



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 320 078**

② Número de solicitud: 200702402

⑤ Int. Cl.:

**C12N 11/04** (2006.01)

**C08F 220/20** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **07.09.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2009**

Fecha de la concesión: **24.02.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **10.03.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**10.03.2010**

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado - Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **López Ruiz, Beatriz;  
López Cabarcos, Enrique y  
Hervás Pérez, Juan Pablo**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Microgeles biocompatibles estables para inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos.**

㉑ Resumen:

Microgeles biocompatibles estables para inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos.

Micropartículas del hidrogel biocompatible p-poli(etilenglicol metil éter metacrilato) (PEGMEM) se utilizan como sistema de inmovilización enzimática para su aplicación como material biológico en el diseño de un biosensor amperométrico.

Las micropartículas se inmovilizan sobre la superficie de un electrodo de platino mediante una membrana de diálisis. La enzima así inmovilizada mantiene su actividad constante durante largos períodos de tiempo, permitiendo su uso como material biológico para la preparación de biosensores amperométricos, los cuales mantienen su actividad enzimática constante durante al menos 18 meses.

ES 2 320 078 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Microgeles biocompatibles estables para inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos.

5 **Objeto de la invención y estado de la técnica**

En los últimos años se ha producido un intenso desarrollo de materiales basados en polímeros hidrofílicos con nuevas propiedades que ha llevado a la búsqueda de nuevos polímeros o a la modificación de otros conocidos. Son numerosos los trabajos publicados sobre las propiedades de polímeros que contienen grupos hidrofílicos unidos a la cadena principal o presentes en cadenas laterales como es el caso de poli(metacrilatos) con grupos hidroxilo o amino en su estructura (Bayramoğlu *et al.*, *Process. Biochem.*, 2005, 40, 3505-3513; Kim *et al.*, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 6828-6833).

La inmovilización de enzimas en la superficie de un electrodo es un factor clave en la fabricación de biosensores, por esta razón son muchos los métodos de inmovilización ensayados para preparar electrodos enzimáticos amperométricos. Dentro de estos métodos de inmovilización podemos destacar la unión covalente (Kok *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19, 661-665; Kim *et al.*, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 6828-6833.), el atrapamiento en matrices (Cai *et al.*, *Chem. Mater.*, 2006, 18, 279-284; Dai *et al.*, *Bioelectrochemistry.*, 2006, 70 (2), 250-256), la adsorción en materiales insolubles (Bayramoğlu *et al.*, *Process. Biochem.*, 2005, 40, 3505-3513), la conjugación (Konno *et al.*, *Biomacromolecules*, 2004, 5(2), 342-347), etc. La glucosa oxidasa (GOx), debido a su robustez, es a menudo usada como modelo para probar y desarrollar nuevos sistemas de inmovilización, siendo inmovilizada en diferentes materiales, tales como películas poliméricas (Xian *et al.*, *Electrochem. Comunic.*, 2007, 9 (4), 773-780), geles poliméricos (Wang *et al.*, *Langmuir.*, 2004, 20, 1342-1354) y polímeros conductores (Kuwahara *et al.*, *Synth. Met.*, 2005, 152, 29-35; Tsai *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 2006 22 (4), 495-500).

La microencapsulación es uno de los sistemas de inmovilización enzimática en el que el biocatalizador queda atrapado dentro de una red tridimensional inerte de un polímero siendo la actividad y la carga enzimática superior a la obtenida por unión covalente o simple adsorción. Los microgeles han resultado ser un medio muy adecuado para la inmovilización por atrapamiento de enzimas y su uso como parte biológica de un biosensor amperométrico enzimático ha dado muy buenos resultados. La estabilidad de la enzima en estas matrices suele ser el factor que determina el tiempo de vida del biosensor, pero además, este sistema de inmovilización presenta ventajas adicionales como su facilidad de manipulación y adaptación a distintos diseños, estabilidad, control del tamaño de poro, así como mayor superficie de contacto entre la enzima y el sustrato. A pesar de estas ventajas, es difícil encontrar en la bibliografía biosensores con enzimas inmovilizadas en micropartículas. En este sentido han surgido derivados vítreos conocidos como "sol-gel" (Gill *et al.*, *Trends Biotechnol.* 2000,18, 282-296; Andreescu *et al.*, *Anal. Chim. Acta.* 2002, 464, 171), que debido a su baja conductividad, se han utilizado en el diseño de biosensores ópticos, pero rara vez en los amperométricos, para este fin requieren la adición de un mediador. Hasta el momento se han propuesto micropartículas de poli(acrilamida) (Rubio *et al.*, *Talanta.* 2005, 68 (1), 99-107; Hervás *et al.* *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22 (3), 429-439), metacrilato (Podual *et al.*, *J. Control. Release.*, 2003, 67 (1), 9-17), alginato (Kim *et al.*, *J. Control. Release.*, 2005, 102 (3), 525-538), líquidos iónicos (Sánchez-Paniagua *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21 (12), 2320-2328), y micropartículas magnéticas porosas (Yu *et al.*, *Sens. Act. B.* 2006, 113, 749-754; Yu *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22 (11), 2707-2711).

En la patente ES 2246135 se describen partículas de un microgel polimérico - poli(acrilamida) y poli(ácido acrílico)- con enzima (glucosa oxidasa) inmovilizada en su interior, un procedimiento de síntesis de dichas partículas y su uso en biosensores de glucosa. El biosensor conteniendo estas micropartículas presenta una respuesta constante a la concentración de glucosa durante, al menos, 120 días.

La presente invención se refiere a un material polimérico biocompatible basado en PEGMEM (un ejemplo de la biocompatibilidad de este material se refleja en la patente americana US 7160971, así como por Potoczek *et al.*, *Ceram. Int.*, 2004, 30, 793-799) en forma de micropartículas donde se pueden inmovilizar enzimas. Las enzimas así inmovilizadas presentan una gran estabilidad, de forma que después de 6 meses la actividad de la misma disminuye solamente en un 5% y después de 18 meses la enzima conserva un 85% de su actividad inicial.

Esta extraordinaria estabilidad de las enzimas inmovilizadas en microgeles basados en PEGMEM y su biocompatibilidad hacen que estos microgeles, con enzimas atrapadas en su interior, sean muy útiles como material biológico fijado a la superficie electrónica por una membrana de diálisis en biosensores amperométricos para la determinación de analitos y su aplicación en estudios "in vivo". Los biosensores conteniendo microgeles de PEGMEM con glucosa oxidasa atrapada presentan una respuesta constante a la concentración de glucosa durante, al menos, 480 días.

60 **Descripción de la invención**

Microgeles biocompatibles estables para inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos.

La presente invención está referida a microgeles biocompatibles, posterior inmovilización enzimática por atrapamiento en dichos microgeles y su uso como material biológico en un biosensor amperométrico que permite la determinación de un analito en disoluciones acuosas.

El biosensor se prepara con micropartículas compuestas por p-PEGMEM en las que la enzima se encuentra en el interior de las micropartículas. La síntesis de las micropartículas se realiza por emulsión concentrada donde la fase continua oleosa está formada por una mezcla de dodecano y Span80. Para obtener la fase dispersa acuosa, se utiliza una disolución tampón de fosfato de sodio en la que se disuelven el monómero PEGMEM, el agente entrecruzante N,N'-metilén-bisacrilamida y el agente iniciador de la reacción polimérica, que en este caso es persulfato de amonio. Finalmente se incorpora la enzima. Para evitar el efecto negativo del oxígeno en la reacción de polimerización, el oxígeno disuelto en la mezcla se elimina por desplazamiento mediante burbujeo de nitrógeno.

Una vez conseguida la emulsión concentrada, de aspecto lechoso, para que comience la polimerización se añade al sistema N,N,N'-trimetil-etilén-diamina que actúa como acelerador de la reacción. Se controla la temperatura de polimerización para asegurarse de que no se sobrepasa la temperatura de desnaturalización de la enzima. El sistema se mantiene en agitación hasta completar la polimerización.

Las partículas de gel se extraen mediante precipitación con una disolución tampón fosfato y posterior centrifugado. Finalmente, las partículas se liofilizan y se conservan en cámara frigorífica.

Las enzimas así inmovilizadas mantienen su actividad constante durante largos periodos de tiempo, permitiendo su uso como material biológico para la preparación de biosensores.

Las medidas de glucosa con el biosensor se llevan a cabo mediante amperometría, en una celda electroquímica termostatazada que consta del biosensor o electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de calomelanos saturado como electrodo de referencia, midiendo la corriente cuando se alcanza el estado estacionario, a un potencial constante de +0,6V versus ECS, en disoluciones tampón de fosfato sódico pH 6,5.

La cuantificación electroquímica convencional de glucosa incluye un procedimiento basado en la combinación de GOx como enzima y un electrodo para la medida del peróxido de hidrógeno. La enzima GOx oxida selectivamente  $\beta$ -D-glucosa, como sustrato a D-glucono- $\delta$ -lactona utilizando oxígeno como mediador electrónico. Este oxígeno se reduce a peróxido de hidrógeno durante la reacción de oxidación por GOx en presencia de oxígeno. Se mide la concentración de peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática, mediante el electrodo. Esta concentración es proporcional al contenido de glucosa en la muestra. De esta forma resulta posible cuantificar la glucosa.

En el caso de los biosensores de glucosa es habitual observar, al potencial de trabajo utilizado (+0,6V), interferencias causadas por la oxidación de otras sustancias (en el suero por ejemplo, el ácido ascórbico y ácido úrico interfieren en la medida de glucosa. Existen distintos métodos para eliminar las interferencias; uno de ellos consiste en disminuir el potencial de trabajo mediante la incorporación de mediadores (ES 2244646), pero presenta como inconveniente la incorporación de una nueva especie, el mediador, dando como resultado biosensores más complejos. Otro método consiste en incluir una barrera física depositada sobre la superficie electrónica que impida el contacto de las especies interferentes con la superficie del electrodo, es el caso del Nafion<sup>®</sup>, que al presentar una carga negativa neta, impide el acceso de estos ácidos (cargados negativamente al pH de trabajo, 6,5) al electrodo, suprimiendo así la interferencia (Lim *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2341-2346).

### Descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de las características de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva se acompañan una serie de figuras que representan lo siguiente:

La Figura 1 muestra una microfotografía de los microgeles con la enzima inmovilizada en su interior.

La Figura 2 muestra el esquema de un biosensor para la determinación de un analito con los microgeles con la enzima en su interior como material biológico, donde pueden apreciarse las distintas partes que componen el sistema: (1) el contacto eléctrico, (2) el soporte de teflón, (3) superficie electrónica, (4) la membrana de diálisis y (5) los microgeles con la enzima.

En la Figura 3 se representa la respuesta del biosensor amperométrico, preparado con micropartículas de p-poli-etilenglicol metil éter metacrilato y enzima (GOx), frente a la concentración de analito (glucosa).

La Figura 4 representa las intensidades de corriente generadas en el biosensor amperométrico preparado con micropartículas de p-poli-etilenglicol metil éter metacrilato y glucosa oxidasa frente a concentraciones de 0,25 mM de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico, para biosensores sin película de Nafion<sup>®</sup> (a), y con película de Nafion<sup>®</sup> sobre la superficie electródica (b).

En la Figura 5 se representa la respuesta del biosensor a la glucosa a lo largo de un período de 540 días (18 meses) tras su preparación. Los límites de control superior (a) e inferior (b) se consideran como  $\pm 3$  \* la desviación estándar del valor medio de 10 medidas sucesivas.

**Modo de realización de la invención**

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos a su alcance.

## 5 Ejemplo 1

*Método de obtención de micropartículas de polímero de la invención, en las que se produce la inmovilización enzimática*

10 La inmovilización de la enzima se realiza durante la síntesis de las micropartículas e incluye los siguientes pasos:

A. *Preparación de una emulsión concentrada acuosa/oleosa incluyendo el enzima en la fase acuosa*

15 La fase oleosa externa está formada por una relación 3:1 entre los componentes dodecano: Span80, siendo en este caso, 1,5 ml de dodecano y 0,5 ml de Span80.

La fase acuosa interna se obtiene empleando una disolución tampón de fosfato 0,1 M de pH 6,0, en la cual se disuelve el monómero polietilenglicol metil éter metacrilato hasta una concentración final de 0,21 M y 2,85 mg de N,N'-metilén-bisacrilamida como agente entrecruzante. Se añade persulfato de amonio 10,96 mM, como agente iniciador. 20 En este ejemplo se ha inmovilizado 425 UI·mL<sup>-1</sup> de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, que se disuelve en la fase interna acuosa. La mezcla se somete a burbujeo de nitrógeno para eliminar el oxígeno.

La obtención de la emulsión concentrada se lleva a cabo inyectando gota a gota la fase acuosa sobre la fase oleosa, bajo agitación continua.

25 B. *Síntesis de las micropartículas por polimerización de la emulsión concentrada*

Preparada la emulsión se añaden a la misma 30 microlitros de N,N,N'-trimetil-etilen-diamina, iniciando la reacción de polimerización. La emulsión se mantiene en agitación continua, la cual se da por terminada al cabo de 90 minutos, controlando la temperatura siempre por debajo de la temperatura de desnaturalización de la enzima.

C. *Recuperación de las micropartículas*

35 Las micropartículas de gel obtenidas (de aspecto lechoso) se extraen mediante precipitación con una disolución tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0 y centrifugando a 4500 rpm durante 20 minutos.

D. *Conservación de las micropartículas*

40 Las micropartículas obtenidas se liofilizan durante 12 horas y se conservan en el congelador a -10°C.

La Figura 1 muestra las micropartículas obtenidas de la reacción, las cuales están compuestas por polietilenglicol metil éter metacrilato con N,N'-metilén-bis-acrilamida como agente entrecruzante, en cuyo interior se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa. La forma de las partículas es esférica y sus dimensiones varían desde 2 hasta 12 μm.

## 45 Ejemplo 2

*Biosensor amperométrico de glucosa con las micropartículas de polímero de la invención*

50 El biosensor consta de un transductor (electrodo de platino) y el material biológico, que en esta invención son los microgeles de PEGMEM con GOx inmovilizada en su interior, obtenidas según el ejemplo 1, fijadas a la superficie del electrodo mediante una membrana de diálisis. El esquema del biosensor se muestra en la Figura 2.

La Figura 3 refleja la respuesta del biosensor amperométrico en función de la concentración de glucosa. Se puede observar cómo dicha respuesta se ajusta a un comportamiento Michaelis-Menten, presentando un índice de Hill de 1,05 y una constante de Michaelis-Menten aparente K<sub>M</sub> de 9 mM, resultados que muestran como la matriz polimérica protege a la enzima sin influir en su cinética y actividad enzimática.

## Ejemplo 3

60 *Biosensor amperométrico de glucosa con las micropartículas de polímero de la invención con película de Nafion® en la superficie eléctrica*

El biosensor consta de un transductor (electrodo de platino), sobre cuya superficie se depositan 50 μL de una solución de Nafion® al 5% (p/p) que se deja secar al aire durante 15 minutos, y después, se somete a 80°C durante 45 minutos. Posteriormente, las micropartículas de la invención se colocan sobre la película de Nafion® y se fijan al electrodo con una membrana de diálisis (GOx-Nafion®-Biosensor). En la Figura 4 se observan las intensidades de corriente producidas en el biosensor amperométrico preparado con el biosensor del ejemplo 2, frente a concentraciones de 0,25 mM de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico, para biosensores sin película de Nafion® en la superficie

## ES 2 320 078 B1

electrónica (a), así como las intensidades de corriente producidas en el biosensor del ejemplo 3, que contiene la película de Nafion® en la superficie electrónica (b), comprobándose en este último caso cómo se eliminan las interferencias.

### Ejemplo 4

5

*Biosensor amperométrico de glucosa con las micropartículas de polímero de la invención para la medida de glucosa en sueros*

10 El estudio de la concentración de glucosa en 5 muestras de sueros fue analizada con los biosensores amperométricos de los ejemplos 2 y 3. Además, como método de referencia para la determinación de glucosa de estos sueros se utilizó el método espectrofotométrico de hexoquinasa descrito por Young., *ACC Press, Washington, 1990*.

15 Con el biosensor preparado sin película de Nafion® los valores de glucosa encontrados en los sueros fueron siempre mayores que los obtenidos con el método de referencia con diferencias entre 1,0-4,5%, debido a que las especies interferentes presentes en la muestra generan corriente en el biosensor. sin embargo, las medidas de glucosa en suero obtenidas con el biosensor que contiene la capa de Nafion® fueron similares a las conseguidas con el método de referencia y las diferencias entre ellos nunca fueron mayores del 1,3%, lo que indica que la película de Nafion® elimina dichas las interferencias, obteniéndose un biosensor más selectivo a glucosa y con una buena precisión (RSD ≤ 2,2%). En la tabla se muestran los resultados obtenidos tanto por el método de referencia como por los dos biosensores descritos en los ejemplos 2 y 3.

25 MUESTRA	GLUCOSA (mg/dl) Método de Referencia	GLUCOSA <sup>a</sup> (mg/dl) GOx-biosensor	RSD (%)	GOx-biosensor <sup>b</sup> (%)	GLUCOSA <sup>a</sup> (mg/dl) GOx-Nafion® biosensor	RSD (%)	GOx-Nafion® biosensor <sup>b</sup> (%)
1	81,0	82,6±1,3	1,7	+2,0	80,9±1,0	1,3	-0,1
30 2	89,0	92,8±2,0	2,3	+4,3	88,8±2,0	2,2	-0,2
3 3	176,0	178,6±0,2	1,2	+1,5	174,1±0,9	1,9	-1,1
35 4	116,0	117,2±1,5	1,2	+1,0	115,1±1,2	1,8	-0,8
5 5	89,0	93,0±1,2	2,0	+4,5	87,8±1,1	1,3	-1,3

40

<sup>a</sup> Media de 3 medidas

<sup>b</sup> Diferencia entre los resultados del método de referencia y del biosensor

45

### Ejemplo 5

*Estabilidad de la actividad enzimática en el biosensor amperométrico de glucosa con las micropartículas de polímero de la invención*

50

El estudio de la estabilidad del biosensor amperométrico utilizando los microgeles del ejemplo 1 con la enzima inmovilizada, se constató al comprobar como la respuesta del biosensor a una misma concentración de glucosa permanece constante durante al menos 480 días, según muestra la Figura 5.

55

### Ejemplo 6

*Estabilidad de las micropartículas de polímero de la invención*

60

Los microgeles descritos en el ejemplo 1 una vez liofilizados mantienen su morfología y su actividad enzimática al menos 24 meses después de su preparación.

65

REIVINDICACIONES

5 1. Microgeles biocompatibles **caracterizados** porque contienen polietilenglicol metil éter metacrilato como monómero y N,N'-metilen-bis-acrilamida como agente entrecruzante y enzimas inmovilizadas en su interior por atrapamiento, manteniendo su actividad durante, al menos, 24 meses después de su preparación.

10 2. Método de obtención de microgeles biocompatibles con enzima inmovilizada en su interior según reivindicación 1 **caracterizado** porque utiliza una emulsión concentrada, donde la fase acuosa consiste en una disolución tampón de fosfato de sodio que contiene polietilenglicol metil éter metacrilato (PEGMEM), N,N'-metilen-bis-acrilamida, persulfato de amonio y enzima.

15 3. Uso de los microgeles biocompatibles con enzima inmovilizada en su interior descritos en la reivindicación 1 como parte de un biosensor para la determinación amperométrica de un analito disuelto en una solución acuosa donde los microgeles se depositan sobre la superficie de un electrodo de platino, formando el material biológico.

20 4. Uso de los microgeles biocompatibles con enzima inmovilizada en su interior descritos en las reivindicación 1 como parte de un biosensor para la determinación amperométrica de un analito disuelto en una solución acuosa donde los microgeles poliméricos se fijan a la superficie del electrodo de platino modificado por una membrana de diálisis.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

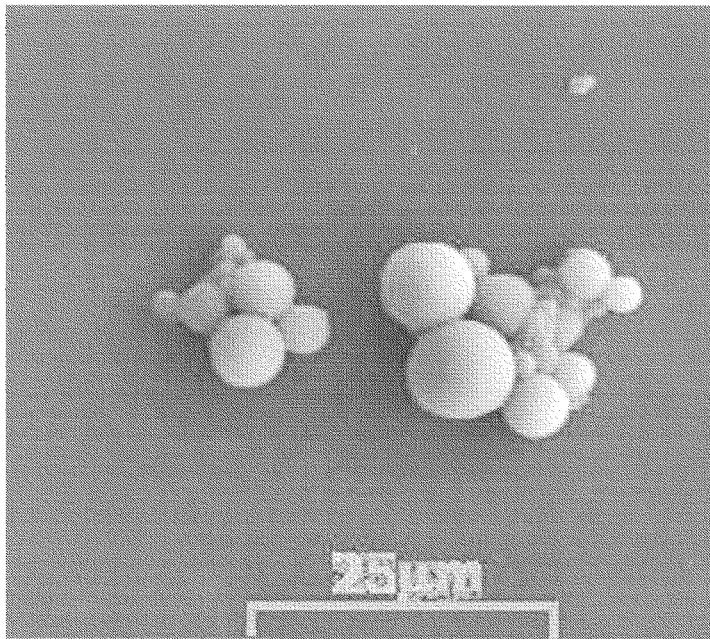


FIGURA 2

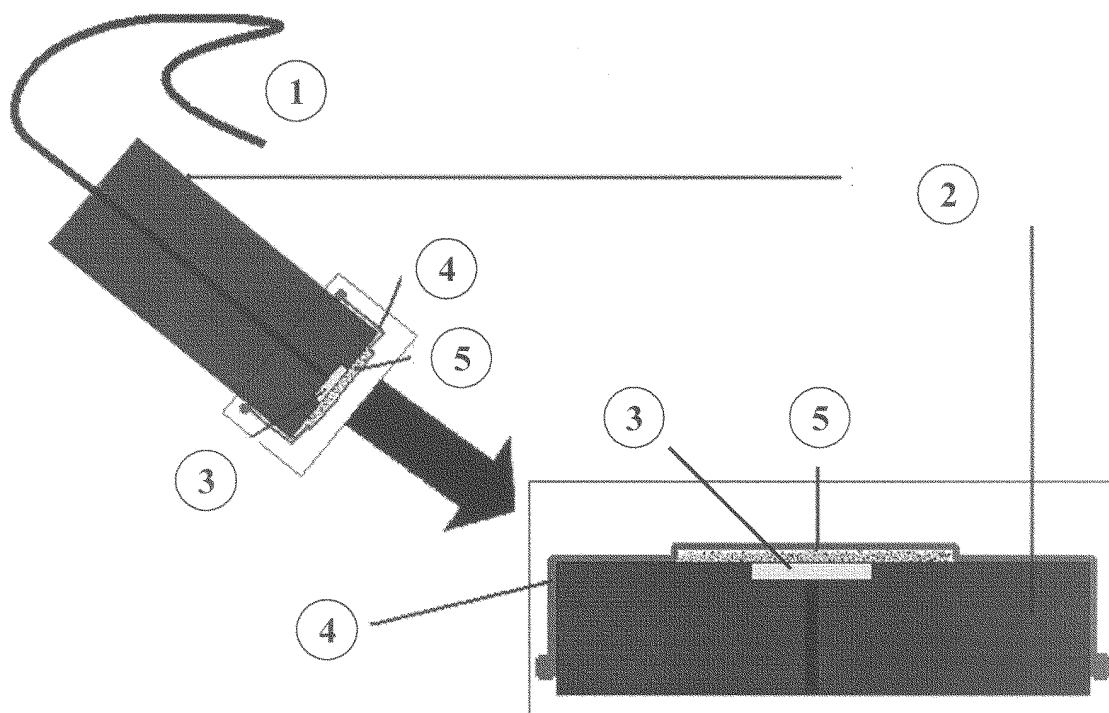




FIGURA 3

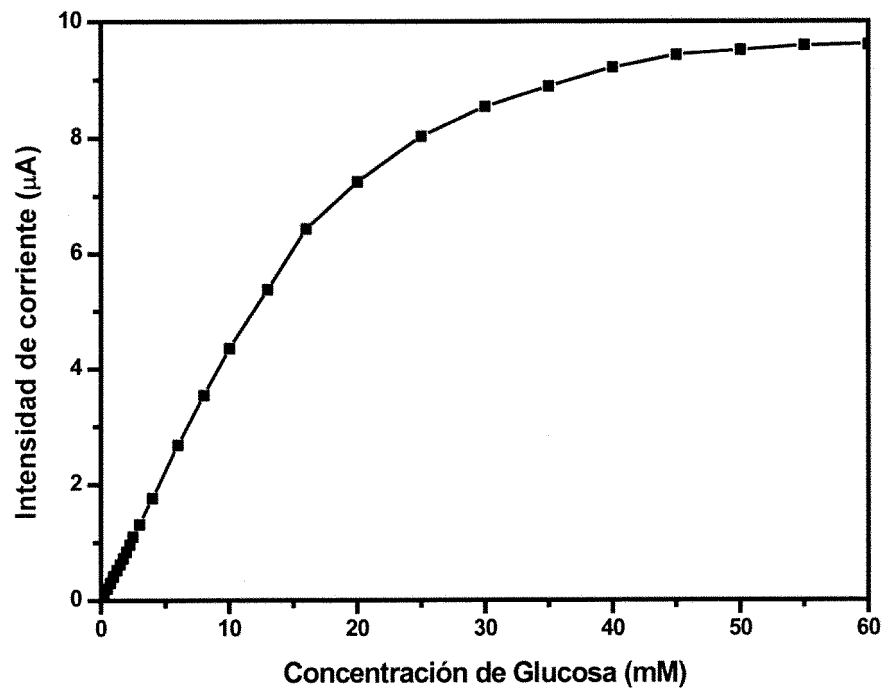


FIGURA 4

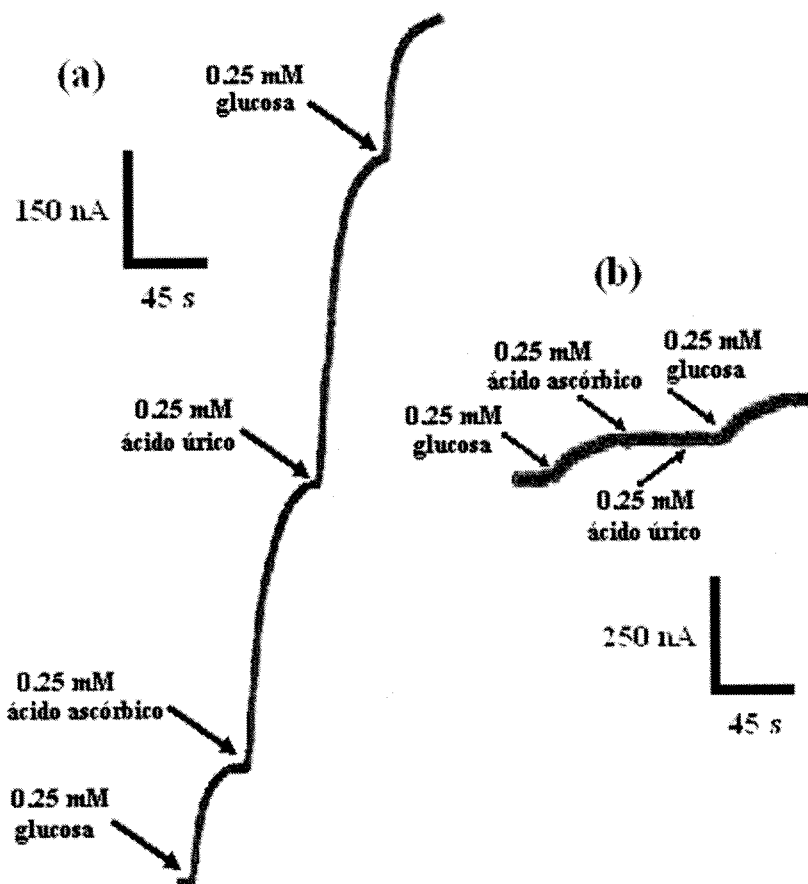
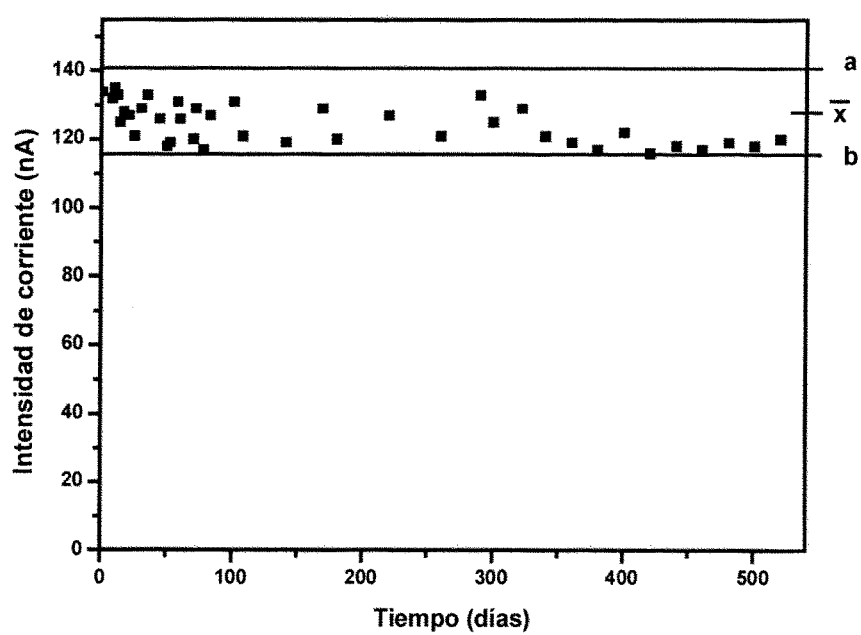


FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 320 078

② Nº de solicitud: 200702402

③ Fecha de presentación de la solicitud: 07.09.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	HERVÁS PÉREZ, J.P. et al. "Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels". Biosensors and Bioelectronics, 2006, Volumen 22, páginas 429-439. Ver especialmente apartado 2 (Experimental), páginas 430-431.	1-4
Y	POTOCZEK, M. & ZAWADZAK, E. "Initiator effect on the gelcasting properties of alumina in a system involving low-toxic monomers". Ceramics International, 2004, Volumen 30, páginas 793-799. Ver resumen; apartados 2.1 y 2.3.	1-4
Y	HERVÁS PÉREZ, J.P. et al. "The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors". Biomolecular Engineering, 2006, Volumen 23, páginas 233-245. Ver especialmente apartados 2, 3 y 6; tabla 2.	1-4
Y	SIGMUND, W.M. et al. "Novel Powder-Processing Methods for Advanced Ceramics". Journal of the American Ceramic Society, 2000, Volumen 83, Número 7, páginas 1557-1574. Ver página 1568, tabla V.	1-4
Y	PODUAL, K. et al. "Preparation and dynamic response of cationic copolymer hydrogels containing glucose oxidase". Polymer, 2000, Volumen 41, páginas 3975-3983. Ver especialmente apartado 2, páginas 3976-3978.	1,2
Y	JANNEY, M.A. et al. "Development of Low-Toxicity Gelcasting Systems". Journal of the American Ceramic Society, 1998, Volumen 81, Número 3, páginas 581-591. Ver apartado II; tabla III, experimento 7.	1-2

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

27.04.2009

**Examinador**

G. Esteban García

**Página**

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 11/04** (2006.01)

**C08F 220/20** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)