,第一层组合物在室温(RT)(约25°C)下固化过夜;在第一层组合物固化后,沉积第二层组合物并使其在RT下固化过夜。此后,使用由40:1聚乙烯基吡啶-共-聚苯乙烯(15)(即具有15%苯乙烯)和PEGDGE 400配制的包被溶液将PVP膜施加到工作电极上。膜沉积在活性区域(3x5 mm/第二浸渍(second dipping))并使其在RT下固化过夜,然后在干燥的小瓶中在56°C下固化48小时。应理解的是,表1和表2的组分可以在有或没有表2中的额外交联剂(PEGDGE 400)的情况下以单层的形式施加(即所有组分的混合物),而不偏离本公开内容的范围。本实施例中使用的分层活性区域是为了便于测试和比较大量KRT传感器样品。

[0106] 表1

[0107]	实施例 1 pH = 5.5 的 10 mM MES 缓冲液中的第一活性区域层组合物	
	组分	浓度(mg/mL)
	心肌黄酶	10
	白蛋白	10
	X7 聚合物	10
	PEGDGE 400	5

[0108] 表2

[0109]	实例 2 pH = 5.5 的 10 mM MES 缓冲液中的第二活性区域层组合物	
	组分	浓度(mg/mL)
	KRT	28
	白蛋白	8
	NAD ⁺ 或 NADP ⁺	8
	PEGDGE 400	4

[0110] 使用从总部位于Redwood City,CA的**Codexis®**获得的KRT,使用如上文实施例1中提供的方法制备各种传感器。表3提供了测试的24种KRT中每一种的**Codexis®**酶代码(“**Codexis®**Ref.”),以及它们各自的辅因子(NAD⁺或NADP⁺),并在下文中标识为样品A1-A24(“ID”)。

[0111] 表3

[0112]

ID	Codexis® Ref.	辅因子	ID	Codexis® Ref.	辅因子
A1	KRED-P1-A04	NAD(P) ⁺	A13	KRED-P2-D11	NAD(P) ⁺
A2	KRED-P1-A12	NAD(P) ⁺	A14	KRED-P2-D12	NAD(P) ⁺
A3	KRED-P1-B02	NAD(P) ⁺	A15	KRED-P2-G03	NAD(P) ⁺
A4	KRED-P1-B05	NAD(P) ⁺	A16	KRED-P2-H07	NAD(P) ⁺
A5	KRED-P1-B10	NAD(P) ⁺	A17	KRED-P3-B03	NAD(P) ⁺
A6	KRED-P1-B12	NAD(P) ⁺	A18	KRED-P3-G09	NAD(P) ⁺
A7	KRED-P1-C01	NAD(P) ⁺	A19	KRED-P3-H12	NAD(P) ⁺
A8	KRED-P1-H08	NAD(P) ⁺	A20	KRED-101	NAD(P) ⁺
A9	KRED-P2-B02	NAD(P) ⁺	A21	KRED-119	NAD(P) ⁺
A10	KRED-P2-C02	NAD(P) ⁺	A22	KRED-130	NAD(P) ⁺
A11	KRED-P2-C11	NAD(P) ⁺	A23	KRED-NADH-101	NAD ⁺
A12	KRED-P2-D03	NAD(P) ⁺	A24	DRED-NADH-110	NAD ⁺

[0113] A1-A24传感器的烧杯校准。通过将电极浸入33°C的100mM PBS缓冲溶液和不同浓度的乙醇(2、4、6、10、15、20、30和40mM乙醇)对根据实施例1制备的包含A1-A24 KRT的传感器进行醇感测分析。图5A-5D显示了A1-A24中的每一个的响应。如图所示,各种KRT传感器对乙醇没有响应、只有最低限度的响应或不一致的响应。图5E是在4mM乙醇的烧杯校准的静态视图,显示了电流响应从基线(没有EtOH暴露)到4mM乙醇的变化(Δ)。如图所示,在4mM乙醇,使用KRT ID A1、A11、A15和A16制备的传感器响应中的 Δ 表现出对乙醇的显著响应,这也反映在图5A-5C中的各种其他乙醇浓度,因此可能是用于醇感测的候选KRT。因此,进一步评估了KRT ID A1、A11、A15和A16。

[0114] 实施例2:实施例2评估了包含KRT ID A1、A11、A15和A16的醇传感器相比于对照醇脱氢酶活性区域系统的功能。

[0115] 醇传感器制备。使用单层活性区域系统制备实验性A1、A11、A15和A16 KRT醇响应活性区域,并与包含ADH的对照传感器进行比较。ADH从总部位于St.Louis, MO的Sigma-Aldrich Corp.获得,产品编号为A3263。ADC对照使用NAD⁺辅因子。活性区域以单层组合物的形式包被在碳工作电极上(下表4)。在活性区域沉积后,活性区域在RT下固化过夜。此后,使用包含4mL 100mg/mL聚乙烯基吡啶和100 μ L 100mg/mL PEGDGE 400的膜包被溶液将PVP膜施加到工作电极上。膜沉积在活性区域上(3x5 mm/第二浸渍)并在RT下固化过夜,然后在干燥的小瓶中56°C下固化48小时。

[0116] 表4

[0117]

实施例 2 pH = 5.5 的 10 mM MES 缓冲液中的活性区域组合物	
组分	浓度(mg/mL)
KRT 或 ADH	16
心肌黄酶	4
白蛋白	8
NAD ⁺ 或 NAD(P) ⁺	8
钡聚合物络合物	8
PEGDGE 400	4

[0118] A1-A24传感器的烧杯校准。通过将电极浸入RT的100mM PBS缓冲溶液和不同浓度的乙醇(2、4、6、10、15、20、30和40mM乙醇)对根据实施例2制备的包含A1、A11、A15和A16 KRT的传感器进行醇感测分析。图6A显示了A1、A11、A15和A16中的每一个的响应。如图所示,每个KRT都表现出对增加的乙醇浓度的可测量响应。图6B显示了基于烧杯校准的A1、A11、A25和A16 KRT传感器的线性灵敏度响应,展示了正驱动力,特别是就A1、A11和A15而言。

[0119] 烧杯稳定性。在52°C下在100mM PBS中的30mM EtOH中评估了实施例2的A1、A11、A15和A16传感器的烧杯稳定性(长期稳定性)。如图6C所示的结果表明,在4天后,每个信号都经历了不同速率的传感器下降(检测醇的稳定性降低),如表5所提供。值得注意的是,A15传感器的信号下降显著低于其他测试的KRT传感器。

[0120] 表5

[0121]

实施例 2 4 天内信号下降	
传感器 KRT ID	下降%
A1	-75%
A11	-83%
A15	-16%
A16	-87%

[0122] 醛抑制作用。将醛抑制作用(例如,上文讨论的乙醛抑制作用)对实施例2的A1、A11、A15和A16传感器的性能影响与实施例2的ADH对照传感器进行比较。传感器在33°C的100mM PBS中的30mM EtOH中随时间孵育,然后掺入1mM乙醛(在约19.3小时)。标准化信号结果示于图7中。如图所示,A15和A16传感器在至多约20小时没有醛抑制作用的影响或可以忽略;A1和A11传感器显示出稍微大一点的抑制作用;而ADH对照传感器则表现出显著的抑制作用。表6中提供了测试传感器由于醛抑制作用导致的信号下降百分比。

[0123] 表6

[0124]

实施例 2 醛抑制作用	
传感器 KRT ID 或对照	下降%
A1	-16%
A11	-8%
A15	-5%
A16	-1%
ADH 对照	-51%

[0125] 实施例3.对KRT ID A15和A16在RT进行标准动力学测定,并与ADH对照(上述实施例2中描述的ADH)进行比较。在反应中使用辅因子 NAD^+ (或 NADP^+)并测量还原的NADH(或NADPH)在340nm处的光吸收(“OD”)。动力学测定中使用的A15和A16浓度为0.167mg/mL,动力学分析中使用的ADH对照浓度为0.0167 $\mu\text{g/mL}$ (数量级低于A15和A16),均在PBS缓冲液中。动力学测定的结果以图形方式显示在图8中。表7中提供了数值结果。值得注意的是,与A15和A16 KRT酶相比,ADH对照酶的量显著减少,但仍导致约260%更大的动力学活性,但A15和A16显示出显著更大的对醛抑制作用的抗性(参见图7)。

[0126] 表7

[0127]

	ADH	A15	A16
OD/min	0.0132	0.0051	0.0043
(OD/min)/(mg/mL)	790	0.031	0.026
单位/mg活性	288	0.011	0.009

[0128] 实施例4.对KRT ID A15和A16在RT下进行标准动力学测定,每个都在各种类型的醇中,并与ADH对照(上述实施例2中描述的ADH)进行比较。在反应中使用辅因子 NAD(P)^+ ,并测量还原的 NAD(P)H 在340nm处的光吸收(“OD”)。动力学测定中A15和A16的测试示于图9A和9B中,并测试是在乙醇(EtOH)、异丙醇(IPA)、丙醇(nPA)、丁醇(1-BuA)和甲醇(MeOH)中进行的。“空白”排除了KRT酶。KRT动力学测定的结果以图形方式显示在图9A和9B中其中9A涉及A15,9B涉及A16。表8中提供了数值结果,包括针对ADH对照测量的结果(未以图形形式另外表示)。值得注意的是,与ADH对照相比,KRT在IPA中表现出显著更高的酶活性,进一步证明本文所述的KRT传感器可用于伯醇以外的醇。

[0129] 表8

[0130]

单位/mg活性	ADH	A15	A16
MeOH	0.000	0.001	0.000
EtOH	288.000	0.012	0.009
IPA	0.709	2.553	7.091
nPA	4.211	0.032	0.042
1-BuA	1.309	0.047	0.131

[0131] 实施例5.在本实施例中,评估了相比于除实施例2的组成元件之外具有附加聚合物和/或交联剂的包含KRT的传感器。

[0132] IPA响应。针对实施例4的结果,进一步举例说明IPA对A15和A16的影响。根据实施例2制备A15和A16传感器,其中在一些情况下将一种或多种附加聚合物或交联剂添加到活性区域组合物中。附加聚合物是聚(1-乙烯基咪唑)(“PVI”),附加交联剂是戊二醛(“Glut”)。传感器的电流响应最初是在100mM PBS缓冲液中的30mM EtOH在33°C下测量约3.5小时,然后掺入(更换缓冲液并添加IPA)增加浓度的IPA(1、2和3mM IPA)。结果示于图10A和10B中,其中10A涉及A15,而10B涉及A16。基于图10A和10B的图例参考,用于每个测试传感器的附加聚合物和/或交联剂示于表9中,以mg/mL的总活性区域表示,“—”符号表示未添加该组分。

[0133] 表9

[0134]	图10A/10B图例参考	PVI (mg/mL)	Glut (mg/mL)
	A15	—	—
	A15PVI4	4	—
	A15Glut05	—	0.5
	A15PVI4Glut05	4	0.5
	A15PVI4Glut1	4	1
	A16PVI4	4	—
	A16Glut05	—	0.5
	A16PVI4Glut05	4	0.5
	A16Glut1	—	1
	A16PVI4Glut1	4	1

[0135] 如图10A和10B所示,对1mM IPA的响应是对30mM EtOH的响应的约12倍。进一步如图10A所示,包含戊二醛交联剂的A15传感器通常对IPA表现出更高的灵敏度,其中仅包含戊二醛(且不含PVI)的A15传感器表现出最高的灵敏度。参照A16传感器的类似的结果显示在图10B中;然而,与较高浓度的戊二醛(1mg/mL)相比,较低浓度的戊二醛(0.5mg/mL)对IPA表现出更高的灵敏度。

[0136] 烧杯稳定性。在33°C下在100mM PBS中的30mM EtOH中评估了实施例5的A15和A16传感器的烧杯稳定性(长期稳定性)。结果示于图11A和11B中,其中11A涉及A15,而11B涉及A16。如图所示,A15传感器的稳定性大于A16传感器的稳定性。此外,包含附加戊二醛交联剂的A15传感器的稳定性优于其他A15组合物的稳定性。然而,在A15PVI4Glut05和A15PVI4Glut1样品中观察到活性区域沉淀;更具体地说,当同时包含PVI和戊二醛时,活性区域出现混浊。表10提供了A15传感器在5天内经历的传感器数值下降。

[0137] 表10

[0138]	实施例 5 4 天内信号下降	
	传感器 KRT ID	下降%
	A15	-24%
	A15PVI4	-37%
	A15Glut05	-18%
	A15PVI4Glut05	-15%
	A15PVI4Glut1	-8.5%

[0139] 实施例6.在本实施例中,将具有附加聚合物的包含KRT的传感器与ADH对照传感器进行比较。

[0140] 烧杯校准。测试了根据实施例2制备并且还在活性区域中包含8mg/mL的PVI的A15传感器的醇感测分析,以确定其对在33°C下的100mM PBS缓冲液中的各种浓度的EtOH(1、2、3、5、7、10、15、20、25和30mM EtOH)的响应。将KRT A15传感器与根据实施例2制备的ADH对照传感器进行比较。图12A显示了包含附加PVI聚合物(标记为A15+8PVI)的A15传感器和ADH对照传感器中的每一个的标准化信号响应。如图所示,A15传感器表现出更高的乙醇灵敏度(即,在每个更高浓度的EtOH之后,ADH对照中的信号损失显著更大),如图12B中进一步所示,其显示了两个测试传感器的线性灵敏度响应。

[0141] 烧杯稳定性。在33℃下在100mM PBS中的30mM EtOH中评估了实施例6的A15和ADH对照传感器的烧杯稳定性(长期稳定性)。图13中所示的结果证明KRT A15传感器的稳定性明显优于ADH对照传感器。

[0142] 实施例7.在两种不同的膜溶剂中评估了根据实施例2制备的A15传感器的烧杯稳定性(长期稳定性),一种膜溶剂包含EtOH,第二种膜溶剂包含比例为80:20的EtOH和HEPES缓冲液。结果示于图14中并且证明,传感器在仅EtOH溶剂中的稳定性表现出与稀释的EtOH溶剂相比更大的稳定性。

[0143] 实施例8.在33℃下在100mM PBS缓冲液中的30mM EtOH中评估了具有不同膜组成(并且不同于实施例2)的根据实施例2制备的其中添加了1mg/mL的戊二醛的包含活性区域的分析物传感器的烧杯稳定性(长期稳定性)。制备三种分开的膜组合物并包被在A15活性区域(进一步包含戊二醛)上,所述A15活性区域包含PVP中的1%、2%或4%的PEGDGE 400。信号稳定性的结果示于图15中,彼此密切跟随。基于本发明的组合物,所测试膜的短期稳定性大于长期稳定性。5天和10天内的数值信号下降示于表11中。

[0144] 表11

[0145]	实施例 8 5 天内信号下降	
	膜	下降%
	1% PEDGE 400	-14%
	2% PEDGE 400	-13%
	4% PEDGE 400	-13%
	实施例 8 10 天内信号下降	
	膜	下降%
	1% PEDGE 400	-41%
	2% PEDGE 400	-37%
	4% PEDGE 400	-46%

[0146] 实施例9.在33℃下在100mM PBS缓冲液中的30mM EtOH中评估了具有不同膜组成(并且不同于实施例2)的根据实施例2制备的其中添加了1mg/mL的戊二醛的包含活性区域的分析物传感器的烧杯稳定性(长期稳定性)。制备三种分开的膜组合物并包被在A15活性区域(进一步包含戊二醛)上,所述A15活性区域包含不含任何交联剂的PVP、不含任何交联剂的聚乙烯基吡啶-共-聚苯乙烯(30)(即具有30%苯乙烯) (“PVPSty30”)或者具有4%的PEGDGE 400交联剂的PVPSty30。信号稳定性的结果示于图16中,说明添加交联剂似乎对KRT传感器稳定性没有显著影响。

[0147] 一般而言,本公开内容的实施方案表明包含KRT酶的协同酶系统可以作为用于检测个体的醇水平的醇传感器是可行的,特别是在体内(但也可以用于体内测量)。在本公开内容中测试的KRT中,包含A15的KRT传感器表现出最大的稳定性(烧杯稳定性)并且A16表现出最小的产物抑制作用;并且两者对IPA的比活性都比EtOH高得多(例如,对于A15为200倍,而对于A16为700倍)。

[0148] 除非另有说明,否则本说明书和相关权利要求书中的所有表示数量等的数字都应理解为在所有情况下均由术语“约”修改。因此,除非有相反的说明,否则以下说明书和所附权利要求中阐述的数值参数是可以根据本发明的实施方案寻求获得的期望特性而变化的

近似值。至少,而不是试图将说明书等效原则限制在权利要求的范围内,每个数值参数至少应根据报告的有效数字的数量并通过应用普通的舍入技术来解释。

[0149] 本文呈现了一个或多个结合各种特征的示例性实施方案。为了清楚起见,本申请中并未描述或显示物理实现的所有特征。可以理解的是,在开发包含本发明实施方案的物理实施方案时,必须做出许多特定于实现的决策来实现开发者的目标,例如符合系统相关、业务相关、政府相关和其他约束,这些约束因实施并且不时而异。虽然开发人员的劳动可能是耗时的,但是这样的劳动对于本领域技术人员并受益于本公开内容的人员来说将是常规工作。

[0150] 虽然各种系统、工具和方法在本文中被描述为“包括”各种组分或步骤,但系统、工具和方法也可以“基本上由”或“由”各种组分和步骤“组成”。

[0151] 如本文所用,在一系列项目之前的短语“至少一个”,用术语“和”或“或”分隔任何项目,作为一个整体修改列表,而不是列表中每个成员(即每个项目)。短语“至少一个”允许具有包括任何一项的至少一项,和/或这些项的任何组合中的至少一项,和/或每一项的至少一项的含义。例如,短语“A、B和C中的至少一个”或“A、B或C中的至少一个”各自指仅A、仅B或仅C;A、B和C的任意组合;和/或A、B和C中每一个的至少一个。

[0152] 因此,所公开的系统、工具和方法很好地适用于实现所提到的目的和优点以及其中固有的那些目的和优点。上面公开的特定实施方案仅是示例性的,因为本公开内容的教导可以以对受益于本文教导的本领域技术人员显而易见的不同但等效的方式进行修改和实践。此外,除了在所附权利要求书中所描述的之外,不打算对本文所示的构造或设计的细节进行限制。因此很明显,上面公开的特定示例性实施方案可以被改变、组合或修改,并且所有这些变化都被认为在本公开内容的范围内。本文示例性公开的系统、工具和方法可以在不存在本文未具体公开的任何元素和/或本文公开的任何任选元素的情况下适当地实践。虽然系统、工具和方法以“包含”、“含有”或“包括”各种组分或步骤来描述,但系统、工具和方法也可以“基本上由”或“由”各种组分和步骤组成。上面公开的所有数字和范围可能会有所不同。每当公开具有下限和上限的数值范围时,具体公开了落入该范围内的任何数字和任何包含的范围。具体而言,本文公开的每个值范围(形式为“从约a到约b”,或等效地,“从大致a到b”,或等效地,“从大致a-b”)应理解为列出包含在更广泛的值范围内的每个数字和范围。此外,除非专利权人另有明确和明确的定义,否则权利要求书中的术语具有其简单、普通的含义。此外,权利要求书中使用的不定冠词“a”或“an”在本文中被定义为表示其引入的一个或多个元素。如果本说明书中的词语或术语的使用与可以通过引用的方式并入本文的一份或多份专利或其他文件存在冲突,应采用与本说明书一致的定义。

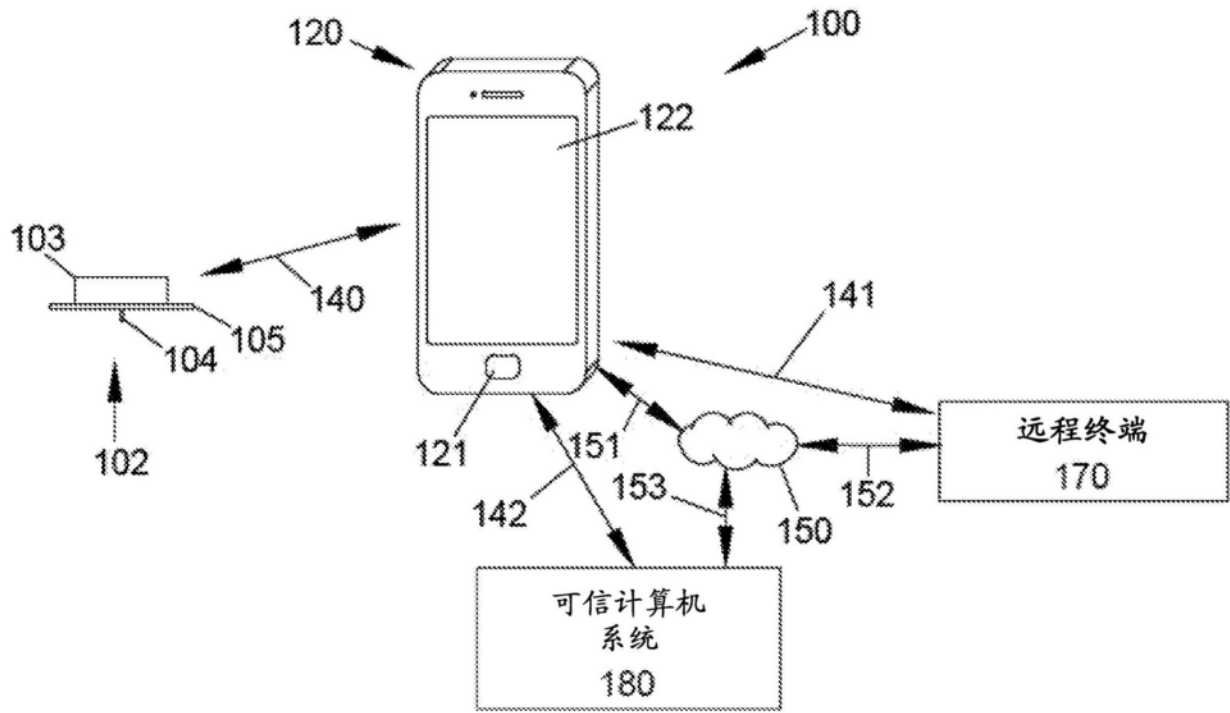


图1

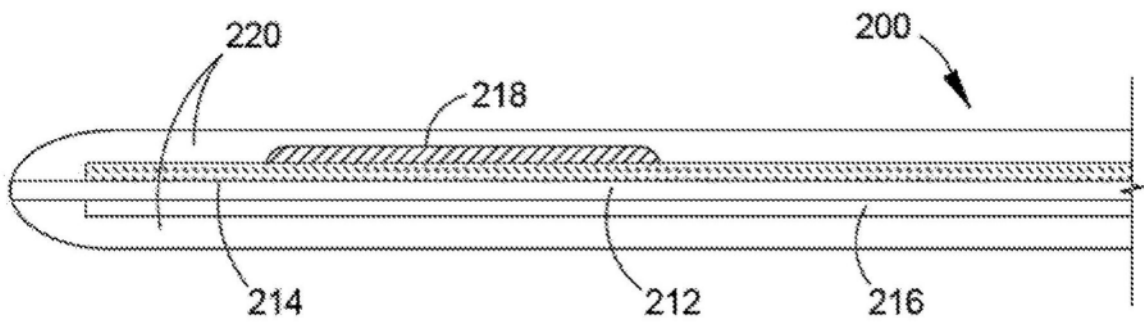


图2A

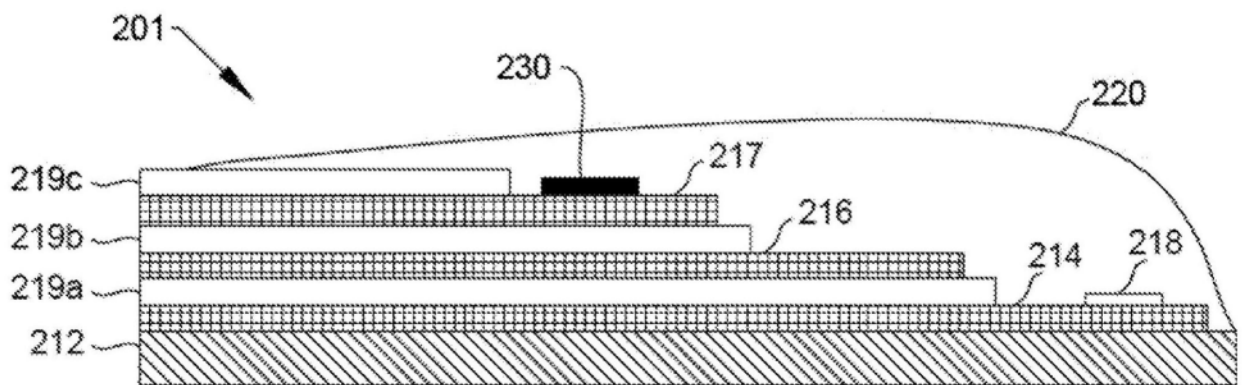


图2B

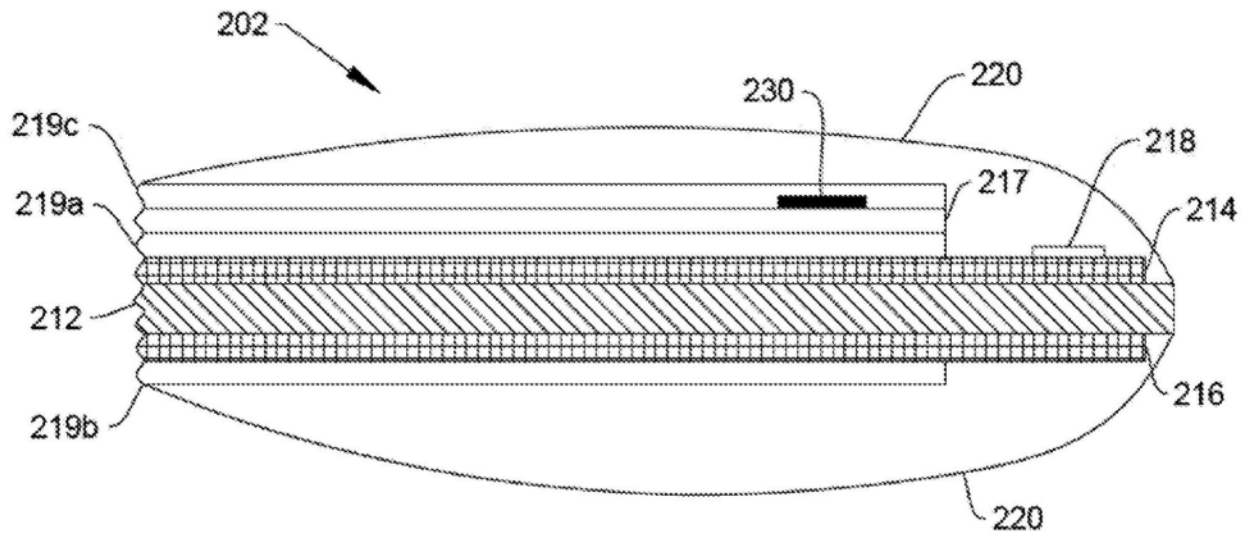


图2C

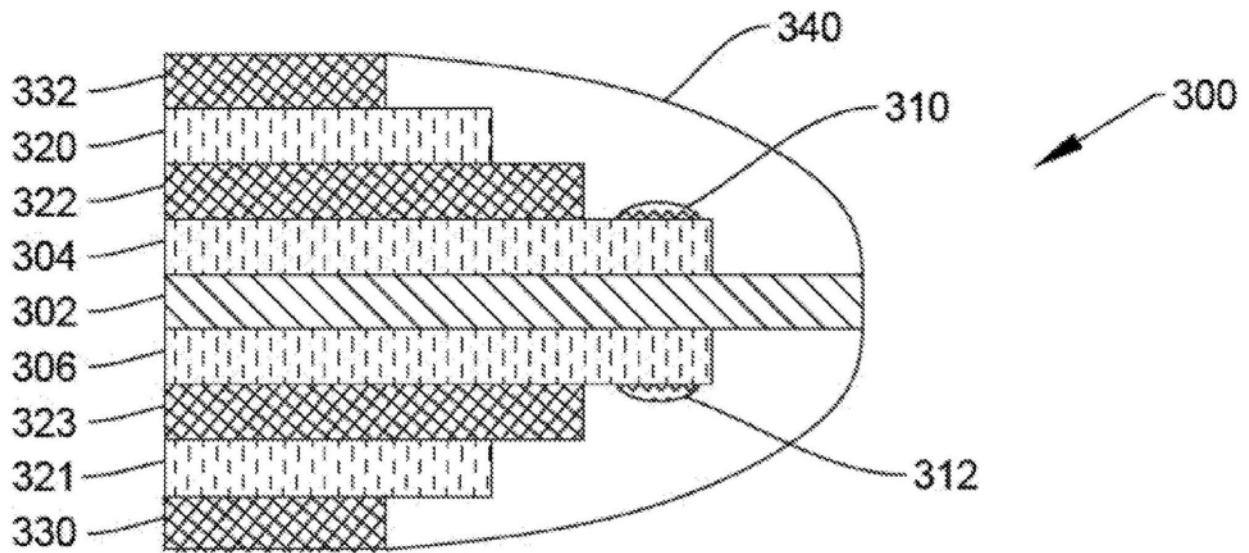


图3

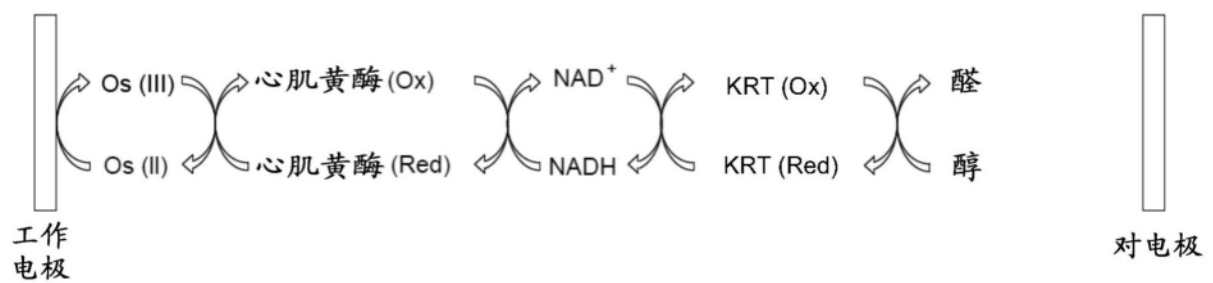


图4A

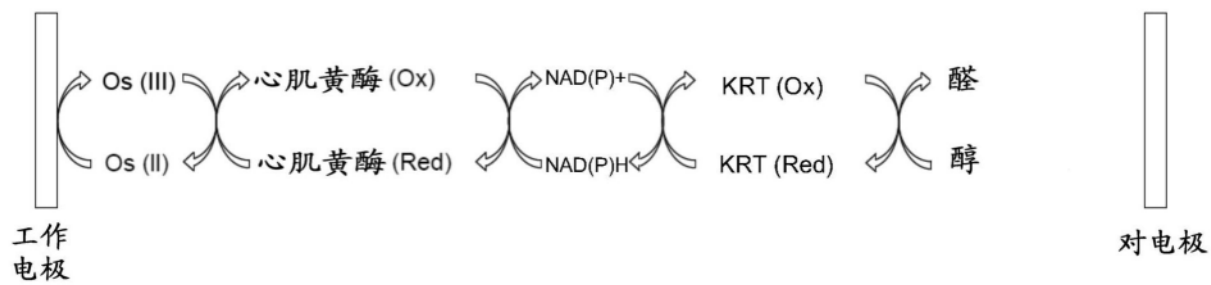


图4B

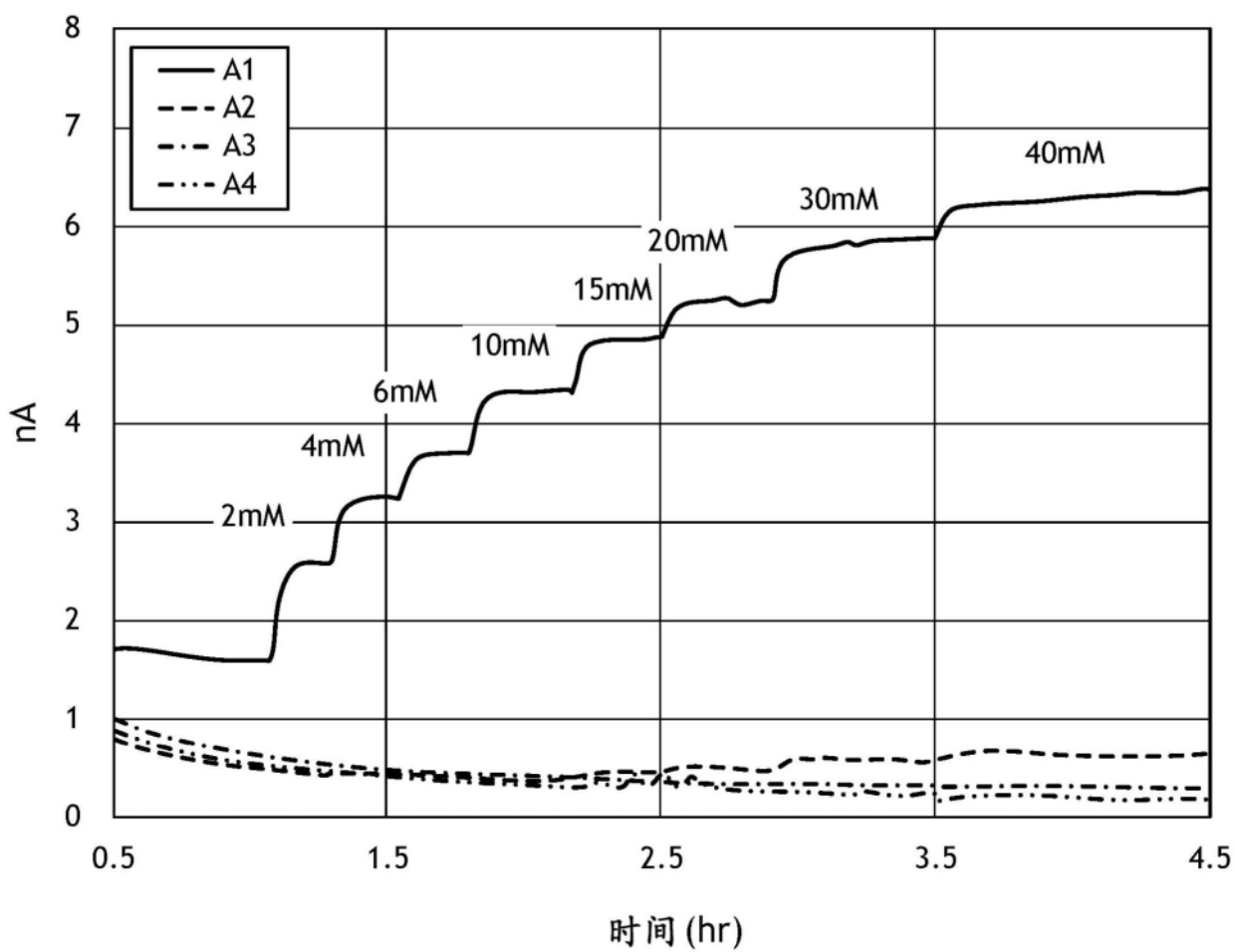


图5A

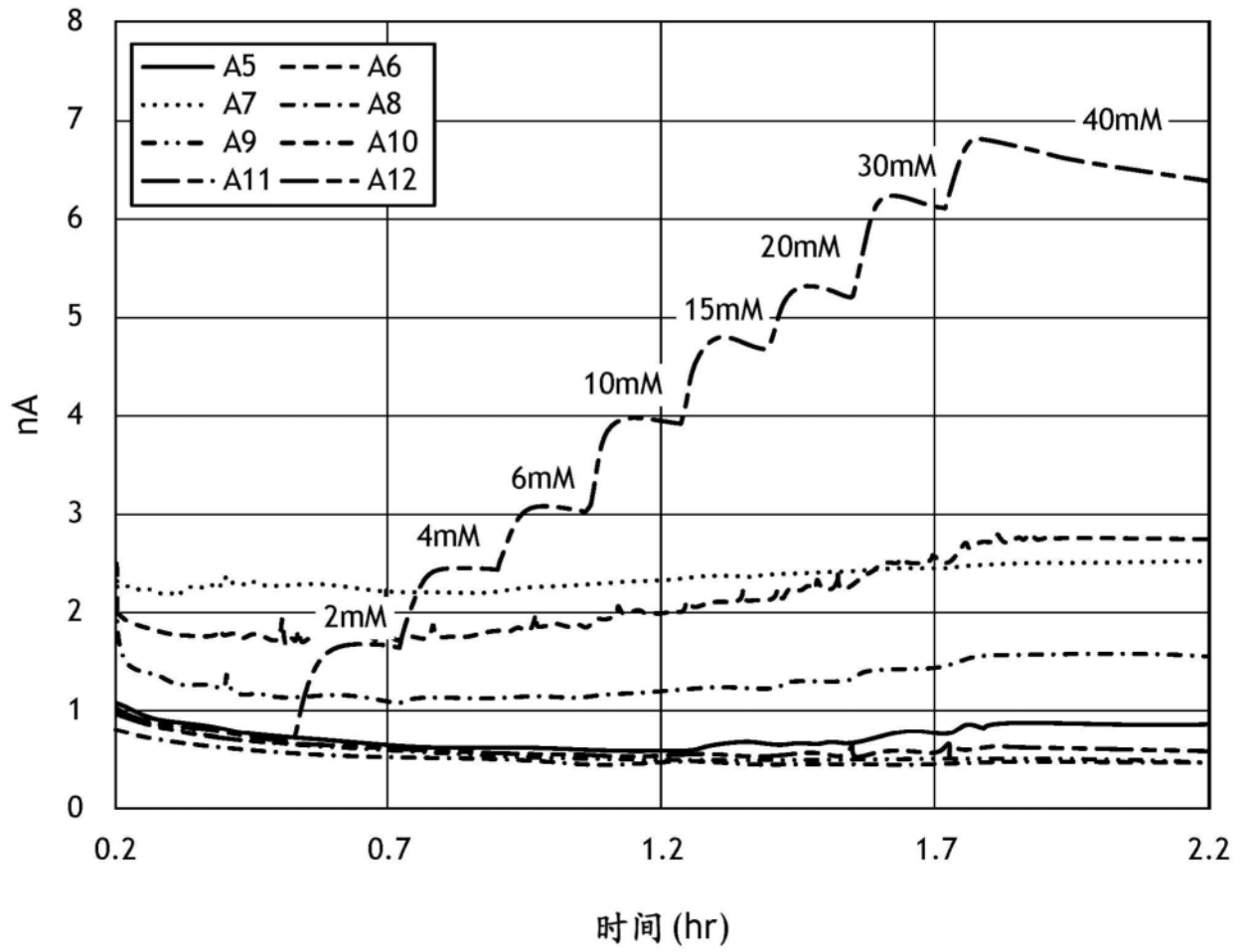


图5B

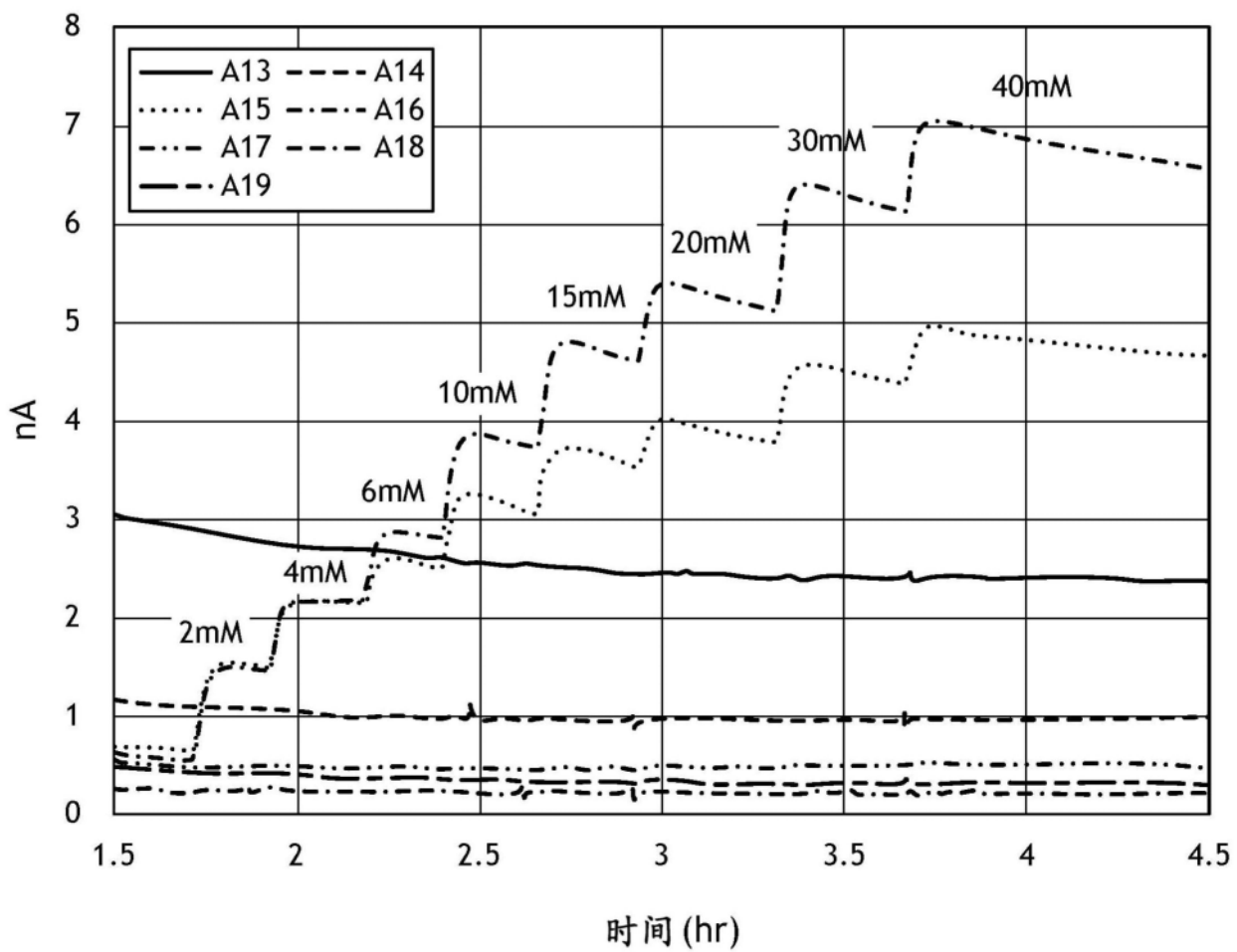


图5C

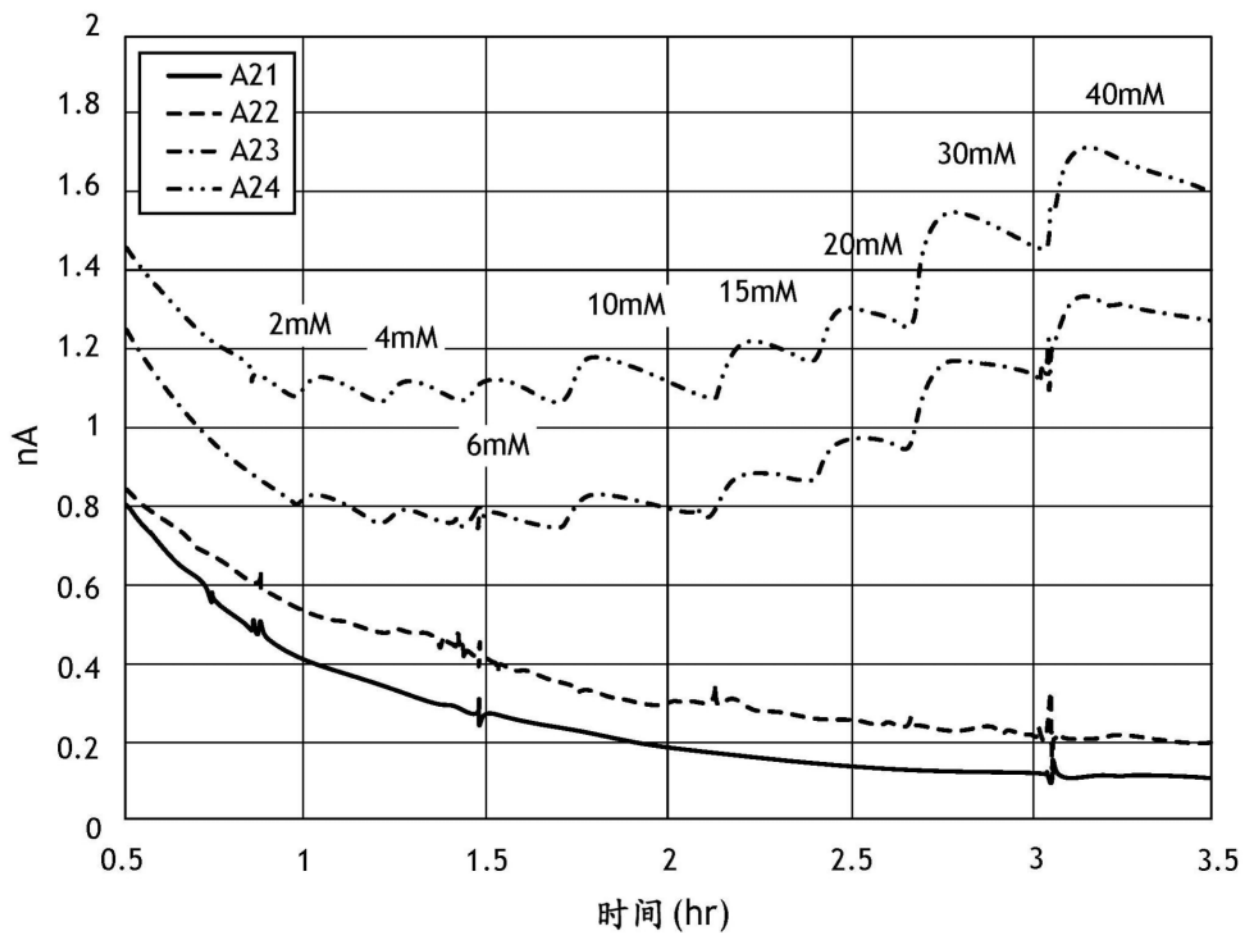


图5D

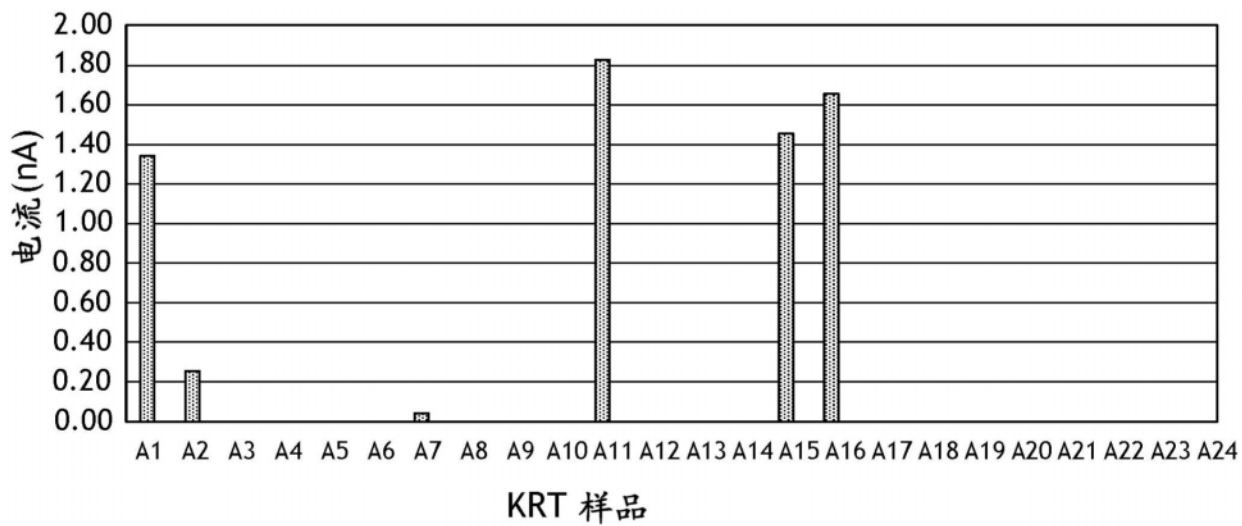


图5E

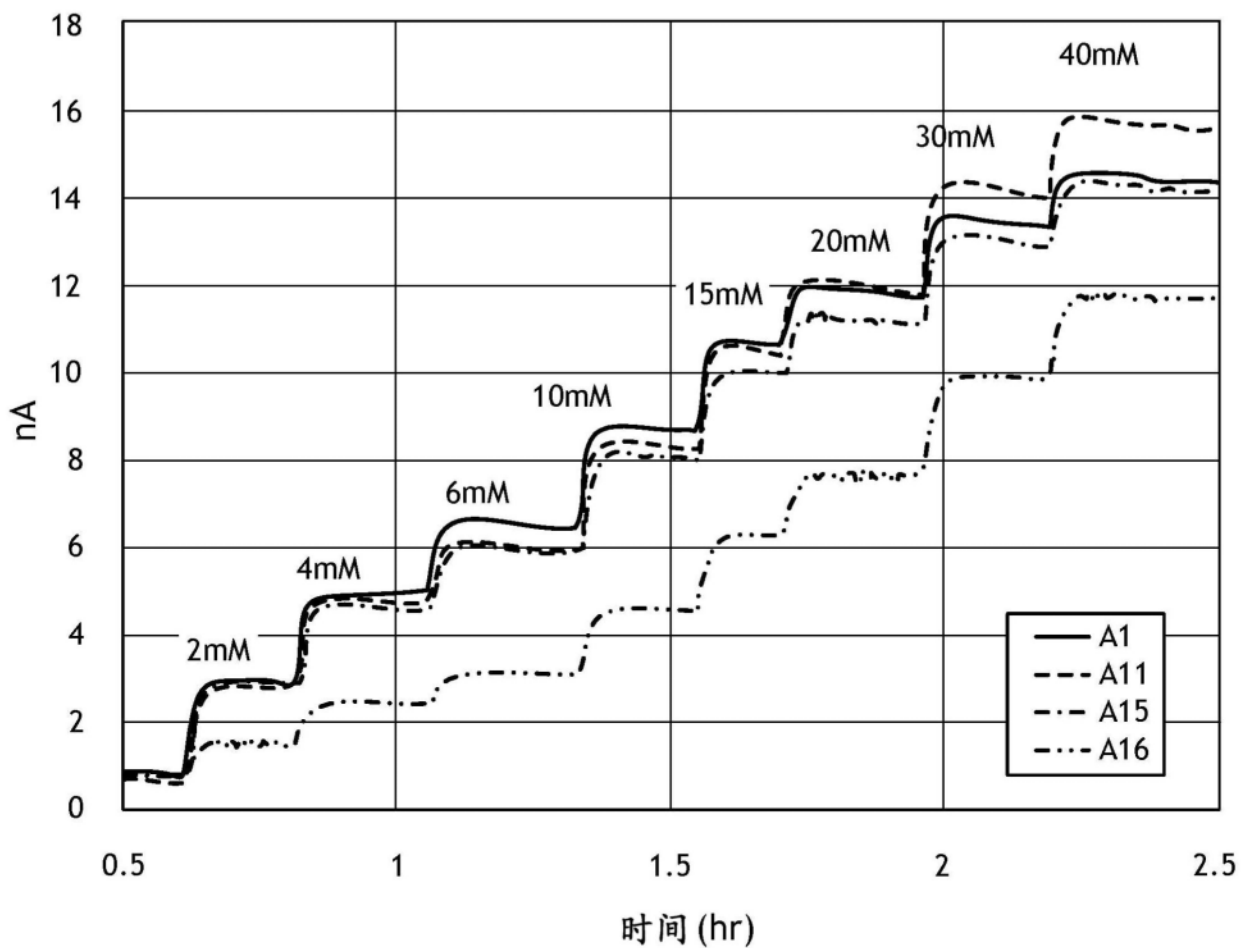


图6A

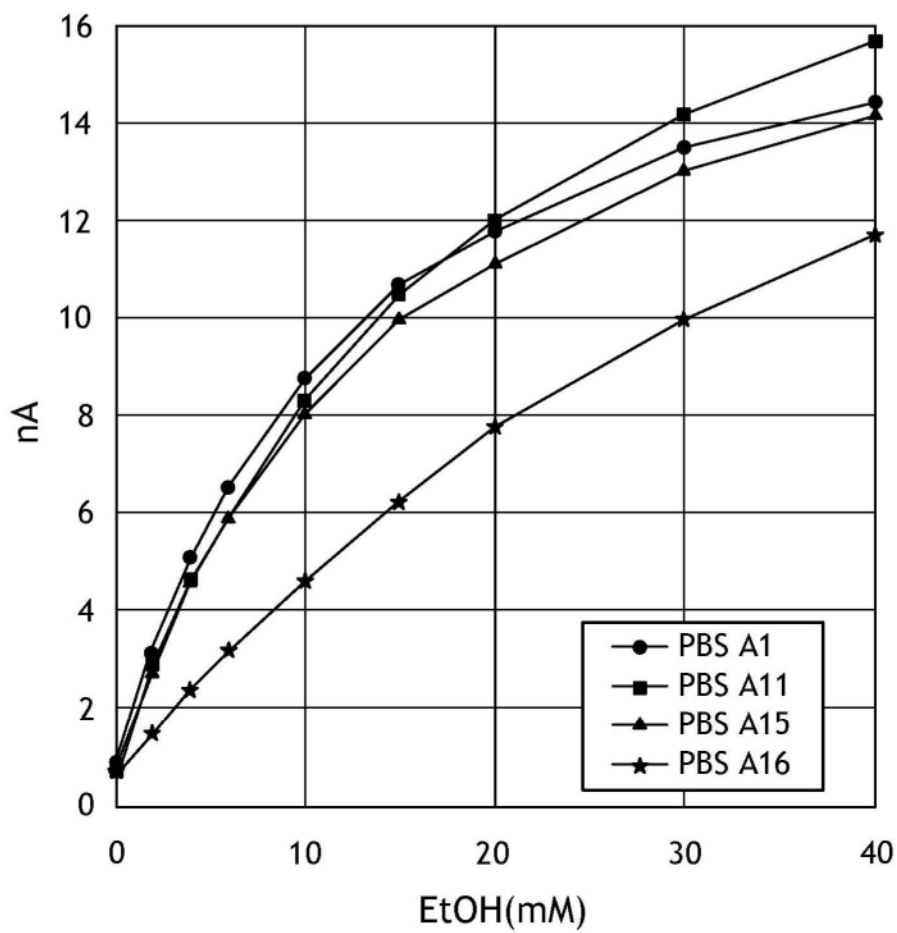


图6B

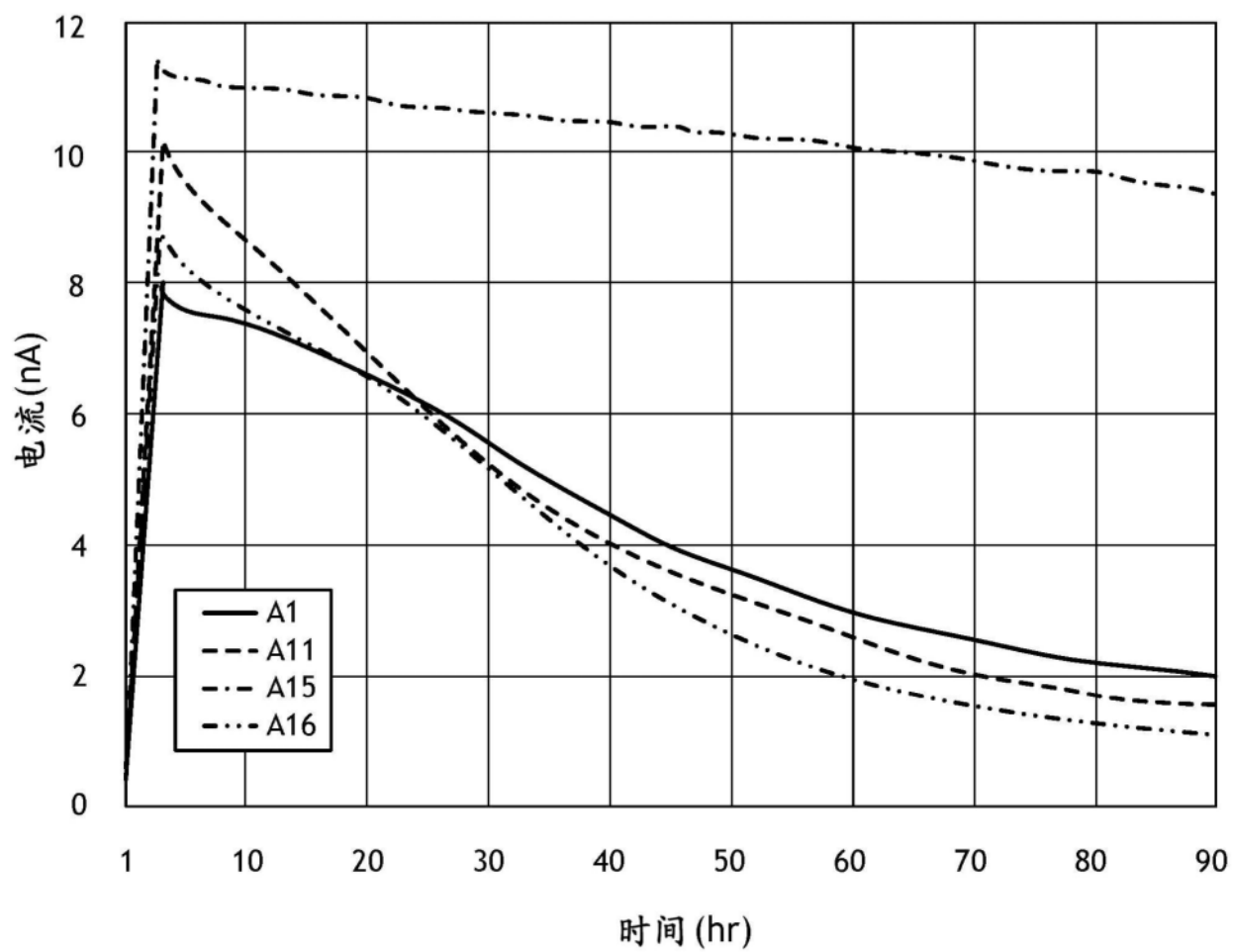


图6C

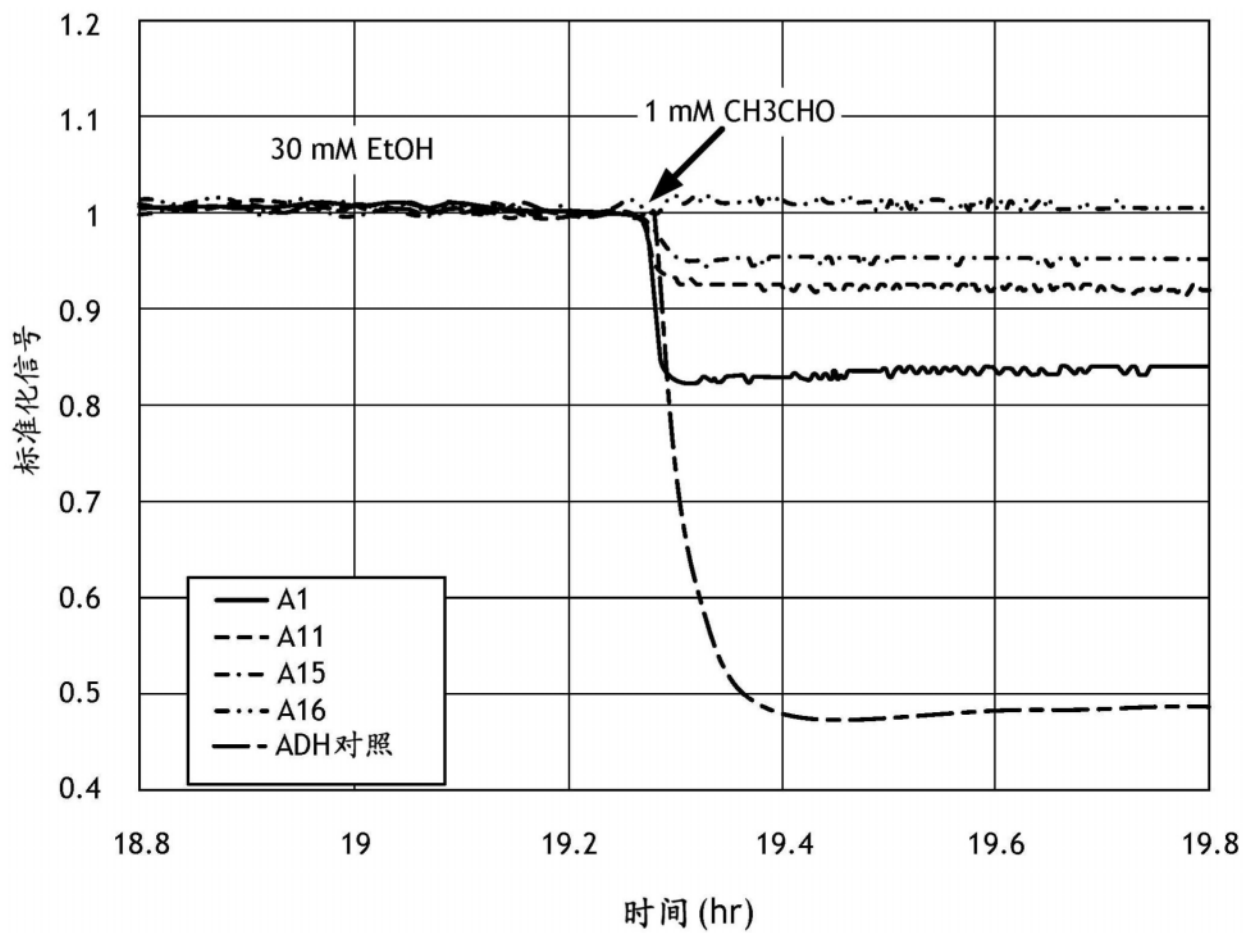


图7

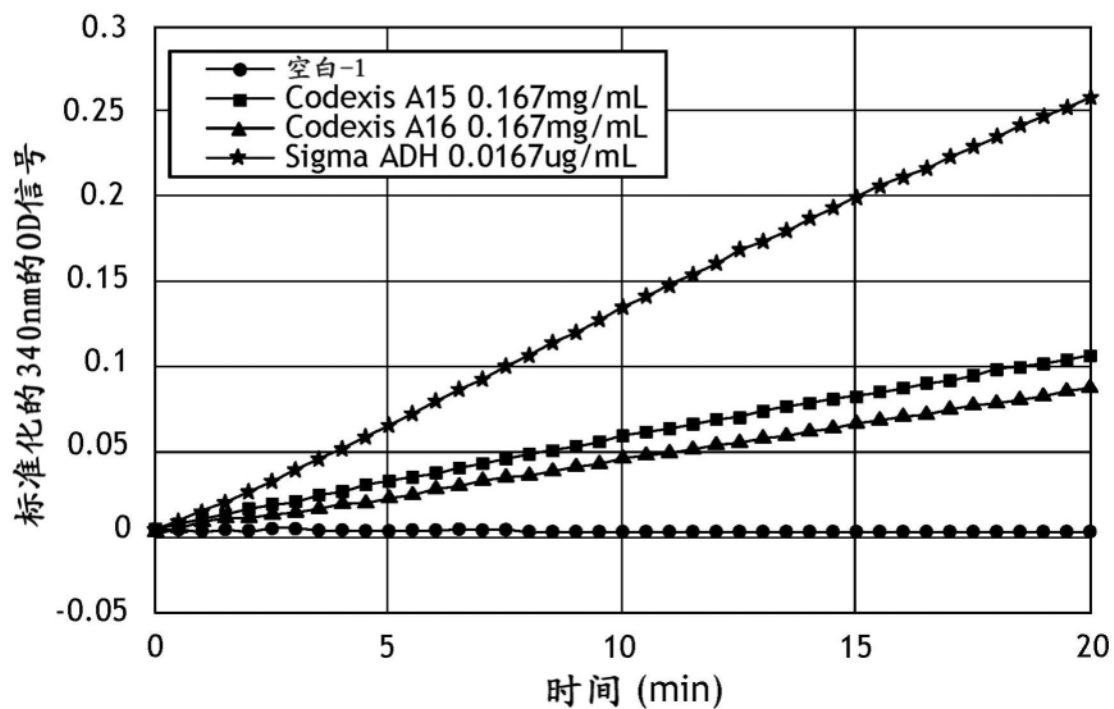


图8

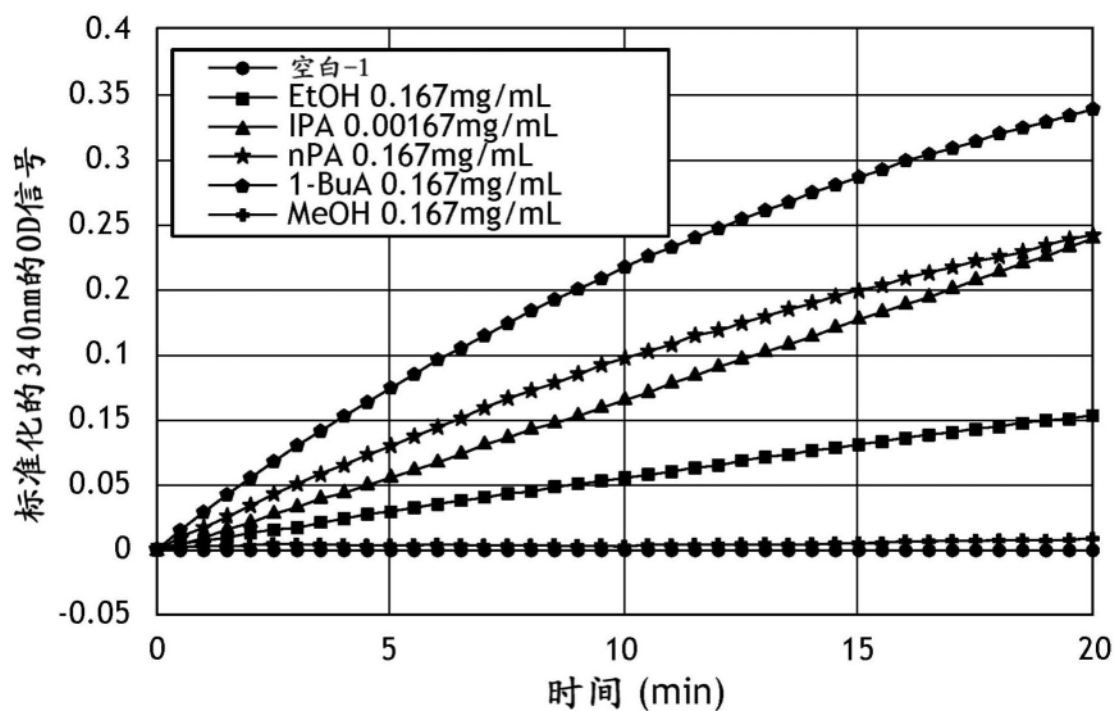


图9A

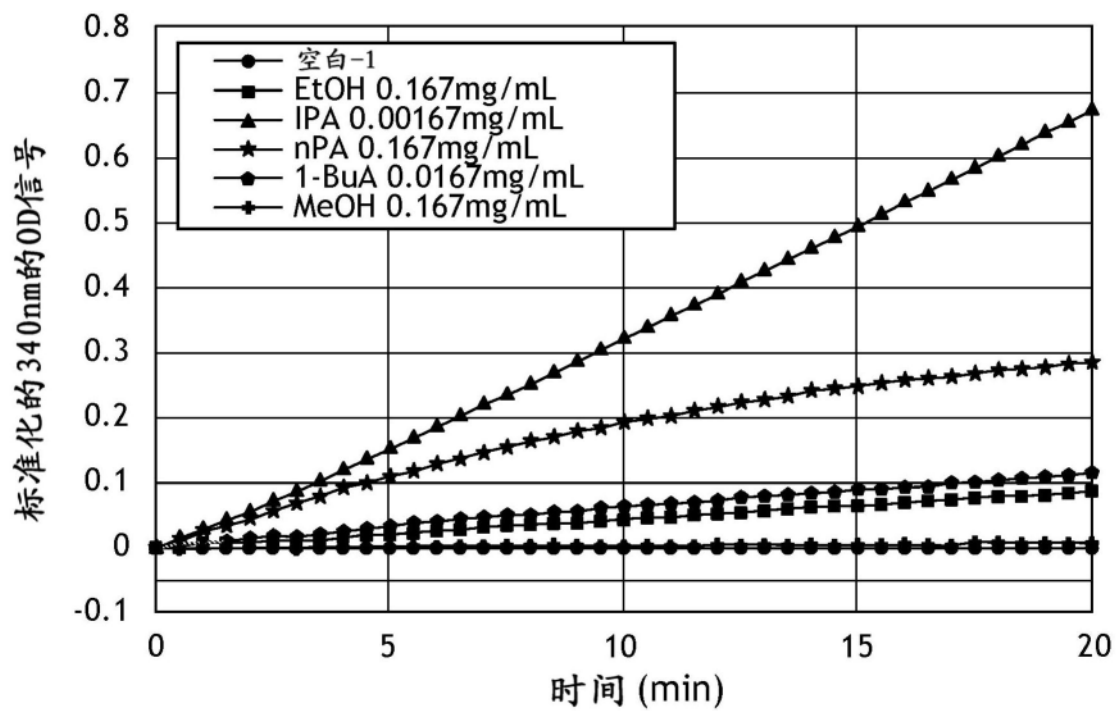


图9B

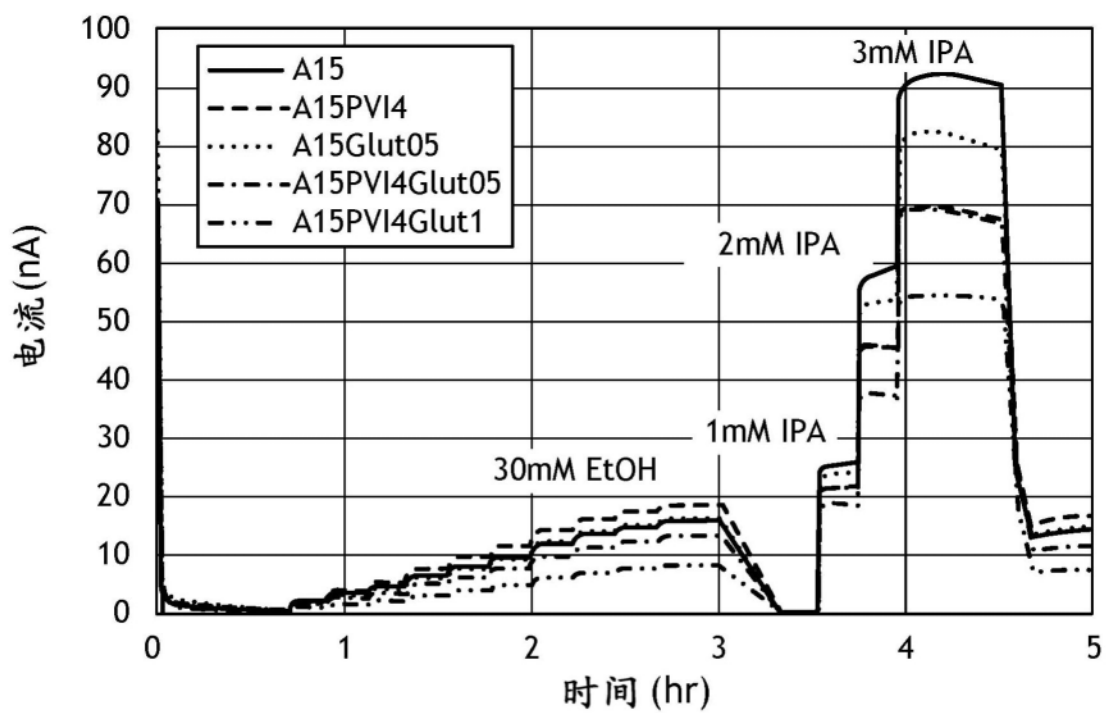


图10A

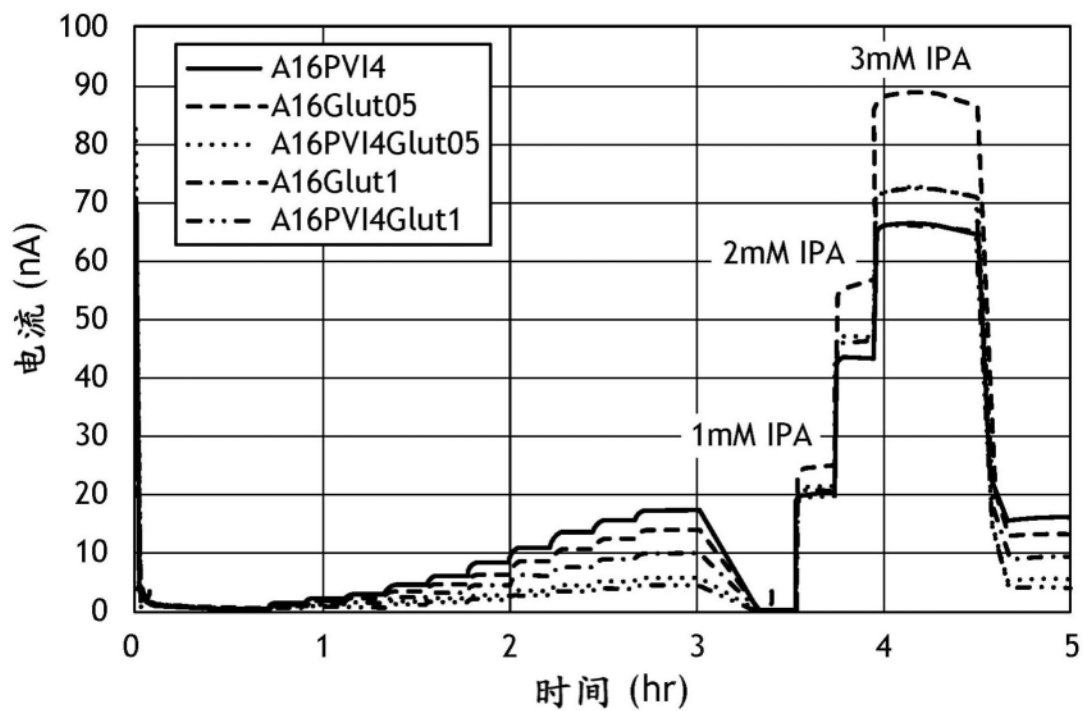


图10B

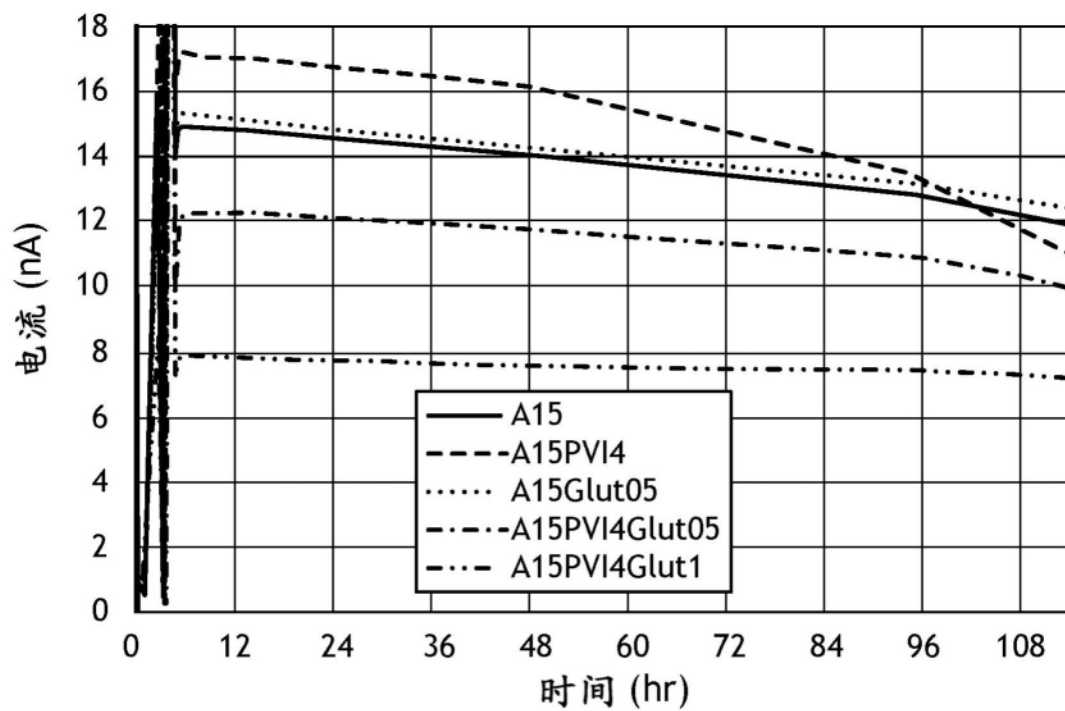


图11A

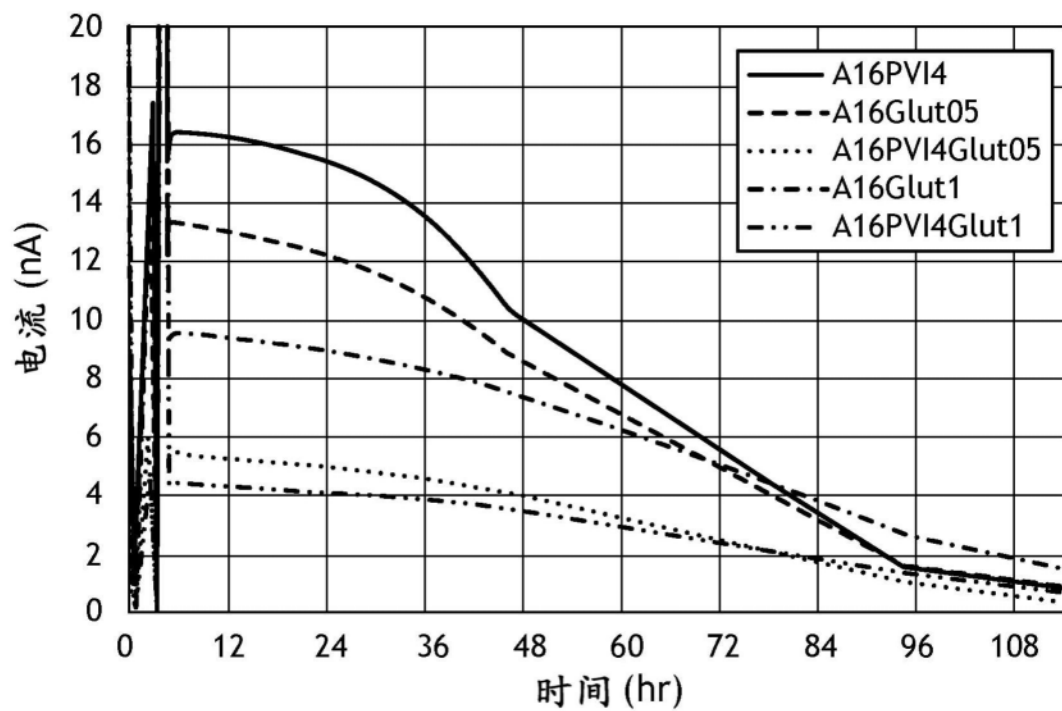


图11B

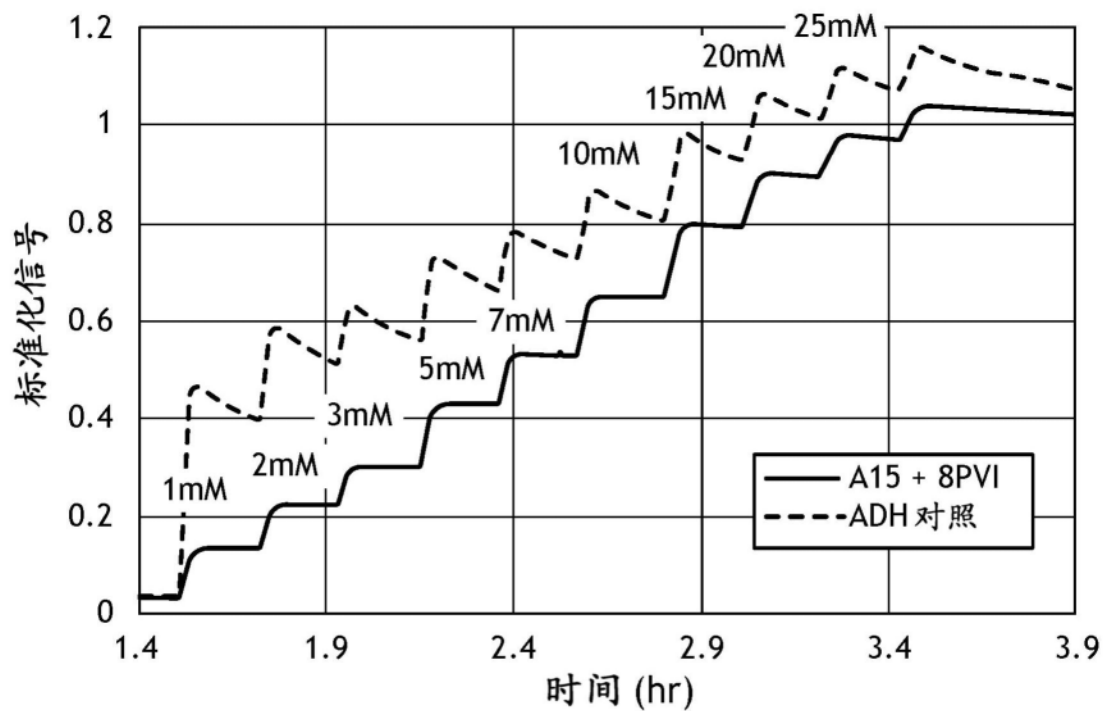


图12A

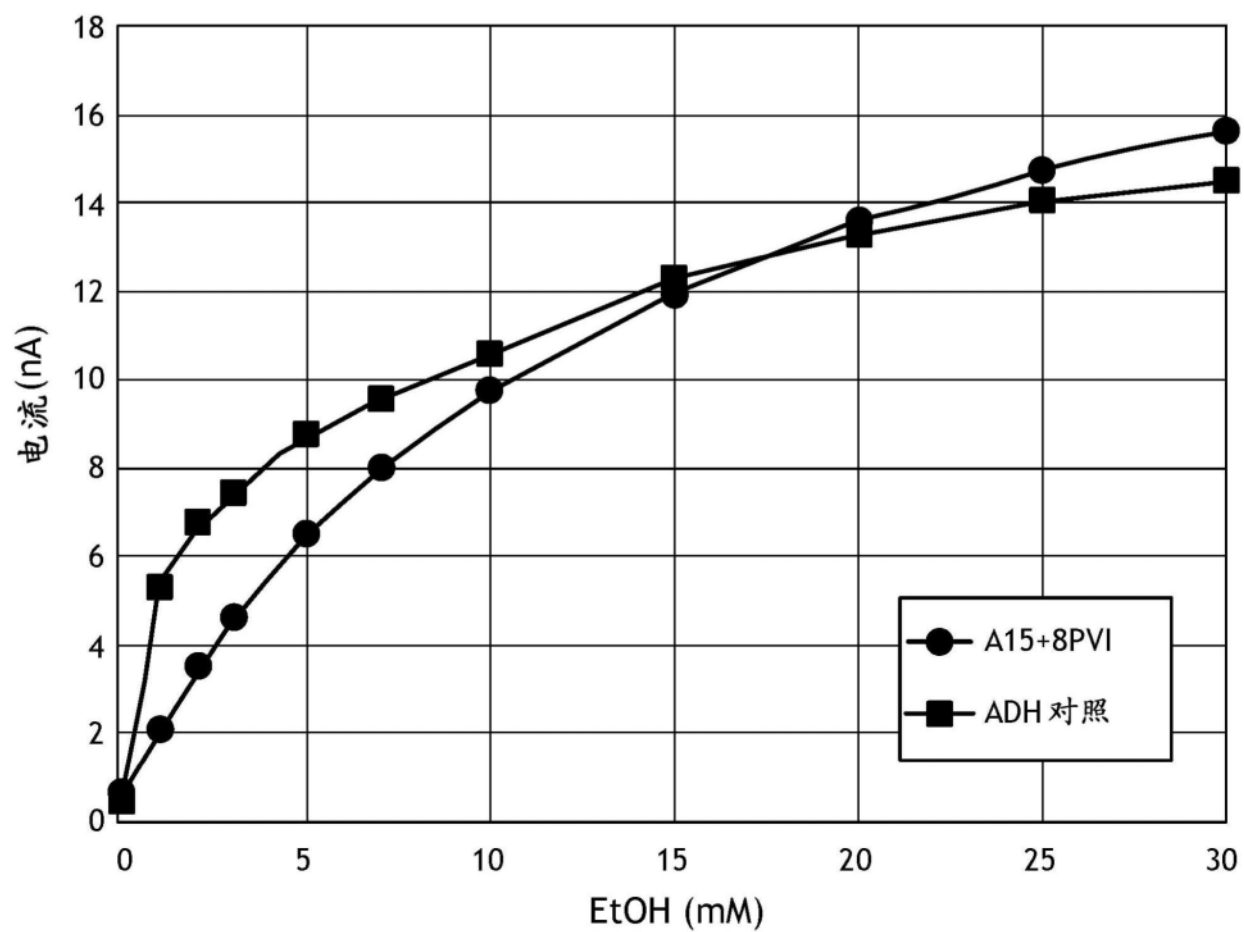


图12B

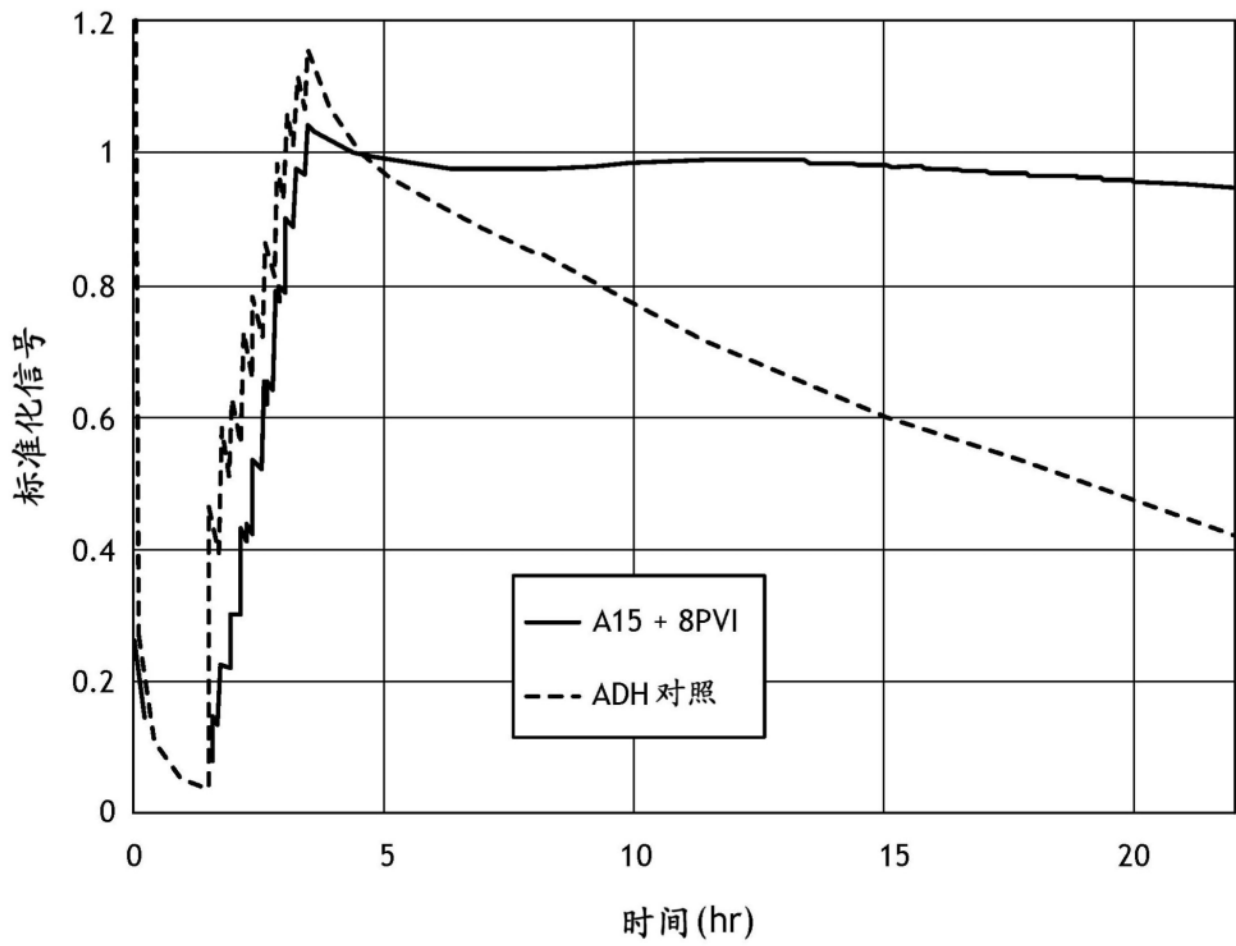


图13

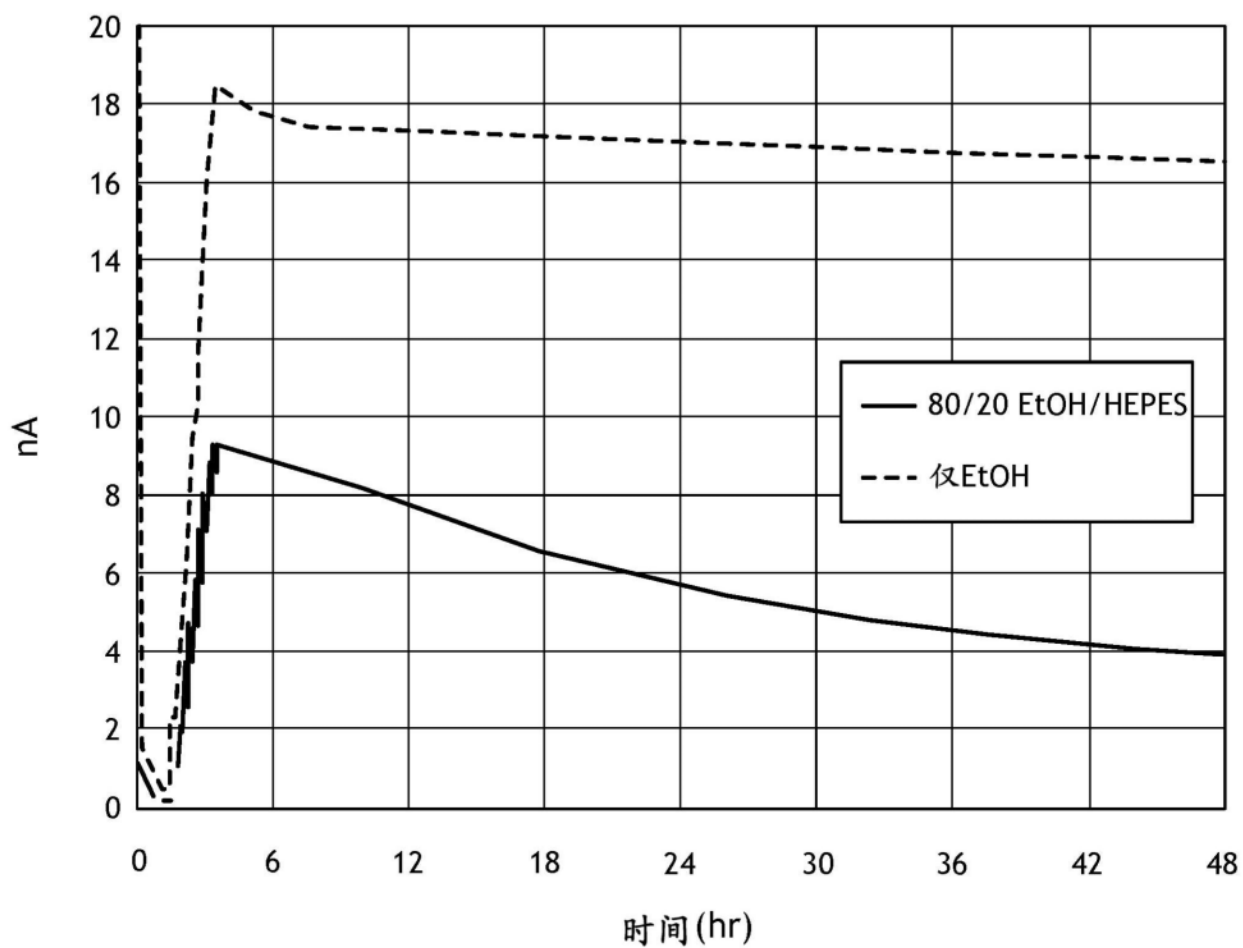


图14

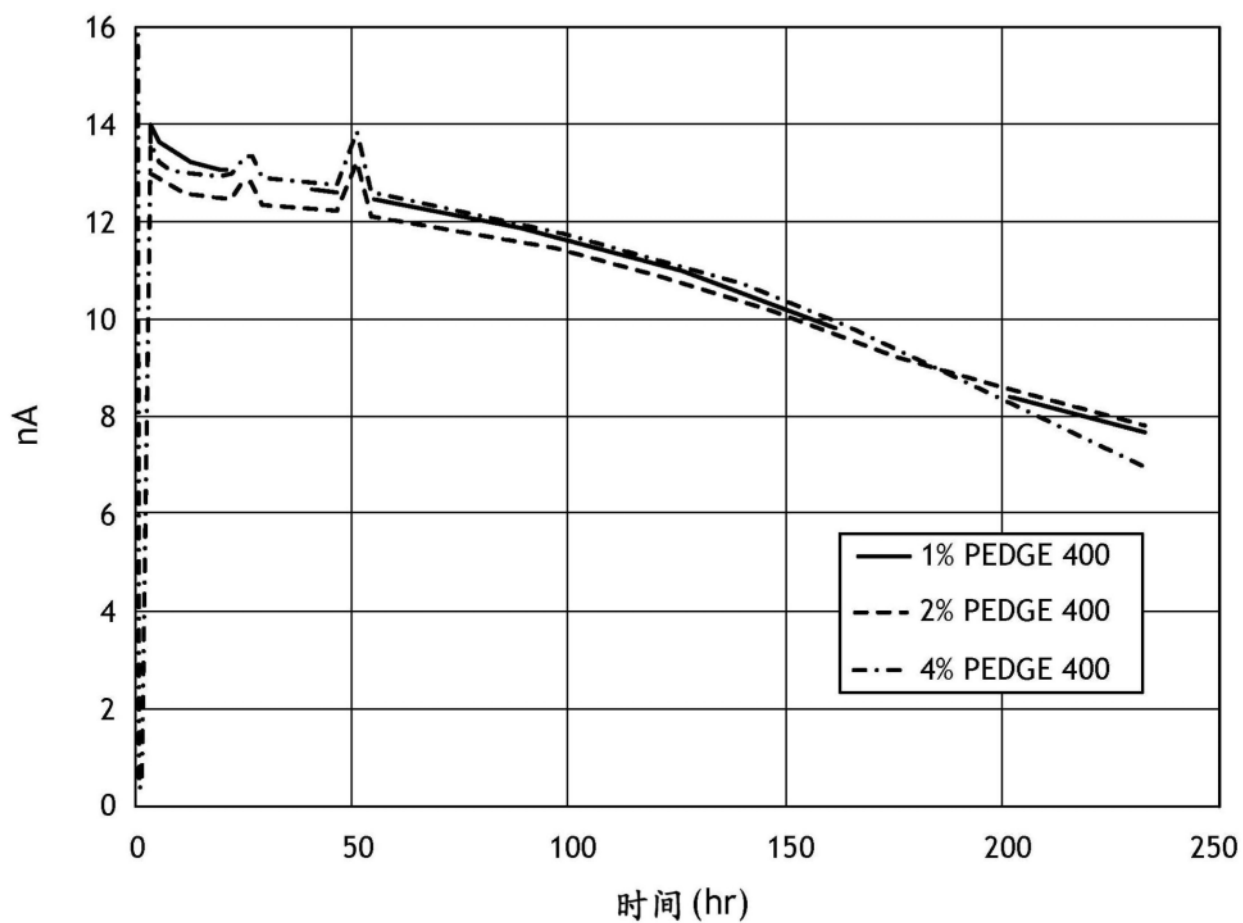


图15

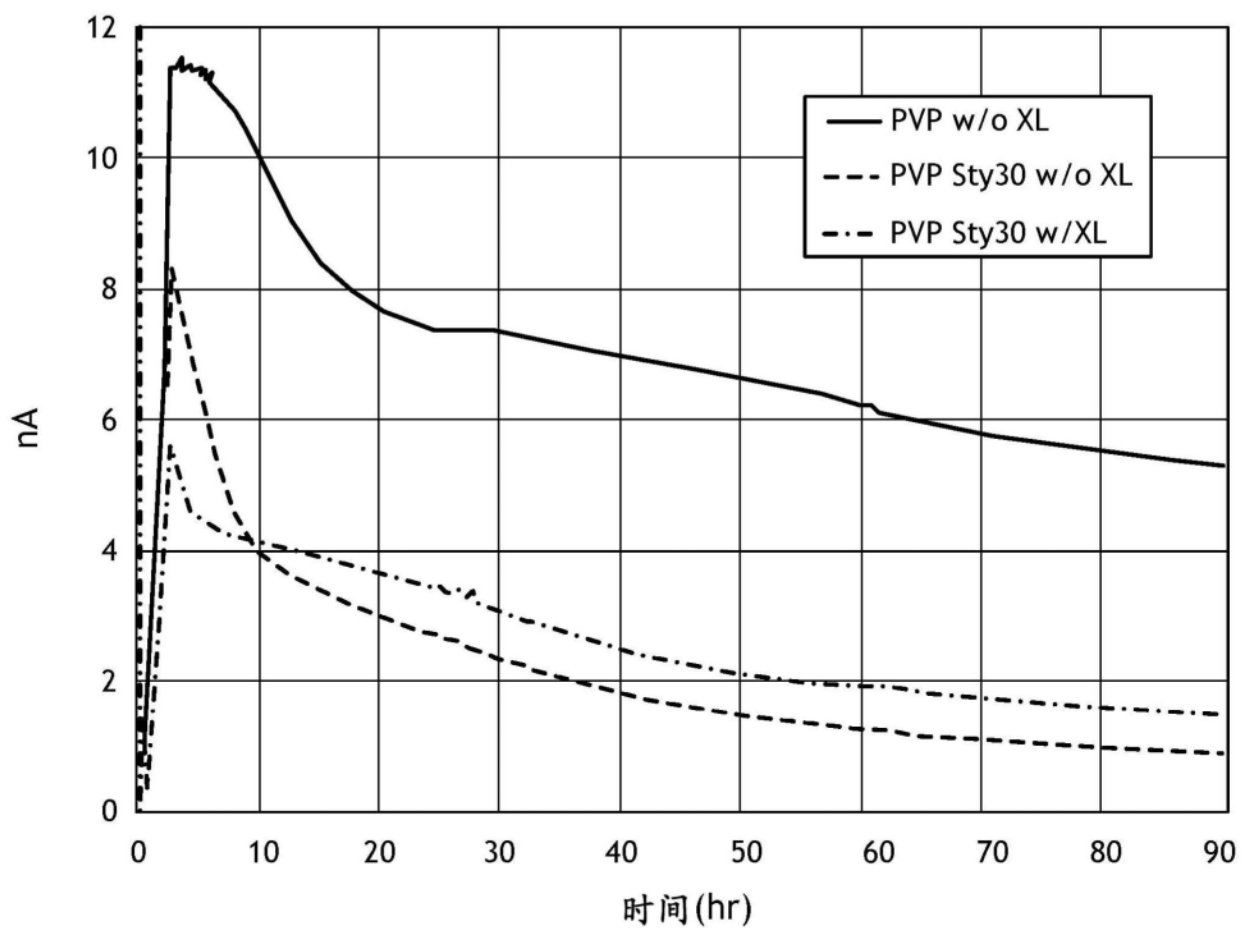


图16