

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 879**

51 Int. Cl.:

A61B 5/145 (2006.01)

A61B 5/1486 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009** **E 09812678 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 2348964**

54 Título: **Sistema de electrodos para medir una concentración de analito bajo condiciones in vivo**

30 Prioridad:

11.09.2008 EP 08015982

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

09.10.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

QUARDER, ORTRUD;
MISCHLER, REINHOLD;
RIEGER, EWALD;
STAIB, ARNULF;
GILLEN, RALPH y
KAMECKE, ULRIKE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 424 879 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de electrodos para medir una concentración de analito bajo condiciones *in vivo*.

5 La invención se refiere a un sistema de electrodos para medir una concentración de analito bajo condiciones *in vivo* que presenta las características especificadas en el preámbulo de la reivindicación 1. Un sistema de electrodos de este tipo es conocido a partir del documento nº WO2007/147475.

10 Los sensores con sistemas de electrodos implantables o insertables facilitan la realización de mediciones de analitos fisiológicamente significativos tales como, por ejemplo, lactato o glucosa en el tejido corporal de un paciente. Los electrodos de trabajo de los sistemas de este tipo presentan capas enzimáticas eléctricamente conductoras en las que se unen moléculas de enzima que liberan portadores de carga mediante conversión catalítica de las moléculas de analito. En el procedimiento se genera una corriente eléctrica como señal de medida, la amplitud de la cual se correlaciona con la concentración del analito.

15 La conductividad eléctrica de las buenas capas de enzimas debe ser tan alta como resulte posible para permitir que los portadores de carga que resultan liberados sean detectados como señal de medida de la manera más completa posible; deben ser suficientemente permeables al agua para permitir que las moléculas de analito se difundan desde el líquido corporal acuoso, habitualmente líquido intersticial o sangre, hasta el interior de la capa de enzima, y finalmente deben unirse a las moléculas de enzima contenidas en la misma de la manera más completa posible, de manera que no puedan fugarse hacia el tejido corporal circundante.

20 Pueden prepararse capas de enzimas adecuadas por ejemplo a partir de negro de platino, el cual puede impregnarse con solución de enzima y que muestra una buena permeabilidad al agua debido a su estructura de tipo esponjoso, o a partir de partículas eléctricamente conductoras, por ejemplo partículas de carbono o metal, y un agente ligante. Las capas de enzimas de este tipo habitualmente son frágiles. Por ello, la capa de enzima del electrodo de trabajo de los sensores conocidos cubre únicamente un área muy reducida, habitualmente sólo una fracción de un milímetro cuadrado. Un ejemplo de lo anterior es el sistema de electrodos conocido a partir de la patente US nº 4.655.880, en la que el conductor del electrodo de trabajo se extiende sólo sobre aproximadamente 200 mm. Con el fin de incrementar la densidad local de corriente, se proporciona a este conductor un recubrimiento eléctricamente aislante en el que se graban pequeños orificios de aproximadamente 10 mm antes de recubrir el conductor en toda su longitud con una pasta que contiene enzima con el fin de formar una capa de enzima.

25 Sin embargo, a pesar de investigación y desarrollo extensivos, los sistemas de electrodos conocidos son susceptibles a interferencias y se asocian a la desventaja de que pueden utilizarse para determinar la concentración de un analito sólo con una precisión y fiabilidad inferiores a las factibles utilizando un análisis *ex vivo* convencional.

30 Con el fin de incrementar la precisión de las mediciones, el documento nº US2005/0059871 A1 propone medir la concentración de analito de interés utilizando múltiples electrodos de trabajo simultáneamente y analizar estadísticamente las mediciones obtenidas de esta manera. A modo de medida adicional, se propone utilizar sensores adicionales para determinar otras concentraciones de analito o parámetros fisiológicos y someter a ensayo la verosimilitud de los resultados individuales basándose en la concentración de los diferentes analitos obtenidos de esta manera.

35 Sin embargo, la utilización de un gran número de electrodos de trabajo no sólo incrementa la utilización de equipos, sino que también conduce a un problema de señales de medición inconsistentes de los electrodos de trabajo individuales, de manera que no se conoce inequívocamente cuál de los diferentes valores medidos refleja con exactitud la concentración de analito en el cuerpo del paciente.

40 Por lo tanto, el objetivo de la invención es diseñar una manera de medir la concentraciones de analito en un cuerpo humano o animal de manera más fiable y más exacta.

45 Este objetivo se cumple mediante un sistema de electrodos para la medición *in vivo* de la concentración de un analito, que presenta las características especificadas en la reivindicación 1. Los desarrollos ventajosos de la invención son la materia de la subreivindicaciones.

50 La invención proporciona la capa de enzima del electrodo de trabajo en forma de múltiples campos que se disponen separados por una distancia sobre el conductor del electrodo de trabajo. Preferentemente, por lo menos dos de estos campos se encuentran separados por como mínimo 3 milímetros, preferentemente por como mínimo 5 milímetros. Por ejemplo, puede proporcionarse una serie de múltiples campos, en la que la distancia entre el primer y el último campo de la serie es superior a 5 milímetros. Los campos individuales de un electrodo de trabajo según la invención básicamente forman una serie de electrodos de trabajo que se encuentran dispuestos en serie. Entre estos campos, el conductor del electrodo de trabajo puede recubrirse con una capa de aislamiento. Mediante la disposición de los campos de la capa de enzima sobre las aberturas de una capa eléctricamente aislante, puede mejorarse la relación de señal a ruido.

La invención también permite realizar mediciones significativamente más fiables de una concentración de analito en tejido del cuerpo de un paciente. Al proporcionar la capa de enzima de un electrodo de trabajo en forma de campos individuales, por ejemplo separados por una distancia de como mínimo 3 milímetros, preferentemente como mínimo 5 milímetros, puede medirse la concentración de analito en un volumen de tamaño correspondiente. Las influencias interferentes que afectan sólo a un elemento de volumen pequeño con un diámetro de aproximadamente 0,1 mm son, por lo tanto, insignificantes en un sistema de electrodos según la invención. Inesperadamente, una fracción importante de los problemas observados durante las mediciones *in vivo* utilizando sensores conocidos aparentemente se basan simplemente en el hecho de que, debido al pequeño tamaño de la capa de enzima, la concentración de analito se mide en un elemento de volumen tan pequeño que con frecuencia no resulta representativo del resto del cuerpo del paciente debido a efectos locales transitorios.

Para la expansión de la capa de enzima a una distancia lineal de unos cuantos milímetros o más, el electrodo de trabajo debe ser flexible de manera que pueda ajustar su forma a los movimientos del cuerpo. Sin embargo, las propiedades relativamente frágiles del material de las capas conductoras de enzima conocidas aparentemente provocan que resulte imposible fabricar un electrodo de trabajo flexible. Sin embargo, la medición según la invención, es decir el diseño de la capa de enzima en forma de múltiples campos que se disponen separados por cierta distancia sobre el conductor del electrodo de trabajo, permite que el electrodo de trabajo sea plegable sin que se desprenda la capa de enzima a pesar de las propiedades frágiles del material de la capa de enzima.

La causa de que las mediciones con los electrodos de trabajo convencionales, cuya área efectiva, es decir, la capa de enzima, se extiende sobre menos de 0,2 milímetros cuadrados, sean erróneas se considera que se debe a que los movimientos del paciente puede impedir transitoriamente el intercambio de líquidos en un elemento de volumen pequeño, por ejemplo al resultar presionadas algunas células contra el electrodo de trabajo y resultar desplazado el líquido intersticial o porque los vasos capilares resultan comprimidos y, de esta manera, obstruidos. Presumiblemente ello puede conducir a que la concentración de analito en el elemento de volumen correspondiente en el entorno inmediato del electrodo de trabajo no sea representativo del resto del cuerpo del paciente. Estos elementos volumétricos, en los que se bloquea transitoriamente el intercambio de líquidos, aparentemente, sin embargo, resultan muy pequeños y habitualmente presentan un diámetro inferior a 1 mm. Es probable que la consistencia elástica y blanda del tejido corporal permita que se relajen la fuerzas en distancias muy cortas y que, por lo tanto, el intercambio de líquidos corporales resulte adversamente afectado sólo en elementos volumétricos que son de este pequeño tamaño. Al disponer por lo menos algunos de los campos que forman la capa de enzima en un sistema de electrodos según la invención distribuidos en una distancia substancial, por ejemplo separados por una distancia de como mínimo 5 mm, preferentemente separados por una distancia de 1 cm, por lo tanto permite que sólo una parte pequeña, habitualmente negligible, del electrodo de trabajo resulte adversamente afectada incluso en el caso más desfavorable.

En este contexto, la distancia entre dos campos de la capa de enzima de un electrodo de trabajo según la invención debe medirse desde el límite de un campo hasta el límite de otro campo enfrentado con el primero.

En este contexto, la distancia entre dos campos contiguos preferentemente es de como mínimo 0,3 milímetros, en particular de como mínimo 0,5 milímetros. Cada uno de los campos individuales preferentemente se extiende menos de dos milímetros, preferentemente menos de un milímetro, en particular menos de 0,6 milímetros, en dos direcciones que son perpendiculares entre sí. Los campos pueden ser, por ejemplo, círculos con un diámetro inferior a 1 milímetro o rectángulos con una longitud de lado inferior a 1 milímetro. Preferentemente, los campos se disponen en una fila sobre el conductor del electrodo de trabajo. Sin embargo, también resulta factible, por ejemplo, disponer los campos en varias filas y columnas sobre un conductor circular o rectangular. El número de campos puede seleccionarse de manera virtualmente libre. Sin embargo, el electrodo de trabajo preferentemente presenta por lo menos 5 campos.

El electrodo de trabajo de un sistema de electrodos según la invención se proporciona con una barrera a la difusión que decelera la difusión del analito desde el líquido corporal que circunda el sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima que se encuentran inmovilizadas en la capa de enzima. La barrera de difusión puede ser, por ejemplo, una capa que recubre la capa de enzima. Sin embargo, resulta igualmente factible que las partículas inhibidoras de la difusión se incorporen en la capa de enzima sirviendo de barrera a la difusión. Por ejemplo, pueden rellenarse poros de la capa de enzima con un polímero a través del cual sólo pueden difundirse moléculas de analito lentamente. Dicho polímero debería ser hidrofílico y presentar una incorporación rápida del agua. Puede utilizarse ventajosamente una barrera a la difusión para reducir el consumo de moléculas de analito en el electrodo de trabajo. En el caso de que los movimientos del paciente interfieran transitoriamente con el intercambio de líquidos corporales en un entorno del campo de capa de enzima del electrodo de trabajo, una tasa de conversión más baja de las moléculas de analito contribuirá a reducir el impacto de dicha interferencia. Cuanto más bajo sea el consumo de analito, más tardarán en producirse efectos de agotamiento, es decir, que la concentración de analito en el área correspondiente caiga como consecuencia de las mediciones que se llevan a cabo.

Un desarrollo ventajoso de la invención proporciona en el electrodo de trabajo un espaciador dispuesto sobre la capa de enzima, visto desde el conductor, permitiendo una distancia mínima entre la capa de enzima y el tejido corporal que circunda las células. El espaciador forma un reservorio para las moléculas de analito. De esta manera

pueden reducirse adicionalmente los impactos de una perturbación transitoria del intercambio de líquidos en el medio circundante al electrodo de trabajo. El espaciador puede ser, por ejemplo, una capa realizada en un polímero biocompatible que facilita el permeado del analito. Puede utilizarse un espaciador para crear un volumen de tampón de analito a partir del cual se suministran los campos de enzima del electrodo de trabajo. De esta manera, puede conseguirse ventajosamente que no se produzca ningún efecto adverso detectable sobre la señal medida, ni siquiera en presencia de perturbaciones sustanciales del intercambio de líquidos en el entorno del campo de capa de enzima durante un periodo de media hora. El espaciador puede proporcionarse igualmente, por ejemplo, en forma de membrana poroso, por ejemplo una membrana de diálisis o una malla. El espaciador preferentemente presenta un grosor de entre 3 y 30 micrómetros. El espaciador puede disponerse sobre una capa de recubrimiento inhibidora de la difusión. Sin embargo, resulta factible igualmente disponer el espaciador directamente sobre la capa de enzima. En este contexto, el espaciado también puede actuar como barrera a la difusión y enlentecer la difusión de las moléculas de analito a la capa de enzima.

El espaciador preferentemente cubre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y, en caso de hallarse presente, el electrodo de referencia en forma de una capa continua. El espaciador preferentemente cubre la superficie implantada completa del sustrato. En el caso de que el espaciador se realice en un material biocompatible, puede reducirse la respuesta del tejido al implante. Con independencia de lo anterior, también resulta preferente que el espaciador se disponga sobre una capa de recubrimiento inhibidora de la difusión y que sea más hidrofílica que la capa de recubrimiento.

Al igual que el conductor eléctrico del contraelectrodo de un sistema de electrodos según la invención, el conductor eléctrico del electrodo de trabajo preferentemente se diseña en forma de camino conductor sobre un sustrato, por ejemplo un camino conductor realizado en metal o grafito sobre una placa de plástico. Sin embargo, resulta factible igualmente diseñar el conductor en forma de cables. Los campos de capa de enzima pueden disponerse sobre un conductor que se diseña en forma de un cable, por ejemplo en forma de segmentos en forma de anillo. En el caso de segmentos en forma de anillo sobre un cable, el objetivo explicado anteriormente, es decir que cada uno de los campos individuales se extiende menos de 2 milímetros, más preferentemente menos de un milímetro, en particular menos de 0,6 milímetros, en dos direcciones que son perpendiculares entre sí, debe entenderse que se refiere a que la anchura del anillo y su diámetro son dos direcciones que son perpendiculares entre sí.

La utilización de cables metálicos y caminos conductores sobre un sustrato permite diseñar un sensor flexible que puede doblarse 90 grados y más en el interior del cuerpo de un paciente sin romperse.

Es común que los caminos conductores se extiendan sólo en una única cara del sustrato. Sin embargo, en principio resulta igualmente factible que el conductor único se extienda en caras opuestas del sustrato, por ejemplo a través de un orificio pasante o envolviendo un borde lateral.

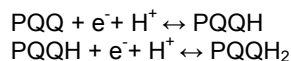
Otro desarrollo ventajoso de la invención permite que el enzima interactúe en la capa de enzima con un mediador redox catalítico que reduce o evita la dependencia del oxígeno de la conversión catalítica del analito. Los mediadores redox catalítico de este tipo en ocasiones también se denominan electrocatalizadores, ya que favorecen la transferencia de electrones a componentes conductores del electrodo de trabajo, por ejemplo partículas de grafito en la capa de enzima. Por ejemplo pueden utilizarse como mediadores redox catalíticos el dióxido de manganeso, en forma de pirolusita, u otros óxidos metálicos que oxida el peróxido de hidrógeno catalíticamente y, en el proceso, transfiere electrones a componentes conductores del electrodo de trabajo. Un mediador redox catalítico en forma de un óxido metálico puede reducir ventajosamente el potencial del electrodo de trabajo en más de 100 milivoltios de manera que se reduzca significativamente la influencia de las sustancias interfirientes, por ejemplo ascorbato o ácido úrico, sobre la señal de medición. En el caso de enzimas que oxidan las moléculas de analito y que generan peróxido de hidrógeno en el proceso, la utilización de un mediador redox catalítico de este tipo permite contrarrestar el agotamiento del oxígeno en el entorno del electrodo de trabajo y, por lo tanto, permite que la tasa de conversión dependa únicamente de la concentración del analito, y no de la concentración de oxígeno, en un amplio abanico de concentraciones.

Los compuestos organometálicos, por ejemplo cobalto-ftalocianina, también resultan adecuados como mediadores redox catalíticos que degradan el peróxido de hidrógeno. El mediador redox catalítico puede unirse covalentemente a la molécula de enzima o incluirse en la capa de enzima, por ejemplo en forma de partículas separadas.

Sin embargo, también resulta factible que el mediador redox catalítico lleve a cabo una transferencia directa de electrones. De esta manera, disponer de un mediador redox catalítico unido covalentemente al enzima puede utilizarse para llevar a cabo una oxidación de las moléculas de analito y una transferencia de electrones al electrodo de trabajo sin la etapa intermedia de generación de peróxido de hidrógeno. En una transferencia directa de electrones, un electrón de un grupo prostético del enzima se transfiere directamente al mediador redox catalítico y de ahí a un componente conductor del electrodo de trabajo, por ejemplo grafito o partículas metálicas en la capa de enzima.

Puede llevarse a cabo una transferencia directa de electrones, por ejemplo con enzimas tales como deshidrogenasas que presentan pirroloquinolínquinona (PQQ) como el grupo prostético. En el caso de la glucosa

deshidrogenasa (GlucDH) de *Acinetobacter calcoaceticus*, el enzima transfiere PQQ a un estado reducido durante la oxidación de la glucosa. Este grupo prostético puede unirse covalentemente de manera directa a un conductor mediante nanopartículas de oro con el fin de facilitar una transferencia directa de electrones desde PQQ reducido al conductor. Aparentemente el oxígeno no reacciona con la PQQ reducida, lo que implica que no compite con la transferencia de electrones. Otra manera de transferir los electrones de la PQQ reducida se basa en la comprensión de que la PQQ misma puede encontrarse presente en múltiples estados de oxidación.



y, por lo tanto, puede utilizarse como mediador redox catalítico. De acuerdo con lo anterior, pueden unirse covalentemente moléculas adicionales de PQQ al enzima GlucDH y servir como receptores de electrones procedentes de un bolsillo catalíticamente activo de la proteína, es decir, del grupo prostético PQQ presente en el mismo. Otra opción se basa en una variante de GlucDH (de *Burkholderia cepacia*), la cual presente flavina-adenina-dinucleótido (FAD) como grupo prostético, y presenta la proteína citocromo C en otra subunidad, la cual puede transferir electrones de FADH₂.

Un sistema de electrodos según la invención puede presentar, además, un electrodo de referencia. El electrodo de referencia puede suministrar un potencial de referencia para el electrodo de referencia definido, por ejemplo, por el sistema redox plata/cloruro de plata. Además, un sistema de electrodos según la invención puede presentar además electrodos, por ejemplo electrodos de trabajo adicionales, en particular electrodos de trabajo con diferente sensibilidad de medición, tal como se describe en el documento n° WO2007/0151868 A1.

En combinación con un potencióstato que se conecta al sistema de electrodos y a un amplificador para la amplificación de señales de medición, un sistema de electrodos según la invención forma un sensor. Preferentemente, el amplificador y el potencióstato se disponen sobre una placa de circuito impreso que porta los conductores del contraelectrodo y del electrodo de trabajo. Los electrodos pueden disponerse sobre un sustrato, por ejemplo en forma de una placa de plástico un extremo de la cual se encuentra unida a la placa de circuitos. Resulta igualmente factible integrar una placa de circuito impreso en el sustrato sobre el que se disponen los electrodos. El potencióstato y el preamplificador puede disponerse, por ejemplo, sobre una placa de plástico flexible que forma simultáneamente una placa de circuitos impresos y un sustrato para caminos conductores del sistema de electrodos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito bajo condiciones *in vivo*, que comprende un contraelectrodo que presenta un conductor eléctrico, un electrodo de trabajo que presenta un conductor eléctrico sobre el que dispone una capa de enzima que contiene las moléculas de enzima inmovilizadas para la conversión catalítica del analito, y una barrera a la difusión que enlentece la difusión del analito desde el líquido corporal circundante al sistema de electrodos hacia las moléculas de enzima, en el que la barrera a la difusión es una capa que recubre la capa de enzima, caracterizada porque la barrera a la difusión está realizada en una mezcla de por lo menos dos polímeros. La capa de enzima de dicho sistema de electrodos preferentemente, aunque no necesariamente, se diseña en forma de múltiples campos.

La barrera a la difusión de dicho sistema de electrodos es una solución sólida de por lo menos dos polímeros diferentes, preferentemente de acrilatos. Por lo tanto, la barrera a la difusión puede combinar propiedades favorables de diferentes polímeros con respecto a permeabilidad, incorporación de agua, hinchado y flexibilidad. Uno o todos los polímeros pueden ser acrilatos. Preferentemente uno o todos los polímeros son copolímeros, especialmente copolímero de hidroxietilmetacrilato. Un copolímero es un polímero preparado mediante polimerización de por lo menos dos monómeros diferentes. Se ha encontrado que el hidroxietilmetacrilato presenta una incorporación de agua muy favorable en combinación con un hinchado reducido.

Resulta ventajoso utilizar una mezcla de polímeros que presentan una temperatura de transición vítrea diferente. Por ejemplo, un polímero presenta una temperatura de transición vítrea inferior a 90°C, especialmente inferior a 70°C, mientras que otro polímero presenta una temperatura de transición vítrea superior a 100°C, especialmente superior a 110°C. La temperatura de transición vítrea se mide mediante calorimetría de escaneo diferencial utilizando una tasa de calentamiento de 10°K por minuto. Por ejemplo, la barrera a la difusión puede ser una mezcla de un copolímero de metilmetacrilato e hidroxietilmetacrilato con un copolímero de butilmetacrilato e hidroxietilmetacrilato. Dicha mezcla puede comprender, por ejemplo, entre 5% y 50% en peso de un copolímero de butilmetacrilato e hidroxietilmetacrilato para alcanzar una buena flexibilidad de la barrera a la difusión.

Se explican detalles y ventajas adicionales de la invención basándose en una realización ejemplar haciendo referencia a los dibujos adjuntos. En las figuras:

Figura 1: muestra una realización ejemplar de un sistema de electrodos según la invención.

Figura 2: muestra una vista de detalle de la figura 1.

Figura 3: muestra otra vista de detalle de la figura 1.

Figura 4: muestra una sección a lo largo de la línea de sección CC de la figura 2.

Figura 5: muestra curvas funcionales *in vitro* del sistema de electrodos mostrado en la figura 1 con una capa de

recubrimiento diferente.

Figura 6: muestra ejemplos de mediciones *in vivo* de sistemas de electrodos según la invención, y la figura 7 muestra mediciones *in vitro* comparativas de un sistema de electrodos a diversas concentraciones de oxígeno.

La figura 1 muestra una realización ejemplar de un sistema de electrodos para la inserción en tejido corporal de un ser humano o animal, por ejemplo en tejido epidermis o en tejido graso subcutáneo. En la figura 2 se muestra una magnificación de la vista de detalle A; en la figura 3 se muestra una magnificación de la vista de detalle B. La figura 4 muestra una vista en sección correspondiente a lo largo de la línea de sección CC de la figura 2.

El sistema de electrodos mostrado presenta un electrodo de trabajo 1, un contraelectrodo 2 y un electrodo de referencia 3. Los conductores eléctricos 1a, 2a, 3a se disponen en forma de caminos conductores metálicos, preferentemente realizados en paladio u oro, sobre un sustrato 4. En la realización ejemplar mostrada, el sustrato 4 es una placa de plástico flexible, por ejemplo realizada en poliéster. El sustrato 4 presenta un grosor inferior a 0,5 mm, por ejemplo de entre 100 y 300 micrómetros y, por lo tanto, resulta fácil de doblar de manera que puede adaptarse a los movimientos del tejido corporal circundante tras su inserción. El sustrato 4 presenta un espacio estrecho para la inserción en tejido corporal de un paciente y una cabeza amplia para la conexión a un sistema electrónico que se dispone en el exterior del cuerpo. El espacio del sustrato 4 preferentemente presenta una longitud de por lo menos 1 cm, en particular de entre 2 y 5 cm.

En la realización ejemplar mostrada, una parte del dispositivo de medición, es decir la cabeza del sustrato, sobresale del cuerpo de un paciente durante la utilización. Alternativamente, resulta igualmente factible, sin embargo, implantar el dispositivo de medición completo y transmitir los datos de medición inalámbricamente a un receptor que se dispone en el exterior del cuerpo.

El electrodo de trabajo 1 porta una capa de enzima 5 que contiene moléculas de enzima inmovilizadas para la conversión catalítica del analito. La capa de enzima 5 puede aplicarse, por ejemplo, en forma de una pasta de curado de partículas de carbono, un agente ligante polimérico y moléculas de enzima. Los detalles de la producción de una capa de enzima 5 de este tipo se dan a conocer en, por ejemplo, el documento n° WO2007/147475, al que se hace referencia en este contexto. El analito que debe medirse puede ser, por ejemplo, glucosa, lactato u otras moléculas médicamente significativas. Habitualmente se utiliza una oxidasa como enzima, por ejemplo una glucosa oxidasa o lactato oxidasa, o una deshidrogenasa, por ejemplo glucosa deshidrogenasa.

En la realización ejemplar mostrada, la capa de enzima 5 no se aplica continuamente sobre el conductor 1a del electrodo de trabajo 1, sino por el contrario en forma de campos individuales que se disponen separados por cierta distancia entre sí. Aunque la capa de enzima 5 es frágil, ello implica que el sistema de electrodos puede doblarse sin que se desprenda la capa de enzima 5. Por lo tanto, el sistema de electrodos puede doblarse en más de 90° sin romperse, de manera que puede adaptarse a los movimientos corporales tras su inserción.

Los campos individuales de la capa de enzima 5 en la realización ejemplar mostrada se disponen en serie, en los que la distancia entre el primer y el último campo de esta serie es superior a 1 cm. La distancia es de por lo menos 0,3 mm, en particular superior a 0,5 mm, entre campos vecinos, en el que la distancia debe medirse entre el borde de un campo y el borde del otro campo. Cada uno de los campos individuales se extiende entre 0,2 y 0,6 mm, por ejemplo entre 0,2 y 0,4 mm, en dos direcciones que son perpendiculares. La forma de los campos puede ser, por ejemplo, circular o cuadrada. El área total de todos los campos considerados conjuntamente puede seleccionarse virtualmente de manera libre. En general, resulta suficiente un área total inferior a 1 milímetro cuadrado. El área total en la realización ejemplar mostrada es de aproximadamente 0,4 a 0,6 milímetros cuadrados.

El conductor 1a del electrodo de trabajo 1 presenta sitios estrechos entre los campos de la capa de enzima que se observan particularmente bien en la figura 2. El conductor 2a del contraelectrodo 2 presenta un contorno que sigue el curso del conductor 1a del electrodo de trabajo 1. Ello resulta en una disposición intercalada o interbloqueada del electrodo de trabajo 1 y el contraelectrodo 2 con caminos de corriente ventajosamente cortos y una baja densidad de corriente. El conductor 1a del electrodo de trabajo 1 de la realización ejemplar mostrada está diseñado para ser relativamente estrecho y presenta una anchura inferior a 1 mm. En la realización ejemplar mostrada, el conductor 1a presenta una anchura inferior a 0,6 mm, es decir, de entre aproximadamente 0,3 y 0,5 mm, en sus sitios anchos que se encuentran recubiertos por campos de la capa de enzima 5. En los sitios estrechos interpuestos, los conductores 1a y 2a presentan una anchura inferior a 0,3 mm, es decir, de entre 0,05 y 0,2 mm. Sin embargo, una disposición intercalada de los conductores no es obligatoria. En principio, los conductores 1a, 2a pueden diseñarse igualmente para ser lineales y presentar una anchura constante.

Con el fin de incrementar su superficie efectiva, el contraelectrodo 2 puede dotarse de una capa porosa eléctricamente conductora 6 que se sitúa en forma de campos individuales sobre el conductor 2a del contraelectrodo 2. Al igual que la capa de enzima 5 del electrodo de trabajo 1, esta capa 6 puede aplicarse en forma de una pasta de curado de partículas de carbono y un agente ligante polimérico. Los campos de la capa 6 preferentemente presentan las mismas dimensiones que los campos de la capa de enzima 5, aunque ello no es obligatorio. Sin embargo, las medidas para incrementar la superficie del contraelectrodo pueden evitarse igualmente y el contraelectrodo 2

igualmente puede diseñarse en forma de camino conductor lineal sin recubrimientos de ningún tipo.

El electrodo de referencia 3 se dispone entre el conductor 1a del electrodo de trabajo 1 y el conductor 2a del contraelectrodo 2. El electrodo de referencia mostrado en la figura 3 consiste de un conductor 3a sobre el que se dispone un campo 3b de pasta conductora de plata/cloruro de plata.

La figura 4 muestra una vista esquemática de una sección a lo largo de la línea de sección CC de la figura 2. La línea de sección CC se extiende a través de uno de los campos de capa enzimática 5 del electrodo de trabajo 1 y entre los campos de la capa conductora 6 del contraelectrodo 2. Entre los campos de la capa de enzima 5, el conductor 1a del electrodo de trabajo puede recubrirse con una capa eléctricamente aislante 7, como el conductor 2a del contraelectrodo 2 entre los campos de las capas conductoras 6, con el fin de evitar reacciones de interferencia que de otra manera podrían ser catalizadas por el metal de los caminos conductores 1a, 2a. Por lo tanto, los campos de la capa de enzima 5 se sitúan en orificios de la capa aislante 7. De manera similar, los campos de la capa conductora 6 del contraelectrodo 2 también pueden aplicarse sobre orificios de la capa aislante 7.

La capa de enzima 5 se recubre con una capa de recubrimiento 8 que presenta una resistencia a la difusión del analito que debe medirse y que por lo tanto actúa como barrera a la difusión. La capa de recubrimiento 8 puede consistir, por ejemplo, de poliuretano, un acrilato, en particular un copolímero de metilmetacrilato e hidroxietilmetacrilato u otro polímero que muestre un hinchado menor pero una incorporación rápida del agua. La capa de recubrimiento 8 puede prepararse ventajosamente a partir de una mezcla de por lo menos dos acrilatos diferentes cada uno de los cuales puede ser un copolímero. Pueden conseguirse resultados especialmente favorables mediante la mezcla de un copolímero de metilmetacrilato e hidroxietilmetacrilato con un copolímero de butilmetacrilato e hidroxietilmetacrilato.

Un grosor favorable de la capa de recubrimiento 8 es, por ejemplo, de entre 3 y 30 micrómetros. Debido a su resistencia a la difusión, la capa de recubrimiento 8 provoca que menos moléculas de analito alcancen la capa de enzima 5 por unidad de tiempo. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la capa de recubrimiento 8 reduce la tasa a la que las moléculas de analito resultan convertidas, y por lo tanto, contrarresta la reducción de la concentración de analito.

La capa de recubrimiento 8 se extiende de manera continua esencialmente en todo el área del conductor 1a del electrodo de trabajo 1. Sobre la capa de recubrimiento 8 se aplica una membrana biocompatible en forma de espaciador 9 que establece una distancia mínima entre la capa de enzima 5 y las células del tejido corporal circundante. Lo anterior implica generar ventajosamente un reservorio para las moléculas de analito a partir del que éstas pueden alcanzar el campo correspondiente de la capa de enzima 5 en el caso de una perturbación transitoria del intercambio de líquidos en el entorno de un campo de la capa de enzima 5. En el caso de que el intercambio de líquidos corporales en el entorno del sistema de electrodos se encuentre transitoriamente limitado o incluso bloqueado, las moléculas de analito almacenadas en el espaciador 9 siguen difundiéndose hacia la capa de enzima 5 del electrodo de trabajo 1, en donde son convertidas. Por lo tanto, el espaciador 9 provoca una notable reducción de la concentración de analito y la correspondiente falsificación de los resultados de medición sólo tras un periodo de tiempo significativamente más largo. En la realización ejemplar mostrada, la membrana que forma el espaciador 9 también convierte el contraelectrodo 2 y el electrodo de referencia 3.

La membrana espaciadora 9 puede ser, por ejemplo, una membrana de diálisis. En este contexto, se entiende que una membrana de diálisis es una membrana que es impermeable a las moléculas de tamaño superior a un máximo.

La membrana de diálisis puede prefabricarse en un procedimiento de fabricación separado y seguidamente puede aplicarse durante la fabricación del sistema de electrodos. El tamaño máximo de las moléculas para el que es permeable la membrana de diálisis se selecciona de manera que las moléculas de analito puedan pasar, mientras que las moléculas de mayor tamaño resultan retenidas.

Alternativamente, en lugar de una membrana de diálisis, puede aplicarse un recubrimiento realizado en un polímero que es muy permeable al analito y al agua, por ejemplo basado en poliuretano, sobre el sistema de electrodos a modo de membrana espaciadora 9.

La capa de enzima 5 puede contener partículas de óxido metálico, preferentemente partículas de dióxido de manganeso, a modo de mediador redox catalítico. El dióxido de manganeso convierte catalíticamente el peróxido de hidrógeno que se forma, por ejemplo, mediante la oxidación enzimática de la glucosa y de otros analitos biológicos. Durante la degradación del peróxido de hidrógeno, las partículas de dióxido de manganeso transfieren electrones a componentes conductores del electrodo de trabajo 1, por ejemplo a partículas de grafito en la capa de enzima 5. La degradación catalítica del peróxido de hidrógeno contrarresta cualquier reducción de la concentración de oxígeno en la capa de enzima 5. Ventajosamente esto permite que la conversión del analito que debe detectarse en la capa de enzima 5 no se encuentre limitada por la concentración local de oxígeno. Por lo tanto, la utilización del mediador redox catalítico contrarresta una falsificación del resultado de medición al ser baja la concentración de oxígeno. Otra ventaja de un mediador redox catalítico es que evita la generación de concentraciones de peróxido de hidrógeno dañinas para las células.

La figura 5 muestra curvas funcionales, medidas bajo condiciones *in vitro*, del sistema de electrodos descrito

anteriormente, con diferentes capas de recubrimiento 8. La intensidad medida de la corriente, en nA, se proporciona en el gráfico como una función de la concentración de glucosa, en mg/dl, en forma de curvas funcionales. La curva funcional superior A se midió con un sistema de electrodos cuya membrana de recubrimiento 8 realizada en poliuretano hidrofiliado presenta un grosor de cinco micrómetros. A título comparativo se muestra, como curva funcional inferior B, la dependencia de la corriente de la concentración de glucosa para un sistema de electrodos que presenta una membrana de recubrimiento 8 que presenta aproximadamente dos veces la resistencia a la difusión de las moléculas de analito, por ejemplo debido a un grosor correspondientemente mayor o una menor hidrofiliación. Los sistemas de electrodos de las curvas funcionales mostradas en la figura 5 se hicieron funcionar con un voltaje de polarización de 350 mV.

Los poliuretanos hidrofiliados (HPU) utilizados como capas de recubrimiento pueden producirse mediante policondensación de mezclas de 4,4'-metilén-bis(ciclohexilisocianato) y diol. Los dos componentes de la mezcla de diol, los cuales se utilizaron para ajustar el grado de hidrofiliación del polímero, eran polietilenglicol (PEG, PM (peso molecular)=1.000 g/mol) y polipropilenglicol (PPG, PM (peso molecular)=1.500 g/mol). Para la curva funcional A, la capa de recubrimiento de HPU 8 se produjo a una relación PEG a PPG de 1 a 3. Para la curva funcional B, la capa de recubrimiento de HPU 8 se produjo a una relación PEG:PPG correspondiente a 1:7. La capa de recubrimiento 8 presentaba un grosor aproximado de 5 mm en ambos casos.

Para que la concentración de analito en el entorno del sistema de electrodos resultase influida por la medición en el mínimo grado posible y que por lo tanto resultase falsificada sólo en grado menor incluso con una perturbación transitoria del intercambio de líquidos corporales, resulta ventajoso que las tasas de conversión de analito sean bajas y por lo tanto, que las corrientes de medición sean bajas. Pueden obtenerse buenos resultados con sistemas de electrodos que generan, con un área total de la capa de enzima de 1 mm² o menos, una corriente inferior a 50 nA, en particular inferior a 10 nA a una concentración de glucosa de 180 mg/dl. Por ejemplo, el sistema de electrodos de la curva funcional B mostrada en la figura 5 se utilizó para medir, en la piel de un cerdo, una corriente de 3 nA a una concentración de glucosa de 180 mg/dl. Las señales de medición que son tan pequeñas resultan difíciles de transmitir a grandes distancias. Por lo tanto, resulta preferible disponer de un potencióstato y un amplificador en las proximidades inmediatas del sistema de electrodos. Puede disponerse un potencióstato 10 y un amplificador 11, por ejemplo, en una cabeza del sustrato 4, tal como se muestra en la figura 1. Resulta factible igualmente unir el sustrato 4 a una placa de conexiones conductoras que porta el potencióstato y el amplificador.

La figura 6 muestra mediciones *in vivo* que se midieron en el tejido adiposo subcutáneo abdominal de un diabético dependiente de insulina utilizando los dos sistemas de electrodos cuyas curvas funcionales se muestran en la figura 5 y que, además, se proporcionan con un espaciador. Los dos sistemas de electrodos se implantaron a una distancia de aproximadamente 10 cm.

Las características de la señal de los dos sensores que se implantaron simultáneamente muestran que los resultados obtenidos utilizando sistemas de electrodos según la invención son altamente consistentes. No se producen desviaciones relevantes de la concentración de glucosa entre los dos sitios de inserción. Los resultados mostrados también documentan que aparentemente no existen desviaciones transitorias de la concentración de glucosa entre sangre (círculos) y tejido (líneas continuas y de puntos).

Los valores de corriente eléctrica de los dos sensores se convirtieron a valores de glucosa mediante cálculo utilizando una tasa de muestreo de un valor de medición por minuto sin filtrado. La conversión se llevó a cabo basándose en los valores de azúcar en sangre que se determinaron de muestras de líquido corporal bajo condiciones *ex vivo*.

Para las mediciones *in vivo* mostradas en la figura 6, el sistema de electrodos en primer lugar presentaba una capa de recubrimiento 8 de poliuretano hidrofílico aplicada en el mismo y seguidamente se sumergió en una solución etanólica al 12,5% del copolímero de butilmetacrilato (BMA) y 2-metacrilolioxietil-fosforilcolina (MPC) (Lipidure CM5206, NOF Corp., Japón) y el recubrimiento que presentaba un grosor de 25 mm generado de esta manera seguidamente se secó durante 12 horas. La densidad de corriente prácticamente no resultó modificada por este espaciador 9 realizado en BMA-MPC: en ausencia del espaciador 9, el sistema de electrodos de la figura 5, curva funcional A, alcanzaba aproximadamente 40 nA/mm² a 180 mg/dl, mientras que alcanzaba 38 nA/mm² en presencia de espaciador BMA-MPC. No pudo detectarse ninguna diferencia en absoluto de amplitud de corriente en el caso del sistema de electrodos de la curva funcional B: 10 nA/mm² a 180 mg/dl en presencia, así como en ausencia de espaciador 9 realizado en BMA-MPC.

El espaciador suprime los efectos de los movimientos *in vivo* sobre el sensor. De acuerdo con lo anterior, la fracción de amplitud que contribuye a la fluctuación de la señal del sensor en la presente realización ejemplar, que claramente se relaciona con efectos del movimiento, resulta reducida por el espaciador de entre 5% y 25% de la altura media de la señal a entre 0,5% y 5% de la altura media de la señal.

La figura 7 muestra un diagrama de columnas de la corriente I medida bajo condiciones *in vitro* para tres concentraciones de glucosa diferentes g: 0 mg/dl, 180 mg/dl y 360 mg/dl, a dos concentraciones de oxígeno diferentes cada uno: 0,22 mmoles/l (columna izquierda en cada caso) y 0,04 mmoles/l (columna derecha de las

parejas de columnas mostradas en cada caso). Las mediciones se llevaron a cabo para el sistema de electrodos descrito anteriormente, en el que la capa de enzima 5 se construyó de manera que se garantizase una transferencia directa de electrones. Se utilizó GlucDH (EC 1.1.99.17) de *Acinetobacter calcoaceticus* a modo de enzima. En una primera etapa, inicialmente se unieron moléculas adicionales de PQQ covalentemente a GlucDH como mediador redox catalítico, por ejemplo mediante la adición del enzima a cloruro de ácido de PQQ. En una segunda etapa, se añadieron nanotubos de carbono (NanoLab, Newton, MA, USA; CNT multipared, grado de investigación) a una pasta que contenía grafito con el fin de mejorar la conductividad y la porosidad, mezclando seguidamente con GlucDH modificado con PQQ y la pasta de electrodo de trabajo generada de esta manera se imprimió sobre el camino conductor 1a en una matriz distribuida y después se curó a 40°C al vacío durante 4 horas. Previamente, el sistema de electrodos se dotó de la capa aislante 7, un electrodo de referencia 3 y un contraelectrodo 2 que presentaba una capa conductora 6. El enzima no inmovilizado se eliminó mediante enjuague con tampón fosfato. La pasta que contenía grafito contenía un agente ligante de polímero, por ejemplo basado en cloruro de polivinilo.

Se dispensó una capa de recubrimiento 8 realizada en poliuretano hidrofílico (HPU, relación de polietilenglicol: polipropilenglicol=1:3) tres veces sobre la capa de enzima 5 producida de esta manera en forma de una solución etanólica al 2,5% y se secó a temperatura ambiente durante 24 horas. El grosor de la capa de recubrimiento producida de esta manera era de 2 mm. Con el fin de medir la función *in vitro*, los sistemas de electrodos se operan en solución de medición de glucosa a diversas concentraciones de oxígeno a un voltaje de polarización de 200 mV respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl. La media y la desviación estándar de la corriente de medición se calcularon para cada uno de los 4 sensores. La figura 7 muestra dichos valores para una saturación de oxígeno normal de la solución de medición de aproximadamente 0,22 mmoles/l y una concentración de oxígeno marcadamente reducida de 0,04 mmoles/l. No se observó ninguna influencia relevante o significativa de la concentración de oxígeno sobre la función *in vitro* del sistema de electrodos con la transferencia directa de electrones.

Lista de números de referencia

- 1 Electrodo de trabajo
- 1a Conductor eléctrico del electrodo de trabajo
- 2 Contraelectrodo
- 2a Conductor eléctrico del contraelectrodo
- 3 Electrodo de referencia
- 3a Conductor eléctrico del electrodo de referencia
- 3b Capa de plata/cloruro de plata
- 4 Sustrato
- 5 Capa de enzima
- 6 Capa conductora
- 7 Capa aislante
- 8 Capa de recubrimiento
- 9 Espaciador
- 10 Potenciostato
- 11 Amplificador

REIVINDICACIONES

1. Sistema de electrodos para medir la concentración de un analito bajo condiciones *in vivo*, que comprende un contraelectrodo (2) que presenta un conductor eléctrico (2a), un electrodo de trabajo (1) que presenta un conductor eléctrico (1a) sobre el que se aplica una capa de enzima (5) que contiene moléculas inmovilizadas de enzima para la conversión catalítica del analito, y una barrera de difusión (8) que enlentece la difusión del analito desde el líquido corporal circundante al sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima, caracterizado porque la capa de enzima (5) se ha diseñado en forma de múltiples campos que se disponen sobre el conductor (1a) del electrodo de trabajo (1) separados por cierta distancia.
2. Sistema de electrodos según la reivindicación 1, caracterizado porque entre los campos de la capa de enzima (5) el conductor (1a) del electrodo de trabajo (1) está recubierto por una capa aislante (7).
3. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque como mínimo dos de los campos de la capa de enzima (5) se encuentran separados por como mínimo 3 mm, preferentemente por como mínimo 5 mm.
4. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la distancia entre campos vecinos de la capa de enzima (5) es de como mínimo 0,3 mm.
5. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque cada uno de los campos de la capa de enzima (5) se extiende menos de 2 mm en dos direcciones que son perpendiculares.
6. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la barrera a la difusión (8) esta diseñada en forma de una capa que recubre la capa de enzima (5).
7. Sistema de electrodos según la reivindicación 6, caracterizado porque la barrera a la difusión (8) está realizada en una mezcla de por lo menos dos acrilatos diferentes.
8. Sistema de electrodos según la reivindicación 7, caracterizado porque por lo menos uno de los acrilatos es un copolímero.
9. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el enzima interactúa con un mediador catalítico redox contenido en la capa de enzima (5) y reduce o evita una dependencia de oxígeno de la conversión catalítica del analito.
10. Sistema de electrodos según la reivindicación 9, caracterizado porque el mediador redox catalítico convierte el peróxido de hidrógeno.
11. Sistema de electrodos según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque el mediador redox catalítico lleva a cabo una transferencia directa de electrones.
12. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la capa de enzima (5) se recubre por un espaciador (9).
13. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el conductor (1a) del electrodo de trabajo (1) se estrecha entre los campos de la capa de enzima (5) y el conductor (2a) del contraelectrodo (2) presenta un contorno que sigue el curso del conductor (1a) del electrodo de trabajo (1).
14. Sensor que comprende un sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, un potencióstato conectado al sistema de electrodos, y un amplificador para amplificar las señales de medición del sistema de electrodos.
15. Sensor según la reivindicación 14, caracterizado porque los electrodos (1, 2, 3) del sistema de electrodos se disponen sobre un sustrato (4) que porta el potencióstato (10) o se une a una placa de circuitos que porta el potencióstato (10).

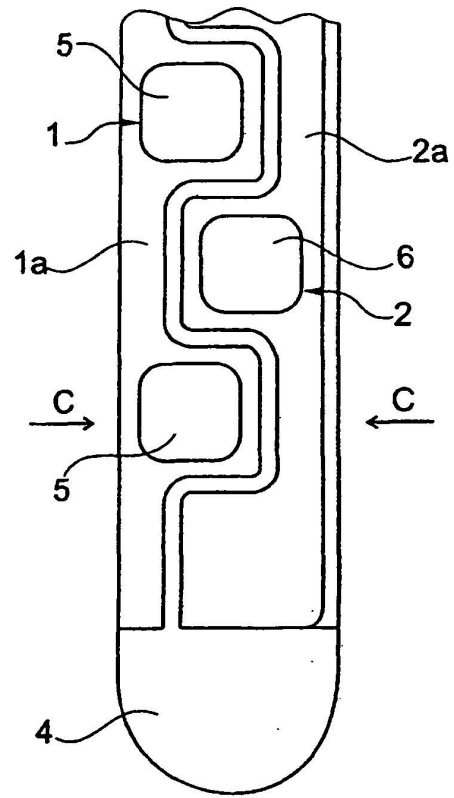
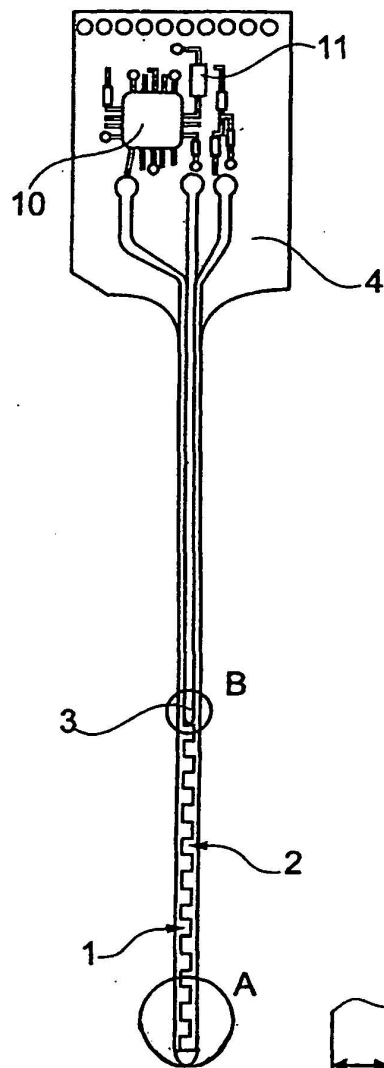
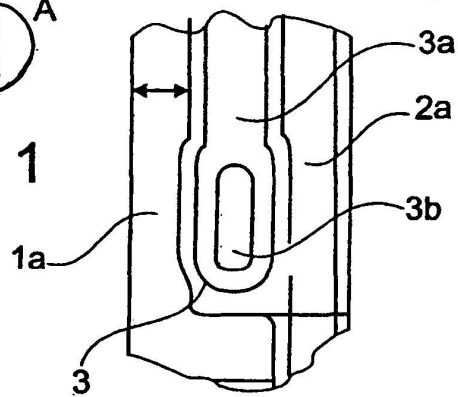


Fig. 1



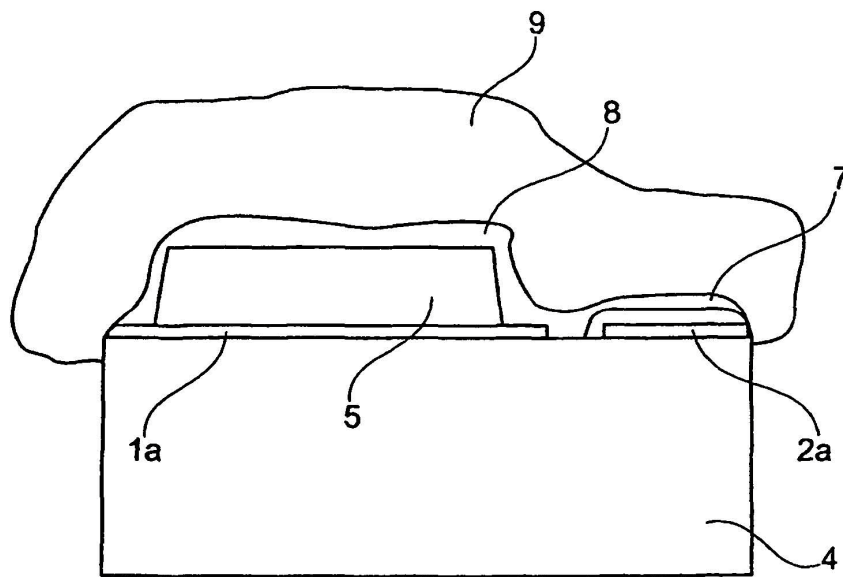


Fig. 4

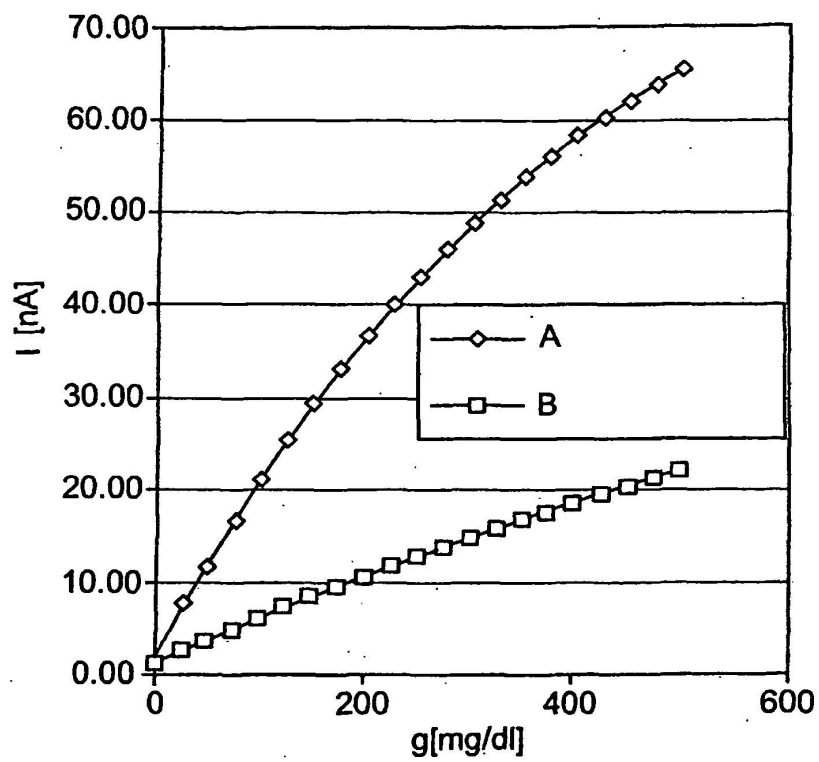


Fig. 5

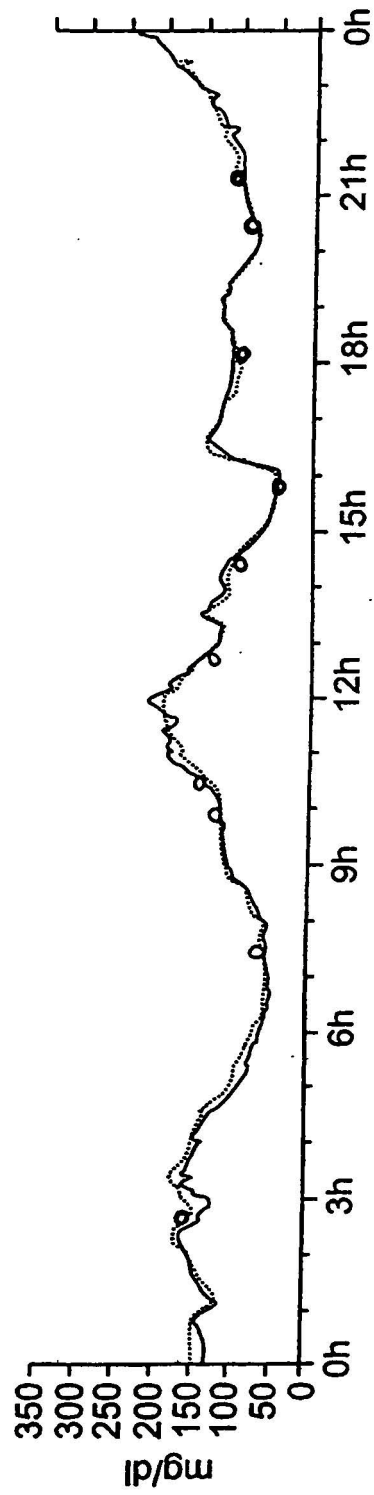


Fig. 6

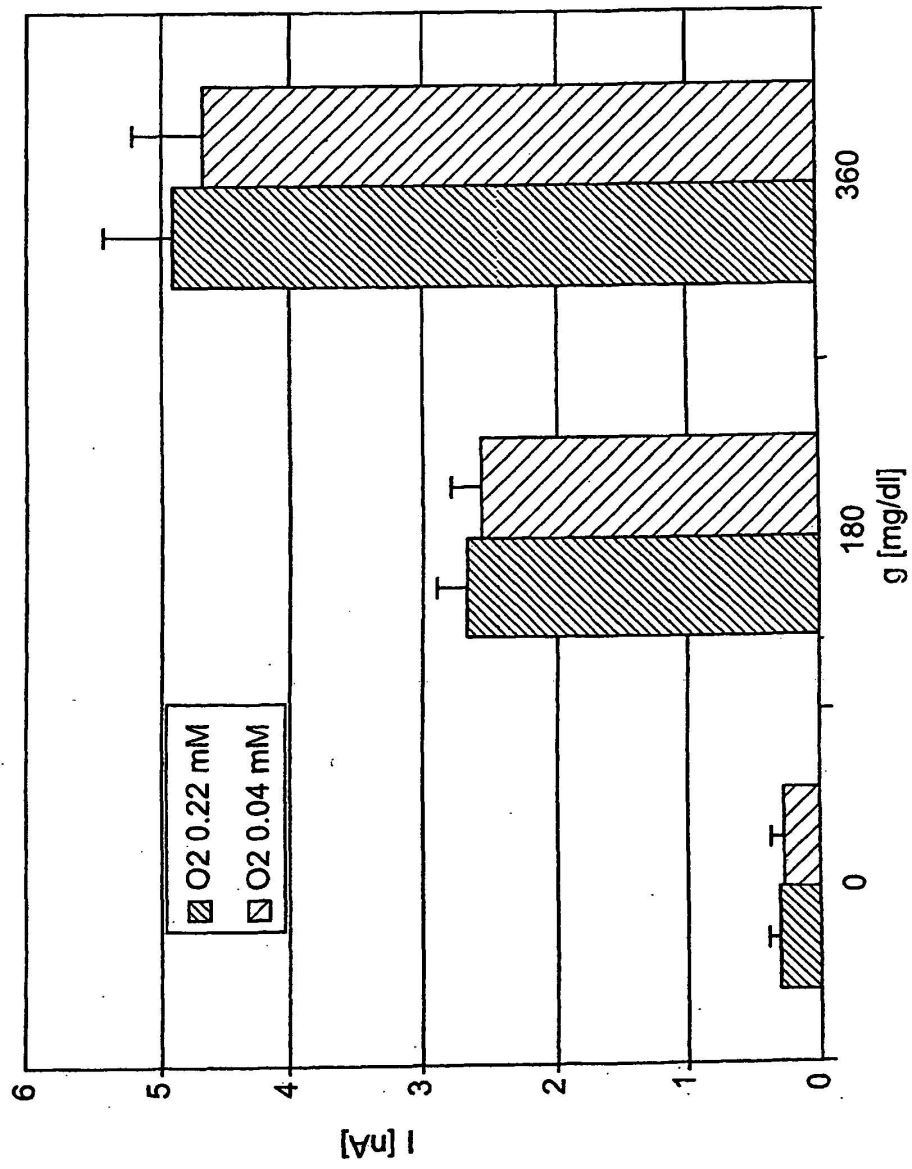


Fig. 7