

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 811**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2013 PCT/EP2013/056619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013 E 13712795 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2831263**

54 Título: **Membrana espaciadora mejorada para un sensor enzimático in vivo**

30 Prioridad:

**27.03.2012 WO PCT/EP2012/055406**

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

**17.10.2017**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH y  
ROCHE DIABETES CARE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STAIB, ARNULF;  
THIELE, MARCEL;  
KOELKER, KARL-HEINZ;  
RIEGER, EWALD y  
LICHT, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 637 811 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

Membrana espaciadora mejorada para un sensor enzimático in vivo

- 5 La presente invención se refiere a un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas y una barrera mejorada a la difusión que controla la difusión del analito a partir de líquido corporal circundante al sistema de electrodos a las moléculas de enzima.
- 10 Además, la presente invención se refiere a un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas, opcionalmente una barrera mejorada a la difusión que controla la difusión del analito a partir del exterior del sistema de electrodos a la molécula de enzima y una membrana espaciadora mejorada que forma por lo menos una parte de la capa externa del sistema de electrodos.
- 15 Los sensores con sistemas de electrodos implantables o insertables facilitan la medición de analitos fisiológicamente significativos, tales como, por ejemplo, lactato o glucosa, en el cuerpo del paciente. Los electrodos de trabajo de los sistemas de este tipo presentan capas de enzimas eléctricamente conductores en las que se encuentran moléculas de enzima unidas que liberan portadores de cargas mediante conversión catalítica de las moléculas de analito. En el procedimiento, se genera una corriente eléctrica como señal medible la amplitud de la cual se correlaciona con la concentración del analito.
- 20 Se conocen dichos sistemas de electrodos a partir de, por ejemplo, los documentos nº WO 2007/147475 y nº WO 2010/028708.
- 25 Los electrodos de trabajo del sistema de electrodos están provistos de una barrera de difusión que controla la difusión del analito que debe determinarse desde el líquido o tejido corporal circundante al sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima que se encuentran inmovilizadas en la capa de enzima. Según el documento nº WO 2010/028708, la barrera de la difusión del sistema de electrodos es una solución de sólidos de por lo menos dos polímeros diferentes, preferentemente de acrilatos. Los polímeros pueden ser copolímeros, por ejemplo copolímeros de metacrilato de metilo y metacrilato de hidroxietilo o copolímeros de metacrilato de butilo y metacrilato de hidroxietilo.
- 30 El documento nº WO 2007/147475 da a conocer una barrera de difusión realizada en un polímero que presenta una estructura zwitteriónica. Un ejemplo de dicho polímero es poli(2-metacrililoixietil fosforilcolina-co-n-butilmecrilato).
- 35 El polímero zwitteriónico puede mezclarse con otro polímero, por ejemplo poliuretano.
- 40 La utilización de mezclas de polímeros o copolímeros, sin embargo, adolece de desventajas en el aspecto de que la preparación de la mezcla y su aplicación en el sensor resulta tediosa y potencialmente problemática. Habitualmente, los polímeros que deben mezclarse se disuelven individualmente y las soluciones resultantes seguidamente se mezclan en la proporción deseada. Sin embargo, lo anterior puede resultar en la precipitación de uno de los componentes y en consecuencia en problemas de trabajabilidad, por ejemplo en un procedimiento de pulverización.
- 45 Se producen mayores dificultades en el caso de que la mezcla comprenda un polímero con características iónicas, es decir, en el caso de que uno de los polímeros que debe mezclarse comprenda un monómero con grupos aniónicos o catiónicos. La presencia de dichos grupos cargados, sin embargo, presenta un fuerte efecto sobre la solubilidad, haciendo difícil encontrar un solvente que resulte adecuado para tanto el polímero cargado como para un polímero no cargado.
- 50 El documento nº WO 2006/058779 da a conocer un sensor basado en enzimas con una difusión combinada y una capa de enzima que comprende por lo menos un material polimérico y partículas portadoras de un enzima, en el que las partículas se dispersan en el material de polímero. El polímero puede comprender secuencias de cadena de polímero hidrofílicas además de hidrofóbicas; por ejemplo, el polímero puede ser un copolímero de poliéter-poliuretano de alta o baja incorporación de agua. La utilización de copolímeros en bloque que presentan por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico a modo de capa de difusión no se da a conocer.
- 55 El documento nº EP-A-2 163 190 describe un sistema de electrodos para la medición de una concentración de analito que comprende in vivo un contraelectrodo con un conductor eléctrico y un electrodo de trabajo con un conductor eléctrico sobre el que se localiza una capa de enzima que comprende moléculas de enzima inmovilizadas. Una barrera de difusión controla la difusión del analito desde líquidos corporales circundantes a las moléculas de enzima. La barrera de difusión puede comprender poliuretanos hidrofílicos obtenibles mediante policondensación de 4,4'-metilén-bis-(ciclohexiliscianato) y mezclas de diol que pueden ser polietilenglicol y polipropilenglicol. La capa de poliuretano hidrofílica puede cubrirse con un espaciador, por ejemplo un copolímero de metacrilato de butilo y 2-metacrililoixietil-fosforil-colina. La utilización de copolímeros en bloque que presentan por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico a modo de capa de difusión no se da a conocer. Tampoco se ha da

a conocer la utilización de un copolímero hidrofílico de monómeros (meta)acrílicos que comprenden más de 50% molar de monómeros hidrofílicos.

5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una barrera de difusión en un sistema de electrodos de un sensor enzimático in vivo que proporciona características físicoquímicas deseables y que pueden fabricarse fácilmente.

10 Dicho objetivo se cumple proporcionando una barrera de difusión que consiste de un único copolímero en bloque que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico. Los bloques hidrofílico e hidrofóbico se encuentran unidos covalentemente entre sí. Preferentemente, los bloques son bloques de polímero (meta)acrilato.

15 La barrera de difusión basada en copolímero en bloque proporciona excelentes características físicoquímicas, de la manera siguiente:

- (i) permeabilidad de la barrera de difusión al analito que debe determinarse,
- (ii) características de permeabilidad de la barrera de difusión que resultan adecuadas para el comportamiento a corto plazo (humectabilidad) y el comportamiento a largo plazo (deriva del sensor) del electrodo,
- (iii) flexibilidad mecánica de la barrera de difusión, que permite la fabricación de sensores in vivo con múltiples electrodos extendidos,
- (iv) incorporación eficiente de grupos iónicos en la capa de difusión, es decir, puede ajustarse eficientemente la densidad de las cargas catiónicas o aniónicas dentro del polímero; ello resulta relevante para la repulsión o atracción de los

25 analitos cargados y/o para el control de la adhesión celular, por ejemplo de monocitos del líquido o tejido corporal circundante.

30 Una materia objeto de la presente invención es un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas, opcionalmente una barrera mejorada a la difusión que controla la difusión del analito desde el exterior del sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima y una membrana espaciadora mejorada que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico.

35 Preferentemente, la barrera de difusión comprende un solo, es decir, un único copolímero en bloque que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico, es decir, no se encuentran presentes polímeros o copolímeros adicionales. Más preferentemente, la barrera de difusión que consiste de un único copolímero en bloque que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico.

40 El sistema de electrodos de la presente invención resulta adecuado para la inserción o implante en el cuerpo, por ejemplo el cuerpo de un mamífero, tal como el cuerpo humano. El sistema de electrodos está adaptado para medir un analito deseado en líquido corporal y/o tejido corporal, por ejemplo en el espacio extracelular (intersticio), en la sangre o en vasos linfáticos o en el espacio transcelular.

45 El sistema de electrodos insertado o implantado resulta adecuado para la aplicación a corto plazo, por ejemplo durante 3 a 14 días, o para la aplicación a largo plazo, por ejemplo durante 6 a 12 meses. Durante el periodo de inserción o implante, puede determinarse un analito deseado mediante mediciones continuas o discontinuas.

50 El sistema de electrodos e la invención preferentemente es parte de un sensor enzimático no fluido (ENF), en el que se determina la conversión enzimática del analito. Preferentemente, el sensor comprende un electrodo de trabajo con moléculas de enzima inmovilizadas para la conversión del analito que resulta en la generación de una señal eléctrica. Los enzimas pueden encontrarse presentes en una capa que cubre el electrodo. Además, pueden encontrarse presentes mediadores redox y/o electrocatalizadores, así como partículas conductoras y formadores de poros. Este tipo de electrodo se describe en, por ejemplo, el documento n° WO 2007/147475.

55 La zona del electrodo de trabajo es la zona sensible del sensor. Esta zona sensible se proporciona con una barrera de difusión que controla la difusión del analito desde el exterior, por ejemplo líquido y/o tejido corporal circundante al sistema de electrodos, hasta las moléculas de enzima. La barrera de difusión puede ser, por ejemplo, una capa de cubrición que cubre la capa de enzima, es decir, una capa sin enzima. Sin embargo, resulta igualmente factible que las partículas de control de la difusión se incorporen en la capa de enzima a fin de actuar como barrera de difusión. Por ejemplo, pueden llenarse poros de la capa de enzima con el polímero que controla la difusión de las moléculas de analito. El grosor de la barrera de difusión habitualmente es de entre aproximadamente 2 y 20  $\mu\text{m}$ , por ejemplo de entre aproximadamente 2 y 15  $\mu\text{m}$ , o de entre aproximadamente 5 y 20  $\mu\text{m}$ , particularmente de entre aproximadamente 5 y 10  $\mu\text{m}$  o de entre aproximadamente 10 y 15  $\mu\text{m}$  (en estado seco).

65

La barrera de difusión del sistema de electrodos de la presente invención comprende un copolímero en bloque, preferentemente un único copolímero en bloque que presenta por lo menos un grupo hidrofílico y por lo menos un grupo hidrofóbico. El copolímero en bloque puede comprender una secuencia alternante de bloques, es decir, un bloque hidrofílico se une a un bloque hidrofóbico. Los bloques hidrofílico e hidrofóbico se unen covalentemente entre sí dentro de una molécula de polímero. El peso molecular medio del polímero (en peso) habitualmente es de entre 20 y 70 kD, particularmente de entre 25 y 60 kD y más particularmente de entre 30 y 50 kD. La proporción molar de partes hidrofílica a hidrofóbica en el copolímero en bloque habitualmente se encuentra en el intervalo de entre aproximadamente 75% (hidrofílico): 25% (hidrofóbico) y aproximadamente 25% (hidrofílico): 75% (hidrofóbico), en el intervalo de entre aproximadamente 65% (hidrofílico): 35% (hidrofóbico) y aproximadamente 35% (hidrofílico): 65% (hidrofóbico) o en el intervalo de entre aproximadamente 60% (hidrofílico): 40% (hidrofóbico) y aproximadamente 40% (hidrofílico): 60% (hidrofóbico). Un bloque hidrofílico del copolímero en bloque consiste de por lo menos 90%, de por lo menos 95% y en particular completamente de unidades monoméricas hidrofílicas. Habitualmente presenta una longitud de entre 50 y 400, por ejemplo de entre 50 y 200 o de entre 150 y 300, en particular de entre 100 y 150 o de entre 200 y 250 moléculas monoméricas. Un bloque hidrofóbico del copolímero en bloque consiste de por lo menos 90%, de por lo menos 95% y todavía más en particular completamente de unidades monoméricas hidrofílicas. Habitualmente presenta una longitud de entre 50 y 300, por ejemplo de entre 50 y 200 o de entre 150 y 250, en particular de entre 80 y 150 o de entre 170 y 200 moléculas monoméricas.

Los bloques hidrofílicos y/o los bloques hidrofóbicos preferentemente consisten de unidades basadas en ácido metacrílico. Más preferentemente, tanto los bloques hidrofílicos como los bloques hidrofóbicos consisten de unidades monoméricas basadas en ácido metacrílico.

Las unidades monoméricas hidrofílicas del bloque hidrofílico preferentemente se seleccionan de entre ésteres (meta)acrílicos hidrofílicos, es decir ésteres con un grupo polar, es decir OH, OCH<sub>3</sub> o OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> dentro de la parte alcohol del éster, (meta)acrilamidas hidrofílicas con un grupo amida (NH<sub>2</sub>) o un grupo N-alquilo- o N,N-dialquilamida, en el que el grupo alquilo comprende 1 a 3 átomos de C y opcionalmente grupos hidrofílicos, tales como OH, OCH<sub>3</sub> o OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> y unidades (meta)acrílicas adecuadas que presentan un grupo cargado, por ejemplo un grupo aniónico o catiónico, tal como ácido acrílico (acrilato) o ácido metacrílico (metacrilato). Además, pueden utilizarse combinaciones de unidades monoméricas.

Los ejemplos específicos de unidades monoméricas preferentes para el bloque hidrofílico se seleccionan de entre:

acrilato de 2-hidroxietilo,  
 metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA),  
 acrilato de 2-metoxietilo,  
 metacrilato de 2-metoxietilo,  
 acrilato de 2-etoxietilo,  
 metacrilato de 2-metoxietilo,  
 acrilato de 2- o 3-hidroxipropilo,  
 metacrilato de 2- o 3-hidroxipropilo (2- o 3-HPMA),  
 acrilato de 2- o 3-metoxipropilo,  
 metacrilato de 2- o 3-metoxipropilo,  
 acrilato de 2- o 3-etoxipropilo,  
 metacrilato de 2- o 3-etoxipropilo,  
 acrilato de 1- o 2-glicerol,  
 metacrilato de 1- o 2-glicerol,  
 acrilamida,  
 metacrilamida,  
 una acrilamida de N-alquilo o N,N-dialquilo, y  
 una metacrilamida de N-alquilo o de N,N-dialquilo, en la que el alquilo comprende 1 a 3 átomos de C, tal como metilo, etilo o propilo,  
 ácido acrílico (acrilato),  
 ácido metacrílico (metacrilato)  
 y combinaciones de los mismos.

Los monómeros hidrofílicos preferentes son metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y/o metacrilato de 2- o 3-hidroxipropilo (2- o 3-HPMA). Más preferentemente, el bloque hidrofílico consiste de por lo menos dos unidades monoméricas hidrofílicas diferentes. Por ejemplo, puede ser un copolímero aleatorio de por lo menos dos unidades monoméricas hidrofílicas diferentes, tales como HEMA y 2-HPMA.

Con el fin de introducir grupos iónicos en el monómero, pueden incorporarse en el bloque hidrofílico unidades monoméricas cargadas, tales como ácido acrílico (acrilato) y/o ácido metacrílico (metacrilato). De esta manera, en una realización particular de la presente invención, el bloque hidrofílico puede prepararse a partir de por lo menos una unidad monoméricas hidrofílica no iónica (por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente) y a partir de por lo menos una unidad monoméricas hidrofílica iónica, en la que la unidad monoméricas iónica se encuentra presente en una cantidad molar de preferentemente 1% a 20% molar. En el caso de que el bloque hidrofílico comprenda una

unidad monomérica iónica, tal como ácido acrílico o ácido metacrílico, resulta preferente la copolimerización con un monómero hidrofílico seleccionado de entre el grupo de (meta)acrilamidas, en particular acrilamidas o metacrilamidas de N,N-dialquilo.

5 Las unidades monoméricas hidrofóbicas del bloque hidrofóbico preferentemente se seleccionan de entre unidades acrílicas y/o metacrílicas hidrofóbicas, unidades monoméricas basadas en el estireno o combinaciones de las mismas. Preferentemente, las unidades monoméricas hidrofóbicas se seleccionan de entre ésteres de (meta)acrilato hidrofóbicos, por ejemplo ésteres que presentan una parte alcohol con 1 a 3 átomos de C sin grupo hidrofílico. Los ejemplos específicos de unidades monoméricas preferentes para el bloque hidrofóbico se seleccionan de entre:

10 acrilato de metilo,  
metacrilato de metilo (MMA),  
acrilato de etilo,  
metacrilato de etilo (EMA),  
15 acrilato de n-propilo o i-propilo,  
metacrilato de n-propilo o i-propilo,  
acrilato de n-butilo,  
metacrilato de n-butilo (BUMA),  
acrilato de neopentilo,  
20 metacrilato de neopentilo,  
y combinaciones de los mismos.

El bloque hidrofóbico preferentemente comprende por lo menos dos unidades monoméricas hidrofóbicas diferentes, que se encuentran presentes, por ejemplo, en forma de un copolímero aleatorio. En una realización preferente, el bloque hidrofóbico comprende metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de n-butilo (BUMA). En una realización especialmente preferente, el bloque hidrofóbico es un copolímero aleatorio de MMA y BUMA. La proporción molar de MMA a BUMA preferentemente es de aproximadamente 60% (MMA): 40% (BUMA)(hidrofóbico) y aproximadamente 40% (MMA): 60% (BUMA), por ejemplo de aproximadamente 50% (MMA): 50% (BUMA). La temperatura de transición vítrea del bloque hidrofóbico preferentemente es de 100°C o inferior, de 90°C o inferior o de 80°C o inferior, por ejemplo de entre aproximadamente 40°C y 80°C. En una realización alternativa, el bloque hidrofóbico puede consistir de unidades estirénicas, por ejemplo de poliestireno con una temperatura de transición vítrea de aproximadamente 95°C.

Los copolímeros en bloque utilizados en la presente invención pueden prepararse según métodos conocidos (Böker et al., *Macromolecules* 34:7477-7488, 2001).

Los copolímeros en bloque pueden aplicarse al sistema de electrodos mediante técnicas habituales, por ejemplo proporcionando una solución del copolímero en bloque en un solvente o mezcla de solventes adecuado, por ejemplo un solvente orgánico, tal como éter, que se aplica al sistema de electrodos prefabricado y se seca sobre el mismo.

Al poner en contacto el copolímero en bloque con agua, muestra una incorporación del agua de preferentemente aproximadamente 15% a 30% en peso (respecto al peso seco de polímero) a una temperatura de 37°C y a un pH de 7,4 (tampón de fosfato acuoso  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM y NaCl 147 mM).

Además del copolímero en bloque, la barrera de difusión puede comprender además componentes adicionales, en particular componentes no poliméricos, que pueden dispersarse y/o disolverse en el polímero. Dichos compuestos adicionales incluyen plastificadores, en particular plastificadores biocompatibles, tales como trimelitato de tri-(2-etilhexilo) y/o glicerol.

La barrera de difusión de la invención presenta un coeficiente de difusión eficaz  $D_{\text{eff}}$  elevado para la glucosa, que preferentemente es  $\geq 10^{-10}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , más preferentemente  $\geq 5 \cdot 10^{-10}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  y todavía más preferentemente  $\geq 10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  y, por ejemplo, de hasta  $10^{-7}$  o  $10^{-8}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  a una temperatura de 37°C y a un pH de 7,4. El coeficiente de difusión eficaz preferentemente se determina tal como se indica en el Ejemplo 4 siguiendo la ecuación:

$$55 \quad D_{\text{eff}} = SE_m / F \cdot L_m \cdot 5,182 \cdot 10^8$$

en la que  $SE_m$  es la sensibilidad del electrodo de trabajo, F es la superficie del electrodo de trabajo y  $L_m$  es el grosor de capa de la barrera de difusión.  $SE_m$  y  $L_m$  pueden determinarse tal como se indica en los Ejemplos.

60 El sistema de electrodos de la presente invención resulta adecuado para medir la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, es decir, insertado o implantado en el cuerpo. El analito puede ser cualquier molécula o ión presente en un tejido o líquido corporal, por ejemplo oxígeno, dióxido de carbono, sales (cationes y/o aniones), grasas o componentes lipídicos, carbohidratos o componentes de carbohidratos, proteínas o componentes de proteínas, u otro tipo de biomoléculas. Resulta especialmente preferente la determinación de analitos que pueden

transferirse eficientemente entre líquido corporal, por ejemplo sangre, y tejido, tal como oxígeno, dióxido e carbono, cationes sodio, aniones cloruro, glucosa, urea, glicerol, lactato y piruvato.

El sistema de electrodos comprende un enzima inmovilizado sobre un electrodo. El enzima resulta adecuado para la determinación de un analito deseado. Preferentemente, el enzima es capaz de convertir catalíticamente el analito y generar de esta manera una señal eléctrica detectable por el conductor eléctrico del electrodo de trabajo. El enzima para medir el analito preferentemente es una oxidasa, por ejemplo glucosa oxidasa o lactato oxidasa o una deshidrogenasa, por ejemplo una glucosa deshidrogenasa o una lactato deshidrogenasa. Además del enzima, la capa de enzima puede comprender además un electrocatalizador o un mediador redox que favorezca la transferencia de electrones a componentes conductores del electrodo de trabajo, por ejemplo partículas de grafito.

Son electrocatalizadores adecuados, óxidos de metal, tales como dióxido de manganeso, o compuestos organometálicos, tales como ftalocianina de cobalto. En una realización preferente, el mediador redox es capaz de degradar el peróxido de hidrógeno, contrarrestando de esta manera el agotamiento del oxígeno en el medio circundante al electrodo de trabajo. En una realización diferente, un mediador redox puede unirse covalentemente al enzima y producir de esta manera la transferencia electrónica directa al electrodo de trabajo. Los mediadores redox adecuados para la transferencia electrónica directa son grupos prostéticos, tales como la pirroloquinolín quinona (PQQ), el flavín adenín dinucleótido (FAD) u otros grupos prostéticos conocidos. Los enzimas inmovilizados sobre electrodos se describen en, por ejemplo, el documento nº WO 2007/147475.

Una realización preferente del sistema de electrodos comprende un contraelectrodo con un conductor eléctrico y un electrodo de trabajo con un conductor eléctrico sobre el que se dispone una capa de enzima y la barrera de difusión. La capa de enzima preferentemente se diseña en forma de múltiples campos que se disponen en el conductor del electrodo de trabajo a una distancia de, por ejemplo, por lo menos 0,3 mm o a por lo menos 0,5 mm uno de otro. Los campos individuales del electrodo de trabajo pueden formar una serie de electrodos de trabajo individuales. Entre estos campos, el conductor del electrodo de trabajo puede cubrirse con una capa de aislamiento. Mediante la disposición de los campos de la capa de enzima sobre aberturas en la capa eléctricamente aislante puede mejorarse la relación de señal-ruido. Se da a conocer una disposición tal como la indicada anteriormente en el documento nº WO 2010/028708.

El sistema de electrodos de la invención puede comprender adicionalmente un electrodo de referencia capaz de producir un potencial de referencia para el electrodo de trabajo, por ejemplo un electrodo de referencia Ag/Ag-Cl.

Además, un sistema de electrodos según la invención puede presentar contraelectrodos y/o electrodos de trabajo adicionales.

El sistema de electrodos puede ser parte de un sensor, por ejemplo mediante la conexión a un potencióstato y un amplificador para la amplificación de las señales medidas del sistema de electrodos. El sensor preferentemente es un sensor enzimático no fluido (ENF), más preferentemente un sensor ENF electroquímico. Los electrodos del sistema de electrodos pueden disponerse sobre un sustrato que porta el potencióstato o pueden unirse a una placa de circuito que lleva el potencióstato.

Una materia adicional objeto de la invención se refiere a la utilización de un copolímero en bloque que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico como barrera de difusión para un electrodo enzimático. El copolímero en bloque preferentemente es tal como se ha indicado anteriormente, por ejemplo un único copolímero en bloque. La barrera de difusión y el electrodo enzimático preferentemente son tal como se ha indicado anteriormente.

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

La fig. 1 muestra una realización ejemplar de un sistema de electrodos según la invención.

La fig. 2 muestra una vista de detalle de la fig. 1.

La fig. 3 muestra otra vista de detalle de la fig. 1.

La fig. 4 muestra una sección a lo largo de la línea de sección CC en la fig. 2.

La fig. 5 muestra la sensibilidad (con desviación estándar) de cuatro sensores de glucosa (con 10 mM de glucosa) provistos de diferentes polímeros en bloque (C, F, D y B) como capas de barrera.

La fig. 6 muestra la deriva de cuatro sensores de glucosa provistos de diferentes polímeros en bloque (A, C, D y F) como capas de barrera.

La fig. 7 muestra la conductividad del copolímero en bloque A dependiente del tiempo (2 experimentos).

La fig. 8 muestra la conductividad del copolímero en bloque F dependiente del tiempo (3 experimentos).

La fig. 9 muestra la conductividad del copolímero en bloque H dependiente del tiempo para un grosor de capa de 2,77  $\mu\text{m}$  o 4,43  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

La fig. 10 muestra la adhesión del fibrinógeno a diferentes polímeros de membrana espaciadora in vitro (Adapt® y Eudragit E100) en comparación con una placa no recubierta (Blanco).

La fig. 11 muestra la expresión de la proteína de superficie CD54 por parte de células THP-1 tras la incubación con sensores recubiertos con una membrana espaciadora (Adapt® y Lipidure CM5206) o no recubiertos (control = células no tratadas).

Las figs. 12a y 12b muestran la secreción de la citoquina IL-8 y MCP-1, respectivamente, por parte de células THP-1 tras la incubación con sensores recubiertos con una membrana espaciadora (Adapt® y Lipidure CM5206) o no recubiertos (control = células no tratadas).

La fig. 13 muestra la secreción de citoquina IL-8 por parte de células THP-1 tras la incubación en placas de cultivo de tejidos recubiertas con una membrana espaciadora (Adapt®, Lipidure CM5206 y Eudragit E100) o no recubiertas (Polyst.) y una capa adicional de fibrinógeno.

La fig. 14 muestra la hemólisis tras la incubación en sensores recubiertos con una membrana espaciadora (Adapt® y Lipidure CM5206) o no recubiertos en comparación con el polímero espaciador Adapt® sin sensor (control negativo = medio de incubación únicamente; control positivo = 100% de lisis osmótica).

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 la piel o en tejido subcutáneo adiposo. En la figura 2 se muestra ampliada la vista de detalle A; en la figura 3 se muestra ampliada la vista de detalle B. La fig. 4 muestra una sección transversal correspondiente a lo largo de la línea de sección CC de la fig. 2.

El sistema de electrodos mostrado presenta un electrodo de trabajo 1, un contraelectrodo 2 y un electrodo de referencia 3. Los conductores eléctricos de los electrodos 1a, 2a y 3a están dispuestos en forma de caminos conductores metálicos, preferentemente realizados en paladio u oro, sobre el 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 100 a 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 eje de pequeño diámetro para la inserción en el tejido corporal del paciente y una cabeza ancha para la conexión a un sistema electrónico que se dispone en el exterior del cuerpo. El eje del sustrato 4 preferentemente presenta una longitud de por lo menos 1 cm, en particular de 2 a 5 cm.

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

El electrodo de trabajo 1 lleva 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 curable de partículas de carbono, un agente ligante polimérico, un mediador redox o un electrocatalizador y moléculas de enzima. Se da a conocer información sobre la producción de una capa de enzima 5 de dicho tipo en, por ejemplo, el documento nº WO 2007/147475, al que se hace referencia en el presente contexto.

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 distanciados entre sí. Los campos individuales de la capa de enzima 5 en la realización ejemplar mostrada se disponen en una serie.

El conductor 1a del electrodo de trabajo 1 presenta pequeños sitios 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. Lo anterior resulta en una disposición intercalada o interdigitada del electrodo de trabajo 1 y el contraelectrodo 2 con caminos de corriente ventajosamente cortos y baja densidad de corriente.

Con el fin de incrementar su superficie eficaz, puede proporcionarse al contraelectrodo 2 una capa eléctricamente conductora porosa 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, dicha capa 6 puede aplicarse en forma de una pasta curable 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, también pueden omitirse las medidas para incrementar la superficie del contraelectrodo y el contraelectrodo 2 puede diseñarse igualmente para que sea un camino conductor lineal sin recubrimiento de ningún tipo, o con un recubrimiento realizado a partir del copolímero en bloque indicado y opcionalmente un espaciador.

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 aplica un campo 3b de pasta conductora de plata/cloruro de plata.

La fig. 4 muestra una sección transversal esquemática a lo largo de la línea de sección CC de la fig. 2. La línea de sección, CC, se extiende a través de uno de los campos de la capa de enzima 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 1 puede recubrirse con una capa eléctricamente aislante 7, tal 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 resultar catalizadas por el metal de los caminos conductores 1a y 2a. Por lo tanto, se sitúan los campos de la capa de enzima 5 en aberturas de la capa aislante 7. De manera similar, los campos de la capa conductora 6 del contraelectrodo 2 también pueden situarse sobre las aberturas de la capa aislante 7.

5 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, por lo tanto, actúa como una barrera a la difusión. La barrera de difusión 8 consiste de un único copolímero con bloques alternantes hidrofílicos e hidrofóbicos tal como se ha indicado anteriormente.

10 Un grosor favorable de la capa de recubrimiento 8 es de, por ejemplo, 3 a 30  $\mu\text{m}$ , en particular de aproximadamente 5 a 10  $\mu\text{m}$  o de aproximadamente 10 a 15  $\mu\text{m}$ . 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 son convertidas y, por lo tanto, contrarresta el agotamiento de la concentración de analito en el medio circundante al electrodo de trabajo.

15 La capa de recubrimiento 8 se extiende continuamente esencialmente sobre la totalidad de la superficie del conductor 1a del electrodo de trabajo 1. Sobre la capa de recubrimiento 8 puede aplicarse una membrana biocompatible como espaciador 9 que fija una distancia mínima entre la capa de enzima 5 y las células del tejido corporal circundante. De esta manera se genera ventajosamente un reservorio para las moléculas de analito a partir del cual las moléculas de analito pueden alcanzar el campo de la capa de enzima 5 correspondiente en el caso de una perturbación transitoria del intercambio de líquidos en el medio circundante al campo de la capa de enzima 5.

20 En el caso de que el intercambio de líquido corporal con el medio circundante al sistema de electrodos esté limitado transitoriamente o incluso bloqueado, las moléculas de analito almacenadas en el espaciador 9 se difunden continuamente a la capa de enzima 5 del electrodo de trabajo 1, en donde son convertidas. Por lo tanto, el espaciador 9 provoca que se produzca una notable reducción de la concentración de analito y la correspondiente falsificación de los resultados de medición únicamente después de un periodo de tiempo significativamente más largo. En la realización ejemplar mostrada, la membrana que forma el espaciador 9 también recubre el

25 30 contraelectrodo 2 y el electrodo de referencia 3. La membrana espaciadora 9 puede ser, por ejemplo, una membrana de diálisis. En el presente contexto, se entiende que una membrana de diálisis es una membrana que es impermeable a moléculas de tamaño superior al tamaño máximo. La membrana de diálisis pueden prefabricarse en un procedimiento de fabricación independiente y después puede aplicarse durante la fabricación del sistema de electrodos. El tamaño máximo de las moléculas para las que es permeable la membrana de diálisis se selecciona de manera que puedan pasar las moléculas de analito, mientras que las moléculas de tamaño mayor resultan retenidas.

35 40 Alternativamente, en lugar de una membrana de diálisis puede aplicarse un recubrimiento realizado en un polímero que es altamente permeable al analito y al agua, por ejemplo basado en poliuretano o en acrilato, sobre el sistema de electrodos a modo de membrana espaciadora 9.

45 50 Preferentemente, el espaciador está realizado en un copolímero de (meta)acrilatos. Preferentemente, la membrana espaciadora es un copolímero de por lo menos 2 o 3 (meta)acrilatos. Más preferentemente, la membrana espaciadora comprende más de 50% molar, por lo menos 60% molar o por lo menos 70% molar de unidades de monómero hidrofílico, por ejemplo HEMA y/o 2-HPMA, y hasta 40% molar o hasta 30% molar de unidades hidrofóbicas, por ejemplo BUMA y/o MMA. El espaciador puede ser un copolímero aleatorio o en bloque. Una membrana espaciadora especialmente preferente comprende MMA o BUMA como fracciones hidrofóbicas y 2-HEMA y/o 2-HPMA como fracciones hidrofílicas. Preferentemente, la cantidad de los monómeros hidrofílicos HEMA y/o HPMA es de entre 80% molar y 85% molar, y la cantidad del componente hidrofóbico MMA y/o BUMA es de entre 15% molar y 20% molar.

55 La membrana espaciadora más preferente de la invención está realizada en copolímero Adapt® (BioInteractions Ltd., Reading, Inglaterra). Adapt® comprende BUMA como fracción hidrofóbica y 2-HEMA y 2-HPMA como fracciones hidrofílicas, en las que la cantidad de los monómeros hidrofílicos 2-HEMA es de aproximadamente 80% molar.

60 La membrana espaciadora es altamente permeable al analito, es decir, no reduce significativamente la sensibilidad por unidad de superficie del electrodo de trabajo, por ejemplo 20% o menos, o 5% o menos, con un grosor de la capa inferior a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , preferentemente inferior a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . Un grosor especialmente preferente de la membrana espaciadora es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ .

65 La capa de enzima 5 del sistema de electrodos puede contener partículas de óxido de metal, 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, por la oxidación enzimática de la glucosa y otros bioanalitos. 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 educción de la concentración de oxígeno en la capa de enzima 5. Ventajosamente, lo anterior permite que la conversión de 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 debido a que la concentración de oxígeno es baja. Otra ventaja del mediador redox catalítico es que evita la generación de concentraciones dañinas para las células de peróxido de hidrógeno.

El polímero de membrana espaciadora preferente indicado en la presente memoria puede utilizarse como recubrimiento externo para la barrera de difusión de la presente invención, aunque también como recubrimiento externo de un sistema de electrodos en general, en particular de un sistema de electrodos para la medición de la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas y una barrera de difusión que controla la difusión del analito desde el exterior del sistema de electrodos a las moléculas de enzima. De esta manera, la membrana espaciadora puede disponerse sobre la barrera de difusión; sin embargo, la membrana espaciadora también puede disponerse directamente sobre la capa de enzima. En este último contexto, la membrana espaciadora misma también puede actuar como una barrera de difusión y enlentecer la difusión de las moléculas de analito a la capa de enzima.

Al insertar o implantar el sistema de electrodos de la invención en el cuerpo, la membrana espaciadora constituye la interfaz entre el sensor implantado y el líquido o tejido corporal circundante. En consecuencia, al exponerla al líquido o tejido corporal, la membrana espaciadora de la invención debe ser mecánicamente robusta de manera que no resulte ni deformada ni empujada fuera del sensor. Con este fin la incorporación de agua del copolímero de la membrana espaciadora y el hinchado concomitante del copolímero deben estar limitados, a pesar de la hidrofiliidad inherente del copolímero.

Preferentemente, la incorporación de agua relativa del copolímero de la membrana espaciadora no debería exceder 50% en peso, preferentemente 40% en peso, más preferentemente 30% en peso, respecto a la tasa total del copolímero. En el contexto de la presente invención, la medición de la incorporación relativa de agua se lleva a cabo sometiendo el copolímero seco a un exceso de tampón fosfato (pH 7,4) durante 48 h a una temperatura de 37°C. La incorporación relativa de agua (% IA) preferentemente se determina según la ecuación:

$$WU\% = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100,$$

en la que  $m_1$  y  $m_2$  representan, respectivamente, la masa de copolímero seco y el copolímero después de la hidratación según las condiciones de medición anteriormente indicadas.

Los inventores de la presente invención han determinado que la membrana espaciadora preferente realizada en el copolímero Adapt® incorpora hasta  $33 \pm 1,8\%$  en peso de tampón fosfato (pH 7,4) respecto a su propio peso durante 48 h a 37°C. Bajo las mismas condiciones, una membrana de polímero Lipidure CM5206 (NOF Corporation, Japón) incorpora  $157 \pm 9,7\%$  en peso de tampón fosfato respecto a su propio peso. La incorporación de agua más baja del polímero incrementa ventajosamente la estabilidad mecánica de la membrana espaciadora de la presente invención. En contraste, Lipidure CM5206 muestra una incorporación de agua más alta y se hincha formando un hidrogel que es más frágil, fácilmente deformable o expulsable, en particular al aplicarlo sobre un sistema de electrodos de un sensor enzimático in vivo.

Además, durante la inserción e implementación del sistema de electrodos, el espaciador se encuentra en contacto directo con el tejido y/o líquido corporal, tal como líquido intersticial o sangre, que contiene biomoléculas tales como proteínas y células. Ventajosamente, la membrana espaciadora debe proteger el sensor insertado e implantado en el medio tejido y/o líquido corporal y, de esta manera, minimizar la reacción del tejido en el cuerpo frente al implante. De hecho, las reacciones del cuerpo contra el material implantado se conocen como "respuesta a cuerpos extraños" (RCE). Mediante la RCE, el cuerpo intenta destruir el implante o, en caso de no resultar posible, intenta crear una cápsula para separarlo del tejido circundante (granuloma por cuerpo extraño). La primera etapa de la reacción de RCE es la unión de proteínas (por ejemplo fibrinógeno, albúmina, inmunoglobulinas y complemento) a la superficie del material anterior, es decir, el implante. Este recubrimiento de proteínas presenta sitios de unión a receptores sobre las células inmunológicas. Por ejemplo, el fibrinógeno contiene un motivo estructural que se une al receptor de monocitos MAC-1. Al unirse el fibrinógeno a la superficie del implante, cambia su conformación y expone el sitio de unión a MAC-1. En consecuencia, las células inmunológicas, tales como los monocitos, son atraídos al implante y activados, secretando enzimas y radicales que atacan al mismo. Además, las células inmunológicas secretan factores solubles, es decir citoquinas, que atraen y activan otras células inmunológicas y, de esta manera, amplifican la respuesta inmunológica. En el caso de que no resulte posible eliminar el implante, las células y proteínas del tejido conectivo forman una cápsula fibrosa. Sin embargo, esta cápsula es una barrera de difusión que impide que los analitos alcancen el sensor. Conjuntamente los sucesos de la respuesta a cuerpos extraños tal como se ha descrito anteriormente es probable que interfiera con la función del sistema de electrodos in vivo y con su tiempo de vida.

De esta manera, una membrana espaciadora mejorada sobre un sistema de electrodos de un sensor enzimático in

vivo proporciona además una reducción de la respuesta del tejido al implante y la inhibición de la formación de una cápsula que separa el sensor del tejido y líquidos corporales circundantes.

De esta manera, es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas y preferentemente una barrera de difusión que controla la difusión del analito desde el exterior del sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima, caracterizado porque la membrana espaciadora forma por lo menos una parte de la capa externa del sistema de electrodos, en el que la membrana espaciadora comprende un copolímero hidrofílico de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en el que el polímero comprende más de 50% molar de monómeros hidrofílicos.

Tal como se ha indicado anteriormente, la membrana espaciadora de la invención efectivamente presenta una capacidad limitada de unión a proteínas para la protección del sistema de electrodos del sensor frente a la adsorción de proteínas que podrían inducir la respuesta de las células inmunológicas y podrían limitar o interferir con su rendimiento in vivo. Los Ejemplos 5 y 6 muestran que la membrana espaciadora preferente de la invención proporciona poca unión al fibrinógeno y evita el cambio conformacional del fibrinógeno que podría conducir a que el motivo de unión a MAC-1 quedara expuesto a los monocitos. Ventajosamente, el material de copolímero de la membrana espaciadora no activa las células inmunológicas por sí mismo. En el Ejemplo 6, pudo demostrarse que el copolímero de membrana espaciadora de la invención es capaz de atenuar la activación de las células inmunológicas por el sensor implantado. Además, ventajosamente, la membrana espaciadora es un material biocompatible, en particular es compatible con líquidos corporales, por ejemplo con la sangre. El Ejemplo 7 demuestra que el copolímero de membrana espaciadora de la presente invención es capaz de impedir la hemólisis y la activación del complemento por parte del sensor implantado. De esta manera, la membrana espaciadora de la invención ventajosamente no sólo muestra una estabilidad mecánica elevada, sino que también presenta propiedades biocompatibles óptimas, lo que resulta inesperado debido a la baja incorporación del agua tras humectarse.

Las características de la presente realización en particular con respecto a la estructura del sistema de electrodos, el analito y las moléculas de enzima son tal como se indican en la presente memoria. La barrera de difusión preferentemente es tal como se indica en la presente memoria. Sin embargo, también puede presentar una composición diferente o puede encontrarse ausente. Según una realización preferente, la barrera de difusión preferentemente comprende un copolímero en bloque que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico tal como se indica en la presente memoria.

Según una realización preferente adicional, la barrera de difusión comprende poliuretanos hidrofílicos. Los poliuretanos hidrofílicos utilizados como membrana de difusión pueden producirse mediante poliadición de un (poli)diisocianato, preferentemente 4,4-metilén-bis(ciclohexilisocianato) con un polialcohol, preferentemente una mezcla de dioles.

Los componentes de la mezcla de dioles preferentemente son polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG) y dioles alifáticos, tales como etilenglicol. Preferentemente, el poliuretano hidrofílico comprende 45% a 55% molar, preferentemente 50% molar de isocianato y 25% a 35% molar, preferentemente 30% molar de etilenglicol. A continuación, se ajusta el grado de hidrofiliación utilizando la proporción de PEG a PPG. Preferentemente, el poliuretano comprende 2% a 3% molar, más preferentemente 2,5% molar de PEG y 17% a 18% molar, preferentemente 17,5% molar de PPG. Con el fin de incrementar la hidrofiliación del poliuretano, la proporción de PEG puede incrementarse, por ejemplo, a 4,5-5,5% molar, preferentemente a 5% molar de PEG, con el fin de obtener un poliuretano extremadamente hidrofílico. Las variantes hidrofílicas diferentes de los poliuretanos también pueden mezclarse con el fin de optimizar las propiedades de la barrera de difusión.

Los monómeros acrílicos y metacrílicos preferentes del copolímero de membrana espaciadora son tal como se indica en la presente memoria.

Las unidades monoméricas hidrofílicas preferentemente se seleccionan de entre ésteres (meta)acrílicos hidrofílicos, es decir, ésteres con un grupo polar, es decir  $\text{OCH}_3$  o  $\text{OC}_2\text{H}_5$  dentro de la parte alcohol del éster, (meta)acrilamidas hidrofílicas con una amida ( $\text{NH}_2$ ) o un grupo N-alquil- o N,N-dialquil-amida, en el que el grupo alquilo comprende 1 a 3 átomos de C y opcionalmente grupos hidrofílicos, tales como OH,  $\text{OCH}_3$  o  $\text{OC}_2\text{H}_5$  y unidades (meta)acrílicas adecuadas que presentan un grupo cargado, por ejemplo aniónico o catiónico, tal como ácido acrílico (acrilato) o ácido metacrílico (metacrilato). Además, pueden utilizarse combinaciones de unidades monoméricas.

Los ejemplos específicos de unidades monoméricas preferentes para el bloque hidrofílico se seleccionan de entre:

- acrilato de 2-hidroxietilo,
- metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA),
- acrilato de 2-metoxietilo,
- metacrilato de 2-metoxietilo,
- acrilato de 2-etoxietilo,

metacrilato de 2-metoxietilo,  
 acrilato de 2- o 3-hidroxipropilo,  
 metacrilato de 2- o 3-hidroxipropilo (2- o 3-HPMA),  
 acrilato de 2- o 3-metoxipropilo,  
 metacrilato de 2- o 3-metoxipropilo,  
 acrilato de 2- o 3-etoxipropilo,  
 metacrilato de 2- o 3-etoxipropilo,  
 acrilato de 1- o 2-glicerol,

5  
 10  
 15  
 metacrilato de 1- o 2-glicerol,  
 acrilamida,  
 metacrilamida,  
 una acrilamida de N-alquilo o N,N-dialquilo, y  
 una metacrilamida de N-alquilo o de N,N-dialquilo, en la que el alquilo comprende 1 a 3 átomos de C, tal como  
 metilo, etilo o propilo,  
 ácido acrílico (acrilato),  
 ácido metacrílico (metacrilato)  
 y combinaciones de los mismos.

20 Los monómeros hidrofílicos preferentes son metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y/o metacrilato de 2- o 3-hidroxipropilo (2- o 3-HPMA).

25 Las unidades monoméricas hidrofóbicas preferentemente se seleccionan de entre unidades acrílicas y/o metacrílicas hidrofóbicas o combinaciones de las mismas. Preferentemente, las unidades monoméricas hidrofóbicas se seleccionan de entre ésteres de (meta)acrilato hidrofóbicos, por ejemplo ésteres que presentan una parte alcohol con 1 a 3 átomos de C sin grupo hidrofílico.

Los ejemplos específicos de unidades monoméricas para el bloque hidrofóbico se seleccionan de entre:

30 acrilato de metilo,  
 metacrilato de metilo (MMA),  
 acrilato de etilo,  
 metacrilato de etilo (EMA),  
 acrilato de n-propilo o i-propilo,  
 metacrilato de n-propilo o i-propilo,  
 35 acrilato de n-butilo,  
 metacrilato de n-butilo (BUMA),  
 acrilato de neopentilo,  
 metacrilato de neopentilo,  
 40 y combinaciones de los mismos.

En una realización preferente, el bloque hidrofóbico comprende metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de n-butilo (BUMA).

45 La membrana espaciadora externa preferentemente cubre por lo menos la parte de electrodo de trabajo que comprende las moléculas de enzima y opcionalmente también otras partes, por ejemplo el contraelectrodo. En caso de hallarse presente, la membrana espaciadora también cubre el electrodo de referencia. La membrana espaciadora preferentemente cubre la superficie implantada entera del sistema de electrodos. La membrana espaciadora preferentemente cubre el electrodo de trabajo, opcionalmente el contraelectrodo y el electrodo de referencia en caso de hallarse presente, en forma de una capa continua.

50 El sistema de electrodos que comprende la membrana espaciadora mejorada de la invención puede ser parte de un sensor, por ejemplo mediante la conexión a un potencióstato y a un amplificador para la amplificación de las señales medidas del sistema de electrodos. El sensor preferentemente es un sensor enzimático no fluido (ENF), más preferentemente un sensor ENF electroquímico. Los electrodos del sistema de electrodos pueden disponerse sobre un sustrato que porta el potencióstato o unirse a una placa de circuitos que porta el potencióstato. Preferentemente,  
 55 el sensor está destinado a la medición de la glucosa.

Una materia objeto de la invención adicional se refiere a la utilización de un copolímero hidrofílico de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en la que el copolímero hidrofílico comprende más de 50% molar de monómeros hidrofílicos a modo de membrana espaciadora para un electrodo enzimático. El copolímero hidrofílico preferentemente es tal como se ha indicado anteriormente. Preferentemente, la membrana espaciadora se utiliza para minimizar la reacción por cuerpo extraño (RCE) contra el electrodo enzimático al insertarlo o implantarlo en el cuerpo.

65

Ejemplo 1 Permeabilidad de un sensor de glucosa enzimático no fluido (ENF) con electrodos distribuidos para la implantación transcutánea con una capa de difusión que consiste de un único copolímero en bloque.

5 El sensor se construyó sobre una estructura de tira conductora de paladio prefabricada sobre un sustrato de poliéster con un grosor de 250  $\mu\text{m}$ . El electrodo de trabajo (ET) y el contraelectrodo (CE) se organizaron de manera repartida (tal como se muestra en las figs. 1 y 2).

10 Los campos del CE se sobrepusieron con pasta de carbono; el resto de la tira conductora se aisló. Los campos del ET se sobrepusieron con una mezcla de glucosa oxidasa entrecruzada (enzima), pasta de polímero conductora y catalizador eléctrico, en la presente memoria óxido de manganeso (IV) (Technipur). Los caminos restantes de la tira conductora nuevamente fueron aislados. El electrodo de referencia (ER) consistía de pasta de Ag/AgCl. Los electrodos cubrían aproximadamente 1 cm del eje del sensor.

15 Los campos del ET se recubrieron con una capa de difusión de copolímero en bloque que consistía de un bloque de HEMA y un bloque de BUMA. El grosor de la capa era de 7  $\mu\text{m}$ .

20 Se produjeron cuatro lotes de sensores, cada uno provisto de un copolímero en bloque específico como capa de difusión (ver la lista en la presente memoria, posteriormente). Todos los copolímeros en bloque se obtuvieron de Polymer Source, Montréal, y se listan a continuación.

Tabla 1.

Nombre	proporción molecular (%)	unidades monoméricas	peso molecular
Copolímero	BUMA/HEMA	HEMA	Copolímero [kD]
C	73/27	92	47
F	60/40	108	37
D	48/52	162	44
B	62/38	169	61

25 El copolímero en bloque respectivo se disolvió en solvente orgánico (concentración de 25%) y se recubrieron los sensores con él. Tras el secado utilizando secadores de cinta (2 min., 30°C a 50°C), los sensores recubiertos se sometieron a ensayo in vitro en soluciones de glucosa de diferentes concentraciones. De cada lote de sensores se midieron 10 sensores como muestra aleatoria. Como medida de la sensibilidad in vitro, se calculó la señal como la diferencia entre las corrientes medidas a una concentración de 10 mM y de 0 mM de glucosa, que seguidamente se dividió por 10 mM (ver el Ejemplo 4).

30 Se hicieron funcionar todos los sensores a un voltaje de polarización de 350 mV frente a Ag/AgCl, la temperatura medida se mantuvo constante, a 37°C. Los sensores utilizados para dicha serie de mediciones no comprendían el espaciador descrito en el documento n° WO 2010/028708, que, sin embargo, no produjo ninguna diferencia en vista del nivel de señal sometido a ensayo. La fig. 5 muestra la sensibilidad de los sensores con desviación estándar para las cuatro capas de difusión diferentes.

35 Respecto a los copolímeros en bloque C, D y F, existe una clara asociación entre la sensibilidad in vitro y la proporción molar de bloque hidrofóbico en comparación con la de bloque hidrofílico. Con una longitud de cadena total aproximadamente idéntica del copolímero, la sensibilidad se incrementa a medida que se incrementa la cantidad de bloque hidrofílico (HEMA).

40 Los sensores con una capa de difusión de copolímero en bloque B son una excepción. Aunque el polímero B presenta una proporción relativa de cantidad hidrofóbica a hidrofílica similar a la del polímero F, la sensibilidad y, de esta manera, la permeabilidad para la glucosa, resulta reducida. Empíricamente puede afirmarse que en el caso del polímero B, la longitud total de la cadena, correspondiente al peso molecular (total) de la molécula de copolímero, es suficientemente grande para que resulte reducida la permeabilidad de la capa. Lo anterior también puede observarse en la incorporación de agua determinada gravimétricamente de copolímero en bloque B en comparación con la de los polímeros restantes. El polímero B presenta una incorporación de agua de 10,6% $\pm$ 1,5% (porcentaje en peso referido al peso seco de polímero). El polímero C se encuentra comprendido en 15,6% $\pm$ 0,0%, el polímero en 16,5 $\pm$ 3,1% y el polímero D en 27% $\pm$ 1,7%.

50 Ejemplo 2 Flexibilidad mecánica de la capa de difusión de un sensor ENF de glucosa.

55 El sensor se fabricó tal como se indica en el documento n° WO2010/028708, presentando sin embargo una capa de difusión según la presente invención. Se partió de la premisa de que la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) era un parámetro sustitutivo de la flexibilidad mecánica. Además, se supuso que la temperatura de transición vítrea, que puede asignarse al bloque hidrofóbico, determinaba la flexibilidad mecánica en las aplicaciones in vivo. Debe indicarse que pueden identificarse varias  $T_g$  para un copolímero en bloque, correspondientes al número de bloques.

Los sensores se recubrieron con las mismas pastas de electrodo tal como en el Ejemplo 1. A continuación, se

recubrieron algunos de los sensores con un copolímero seleccionado de MMA-HEMA (producido por Polymer Source, Montréal). Este polímero (denominado E) presentaba un peso molecular total de 41 kD; la proporción molar de MMA (cantidad hidrofóbica) a HEMA era de 60%:40%. La temperatura de transición vítrea del bloque hidrofóbico era de 111°C, determinada mediante DSC (calorimetría diferencial de barrido) y a una tasa de calentamiento de 10°C/min.

Por otra parte, se proporcionaron otros sensores con la capa de difusión de copolímero en bloque de la invención (denominado A). El bloque hidrofóbico de dicho copolímero A contenía MMA y BUMA a cantidades molares iguales en una secuencia aleatorizada. Nuevamente, la proporción molar de parte hidrofóbica a parte hidrofílica era de 60%:40%. El peso molecular era de 36 kD. La  $T_g$  del bloque hidrofóbico se redujo, debido a la secuencia aleatorizada de MMA y BUMA ( $T_g$  de aproximadamente 45°C), a 73°C.

Se generaron ambas capas de difusión a partir de la solución respectiva (25%) de los copolímeros en éter y se secaron tal como en el Ejemplo 1. El grosor de las capas de difusión era de 7  $\mu$ m. Se aplicó una capa espaciadora posteriormente mediante recubrimiento por inmersión y se secó durante 24 h a temperatura ambiente. La capa espaciadora se realizó en Lipidure CM 5206, producido por NOF Japan.

Tras el explante del tejido, los sensores con una capa de difusión de copolímero E mostraban grietas esporádicas en la capa de difusión. Lo anterior se consideró un efecto de la carga mecánica. En contraste con lo anterior, los sensores con una capa de difusión de copolímero A, no mostraban ninguna grieta bajo una carga idéntica. Lo anterior se debe evidentemente a la reducción de la  $T_g$ , que incrementa la estabilidad mecánica del copolímero. Ya no se requiere una mezcla física de dos copolímeros, tal como se da a conocer en el documento n° WO2010/028708.

Ejemplo 3 Comportamiento de permeación optimizado de un sensor ENF de glucosa con electrodos distribuidos y capa de difusión según la invención.

Se fabricó un sensor tal como se indica en el Ejemplo 1 aunque con una capa espaciadora adicional en el total del eje del sensor. Los sensores con las respectivas capas de difusión se produjeron para los copolímeros A, C, D y F de los Ejemplos 1 y 2. Con este fin se generó una solución etérea al 24% del copolímero. Se aplicó cada solución sobre un juego de sensores (N=10) y después se secó en un secador de cinta. De esta manera, se obtuvieron capas de difusión con un grosor de 7  $\mu$ m.

Después, se proporcionaron los sensores con una capa espaciadora tal como se indica en el Ejemplo 2.

Se conectó el sensor con un sistema de medición en la cabeza del sensor, que transfiere los datos medidos a un almacén de datos. Las mediciones in vitro se llevaron a cabo tal como se indica en el Ejemplo 1; sin embargo, durante un periodo de medición de 7 días. A partir de los datos medidos, se calculó la deriva de la sensibilidad en todo el periodo de medición respectivo para cada sensor. La figura 6 muestra para cada variante de sensor, es decir, para los sensores de una variante de capa de difusión, el valor medio del valor de deriva in vitro para el grupo. La etapa inicial de la medición (las primeras 6 h, la etapa denominada de inicio) se excluyó del cálculo.

Para todos los copolímeros C, D y F con un bloque hidrofóbico de BUMA existe una deriva positiva, es decir, la sensibilidad se incrementa con el tiempo. Por el contrario, el copolímero A con el bloque hidrofóbico de un copolímero aleatorio de MMA y BUMA, conduce a una deriva muy baja, ligeramente negativa.

Dichas diferencias pueden explicarse con la respuesta de permeabilidad a largo plazo de las capas de difusión respectivas, que se midió en experimentos adicionales. Los sensores de paladio sin pasta de ET, pero con una superficie activa definida, es decir, también sin una capa de enzima, excluyendo la influencia de su comportamiento de hinchado sobre los resultados, se recubrieron con las soluciones de polímero anteriormente indicadas y, tras el secado, se midió el grosor de la capa. Posteriormente se midió la conductividad en solución tampón que contenía sodio y cloro.

La fig. 7 demuestra que la conductividad del copolímero A se mantiene prácticamente constante tras una corta etapa de inicio.

Lo anterior no es el caso para el copolímero F, incluso bajo condiciones de medición idénticas, tal como puede observarse en la fig. 8. En este caso, se observó una respuesta de permeabilidad fuerte y a largo plazo de la capa de difusión de copolímero F, que era prácticamente independiente del grosor de la capa. Para el copolímero F, y también para los copolímeros C y D (no mostrados), con un bloque hidrofóbico de BUMA, resulta un incremento de la permeabilidad incluso durante un periodo de tiempo prolongado. En caso de medirlo, ello lleva a un incremento continuo de la sensibilidad en caso de que se aplique la capa de difusión sobre el sensor con una capa de enzima distribuida. Lo anterior explica la deriva positiva del sensor que se observa.

A la inversa, un sensor con un copolímero en bloque A muestra una deriva insignificante, que se debe a una alteración de la permeabilidad muy baja de la medición de conductividad. Sin embargo, directamente después de iniciar las mediciones (hasta aproximadamente 1 h después), se observó un fuerte incremento de la conductividad en el copolímero A. En este caso, se observó un inicio muy rápido, que se terminó después de aproximadamente 1 hora. En este momento la capa de difusión ha sido completamente humectada y ha finalizado su reorganización estructural debido a la incorporación de agua. El grado de cambio estructural presumiblemente depende de la  $T_g$ . Es plausible que un copolímero con una  $T_g$  incrementada experimente una reorganización, que será limitada en el tiempo y en amplitud, en comparación con un copolímero con una  $T_g$  en el intervalo de la temperatura ambiente.

Además, debe indicarse que los sensores con copolímero A muestran una sensibilidad comparativamente elevada al inicio de las mediciones en comparación con los sensores con una capa de difusión de copolímero F. Lo anterior es esperable debido a las proporciones relativas idénticas entre bloques hidrofóbico e hidrofílico. El intervalo de sensibilidad alcanzado de 1 a 1,5 nA/mM (ver el Ejemplo 1) se considera ideal. De manera similar, dicha sensibilidad se obtiene para sensores con una capa de difusión que consiste de polímero A.

Con respecto a la suma de las tres características físicoquímicas: permeabilidad, estabilidad mecánica y respuesta de permeabilidad, puede obtenerse preferentemente un sensor óptimo con una capa de difusión de un copolímero en bloque, que presenta un bloque hidrofóbico con por lo menos dos unidades monoméricas hidrofóbicas dispuestas aleatoriamente diferentes, tal como el copolímero en bloque A. Ninguno de los otros copolímeros en bloque, los bloques hidrofóbicos de los cuales consisten de una única unidad monomérica, alcanzaba una calidad que pudiese compararse en la totalidad de los tres parámetros con el copolímero A.

#### Ejemplo 4 Caracterización de los copolímeros en bloque.

Se produjo un sensor de múltiples campos (10 campos de electrodos de trabajo y contraelectrodos, respectivamente) para la medición continua de la glucosa y se caracterizó in vitro.

El sensor se proporcionó con una capa de difusión que consistía de un copolímero en bloque que comprendía un bloque hidrofóbico de metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de n-butilo (BUMA) copolimerizados aleatoriamente y un bloque hidrofílico de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). Dichos polímeros (llamados G y H) habían sido producidos por Polymer Source, Montréal, y eran más permeables que el polímero A de los Ejemplos 1 a 3.

En la Tabla 2 a continuación se indican los copolímeros:

Polímero	G	H	A
Pesos moleculares $P_m$ [kD]	23,5-b-29	21-b-20,5	21-b-15
% en peso de HEMA	55,2	49,4	41,6
% molar de HEMA (esquiométrico)	53,5	47,4	40
% molar de HEMA (medido mediante RMN $^1H$ , $^{13}C$ )	51	46	32,6
$T_g$ [°C] bloque hidrofóbico	65	68	86
unidades monoméricas de HEMA	223	157	115
unidades monoméricas de MMA	194	174	174

Los pesos moleculares  $P_m$  de cada bloque se han indicado separadamente en la Tabla 2, anteriormente indicada, y representan los valores medios, ya que es conocido que los polímeros presentan distribuciones de longitudes de cadena molecular en torno a un valor medio especificado. Lo anterior se aplica también a las cantidades derivadas en la Tabla 2.

Las temperaturas de transición vítrea indicadas del bloque hidrofóbico se encuentran dentro del intervalo deseado a fin de garantizar la flexibilidad mecánica.

El parámetro decisivo con respecto a la permeabilidad de la barrera de difusión para el analito es la sensibilidad por unidad de área del electrodo de trabajo (es decir, el área geométrica). Se calculó la sensibilidad SE a partir de las mediciones de corriente (I) a las concentraciones de glucosa de 10 mM y 0 mM en solución tamponada de fosfato (pH 7,4) en nA/mM:

$$SE = [(I(10 \text{ mM}) - I(0 \text{ mM}))]/10$$

para cada uno de los sensores analizados. A partir de los valores medidos individuales (N=8), se determinó la sensibilidad promedio  $SE_m$ . Los valores de sensibilidad obtenidos se dividieron por el área total geométrica F medida mediante microscopía de todos los puntos de electrodo de trabajo en el sensor multicampo. De esta manera se obtuvo una densidad de sensibilidad  $SE_m/F$ .

La linealidad Y de la curva de la función in vitro es una indicación de la funcionalidad de control de la difusión de la

capa de recubrimiento de polímero sobre el electrodo de trabajo. Se calculó a partir de las mediciones de corriente a una concentración de glucosa de 20 mM, 10 mM y 0 mM, en %:

$$Y^{20mM} = 50 \cdot [I(20mM) - I(0mM)] / [I(10mM) - I(0mM)]$$

5 para cada uno de los sensores analizados. A partir de los valores de medición individuales, se determinó el valor de linealidad medio y la desviación estándar del mismo (ver la Tabla 3).

10 Finalmente, se determinó el grosor de la capa L de la barrera de difusión de los sensores mediante la medición óptica de cada uno de los polímeros. Se calcularon los valores medios correspondientes para una muestra de  $\geq 23$  sensores con el mismo polímero. A partir de lo anterior puede calcularse el coeficiente de difusión eficaz  $D_{ef}$  de la capa de recubrimiento:

$$D_{ef} = SE_m / F \cdot L_m \cdot 5,182 \cdot 10^{-8}$$

15 en  $cm^2/s$ , en donde  $SE_m$  y  $L_m$  son los valores medios respectivos para la sensibilidad y el grosor de capa, y F es el área total de todos los puntos de electrodo de trabajo.

20 Se calculó la deriva del sensor a partir de las repeticiones de los tramos de concentración de glucosa durante 7 días de mediciones in vitro. En la figura 9 se ilustran los resultados para el polímero H, que muestran una conductividad sustancialmente constante.

La Tabla 3, a continuación, muestra los resultados de la caracterización funcional:

Polímero	G	H
$SE_m/F$ [ $nA/mM \cdot mm^2$ ]	1,85	1,25
Deriva [%d]	-1,5 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1
$Y^{20mM}$ [%]	88,2 $\pm$ 0,7	88,6 $\pm$ 0,3
grosor de la capa $L_m$ [ $\mu m$ ]	11,61	12,69
$D_{ef}$ [ $cm^2/s$ ]	1,11305 $\cdot 10^{-9}$	8,22019 $\cdot 10^{-10}$

25 Para el polímero G más hidrofílico (que es más permeable a la glucosa), también se determinó el coeficiente de difusión mediante un método alternativo, por ejemplo la permeación de glucosa desde una cámara con una solución de glucosa hasta una cámara con un tampón sin glucosa a través de una película del polímero. Según dicho método se obtuvo un valor similar para el coeficiente de difusión ( $1,17 \cdot 10^{-9} cm^2/s$ ).

30 Ejemplo 5 Unión de proteínas al material de la capa espaciadora.

35 Para evaluar la unión de las proteínas a materiales de la capa espaciadora, se llenó una placa de incubación (FluoroNunc Maxisorp, Thermo Scientific) con soluciones etanólicas de Adapt® (Biointeractions Ltd, Reading, England) o Eudragit E100 (Evonik Industries). Eudragit E100 es un copolímero catiónico basado en metacrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo. Se secaron los polímeros durante la noche a 40°C. Después, sobre los materiales del espaciador se aplicó una solución de fibrinógeno. La solución contenía fibrinógeno de plasma humano que se conjugó con el pigmento fluorescente Alexa488 (obtenido de Invitrogen). Tras 4 h de incubación, se aspiró la solución de fibrinógeno y las capas espaciadoras se lavaron ocho veces con tampón borato.

40 Se analizó la cantidad de proteína unida al espaciador mediante la medición de la intensidad de fluorescencia en la placa de incubación a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm utilizando un lector de fluorescencia (Synergy4, BioTek Instruments). Se utilizaron concentraciones conocidas de proteína marcada (6,25-500 ng) para preparar una curva de calibración a fin de convertir las lecturas de fluorescencia a cantidades de proteína.

50 Tal como se esperaba, el fibrinógeno unido a la placa de incubación no recubierta (Blanco) resultó en 390 ng de proteínas unidas (fig. 10). La placa recubierta con Eudragit E100 mostró una unión de proteína reducida, de 60 ng. Prácticamente no era detectable ninguna proteína unida a la placa recubierta con Adapt®. Las lecturas antes de la incubación resultaron de la fluorescencia de fondo. Estos resultados demuestran claramente que las superficies recubiertas con los materiales espaciadores, especialmente los recubiertos con Adapt®, se encuentran bien protegidas frente a la adhesión del fibrinógeno.

55 Ejemplo 6 Liberación de citoquinas por células después del contacto con capa espaciadora.

Los sensores se fabricaron tal como se indica en el Ejemplo 2. Después, se proporcionaron los sensores con una capa espaciadora tal como se indica en el Ejemplo 2. La capa espaciadora se preparó con Lipidure CM 5206 (NOF Corporation, Japón) o se preparó con Adapt® (Biointeractions Ltd., Reading, Inglaterra).

Los sensores sin capa espaciadora, sensores con capa espaciadora realizada en Lipidure CM 5206 o los sensores con una capa espaciadora realizada en Adapt® se incubaron con células THP-1 monocíticas y se analizó la inducción de los marcadores inflamatorios. Las células THP-1 se cultivaron en presencia de los sensores durante 24 h a 37°C. A continuación, las células se recolectaron mediante centrifugación. Se utilizó el sobrenadante para determinar la liberación de citoquinas, mientras que el pellet celular se resuspendió en PBS que contenía 1% de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) y se utilizó para analizar la expresión de la proteína de superficie celular CD54 (también conocida como ICAM-1, un biomarcador inflamatorio). Las células THP-1 se incubaron con un anticuerpo anti-CD54 conjugado con el pigmento fluorescente ficoeritrina (BD Bioscience). Tras la incubación durante 45 min. a 4°C, las células se lavaron en PBS/BSA al 1% y se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de 10.000 células utilizando un citómetro de flujo (longitud de onda de excitación: 532 nm; longitud de onda de emisión: 585 nm) (BD FACSAarray, BD Bioscience). En comparación con las células THP-1 no tratadas, la incubación con sensores sin recubrimiento resultó en una expresión de CD54 relativa incrementada (inducción de 6 veces) tal como indica la elevada IMF (fig. 11). La incubación de las células con sensores recubiertos con capas espaciadoras de CM 5206 o Adapt® resultó en la atenuación de la expresión de CD54 en 45% y 41%, respectivamente.

Se utilizó el sobrenadante para determinar la cantidad de las citoquinas interleuquina-8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) utilizando un inmunoensayo basado en perlas siguiendo las instrucciones del fabricante (Flex sets, BD Bioscience) y el análisis de citometría de flujo posterior (BD FACSAarray, BD Bioscience). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software FCAP array v1.0.1 (Soft flow Hungary Ltd.).

En comparación con las células THP-1 no tratadas, los sensores sin recubrimiento indujeron una fuerte liberación de IL-8 (49 frente a 197 pg/ml) (fig. 12A) y de MCP-1 (6 frente a 48 pg/ml) (fig. 12b). La liberación de IL-8 y MCP-1 resultó reducida al recubrir los sensores con capas espaciadoras de CM 5206 o Adapt®. Los sensores recubiertos con Adapt® indujeron la liberación de 100 pg/ml de IL-8 y de 25 pg/ml de MCP-1. Los sensores recubiertos con CM 5206 resultaron en la secreción de 125 pg/ml de IL-8 y de 18 pg/ml de MCP-1.

En conjunto, dichos datos indican que las capas espaciadoras atenúan la inducción de tres biomarcadores de inflamación bien conocidos: CD54, IL-8 y MCP-1.

Con el fin de analizar el papel de la adsorción de las proteínas en la activación de las células THP-1, se recubrieron placas de cultivo de tejidos con CM 5206, Adapt® o Eudragit E100. A continuación, se incubó el espaciador con fibrinógeno humano (Sigma-Aldrich). Las células THP-1 se incubaron con diferentes espaciadores + capas de fibrinógeno. Tras una incubación de 48 h a 37°C, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se analizó el sobrenadante para la liberación de IL-8. A modo de control se cultivaron células en placas de cultivo sin espaciador aunque recubiertas con fibrinógeno (Polyst. = material de placa de cultivo). Tal como se muestra en la fig. 13, dichas células liberaron 89 pg/ml de IL-8. Las células cultivadas sobre CM 5206 + fibrinógeno o sobre Adapt® + fibrinógeno liberaron 68 y 49 pg/ml, respectivamente. En contraste, las células cultivadas sobre Eudragit E100 + fibrinógeno liberaron 206 pg/ml de IL-8. Cabe destacar que las células cultivadas sobre Eudragit E100 sin recubrimiento de fibrinógeno secretaron únicamente 59 pg/ml de IL-8. La adsorción de fibrinógeno sobre la superficie de polímero y los cambios conformacionales en la proteína podrían exponer el sitio de unión de MAC-1. Las células THP-1 que resultan activadas mediante la unión a su receptor MAC-1 liberan citoquinas tales como IL-8 y de esta manera inducen una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, las capas espaciadoras realizadas en Adapt® o CM 5206 evitan la deposición de las proteínas y la exposición de motivos estructuras sobre las superficies (tal como sensores) y, de esta manera, minimizan las reacciones inflamatorias contra los implantes.

#### Ejemplo 7 Hemólisis limitada de sensores recubiertos con una capa espaciadora.

Se fabricaron sensores tal como se indica en el Ejemplo 2. Después, se proporcionaron los sensores con una capa espaciadora tal como se indica en el Ejemplo 2. La capa espaciadora se preparó con Lipidure CM 5206 (NOF Corporation, Japón) o se preparó con Adapt® (Biointeractions Ltd., Reading, Inglaterra).

Se analizó el potencial hemolítico de sensores sin capa espaciadora, de sensores con capa espaciadora realizada en Lipidure CM 5206 y de sensores con capa espaciadora realizada en Adapt®. Por lo tanto, se incubaron sensores con una superficie de total de 6 cm<sup>2</sup> con glóbulos rojos y seguidamente se determinó la lisis mediante la medición de la liberación de hemoglobina al sobrenadante. Se aislaron los eritrocitos a partir de sangre humana recién extraída, mediante centrifugación (se utilizó citrato para evitar la coagulación). A continuación, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se diluyeron 1:40 en PBS. La suspensión de eritrocitos se incubó con los sensores durante 24 h a 37°C en la oscuridad sobre una plataforma giratoria (350 rpm). Después, las células se sedimentaron mediante centrifugación y el contenido de hemoglobina del sobrenadante se determinó espectroscópicamente mediante la medición de la absorción del sobrenadante a una longitud de onda de 575 nm. Los resultados se presentan como índice lítico, en %, que es la liberación de hemoglobina en una muestra dividido por la hemoglobina liberada en el control positivo (=lisis osmótica completa de eritrocitos en agua destilada). Se muestran los resultados en la fig. 14.



5 Los sensores sin una capa espaciadora causaron un nivel significativo de hemólisis, tal como indica un índice hemolítico elevado, de 47,4%. El recubrimiento de los sensores con una capa espaciadora de Lipidure CM 5206 redujo el potencial hemolítico de los sensores, tal como demuestra un índice lítico de 14,7%. Los sensores recubiertos con una capa espaciadora de Adapt® causó marginalmente hemólisis, resultando en un índice lítico de 7,5%, que se encuentra en el intervalo del control negativo (=eritrocitos en PBS incubado sin material de ensayo) o Adapt® solo. Estos resultados indican la función protectora de la capa espaciadora, que reduce la hemólisis.

## REIVINDICACIONES

1. Sistema de electrodos para la medición de la concentración de un analito bajo condiciones in vivo, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas, opcionalmente una barrera de difusión que controla la difusión del analito desde el exterior del sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima, caracterizado por que una membrana espaciadora forma por lo menos una parte de la capa externa del sistema de electrodos y en la que la membrana espaciadora comprende un copolímero hidrofílico de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en la que el copolímero hidrofílico comprende más de 50% molar de monómeros hidrofílicos.
2. Sistema de electrodos según la reivindicación 1, en el que la membrana espaciadora es un copolímero hidrofílico de por lo menos 2 o 3 monómeros acrílicos y/o metacrílicos.
3. Sistema de electrodos según la reivindicación 1 o 2, en el que los monómeros hidrofílicos se seleccionan de entre ésteres (meta)acrílicos hidrofílicos con un grupo polar, por ejemplo OH, OCH<sub>3</sub> o OCH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, (meta)acrilamidas hidrofílicas, ácido (meta)acrílico o combinaciones de los mismos, preferentemente seleccionados de entre:
- acrilato de 2-hidroxietilo,
  - metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA),
  - acrilato de 2-metoxietilo,
  - metacrilato de 2-metoxietilo,
  - acrilato de 2-etoxietilo,
  - metacrilato de 2-metoxietilo,
  - acrilato de 2- o 3-hidroxipropilo,
  - metacrilato de 2- o 3-hidroxipropilo (2- o 3-HPMA),
  - acrilato de 2- o 3-metoxipropilo,
  - metacrilato de 2- o 3-metoxipropilo,
  - acrilato de 2- o 3-etoxipropilo,
  - metacrilato de 2- o 3-etoxipropilo,
  - acrilato de 1- o 2-glicerol,
  - metacrilato de 1- o 2-glicerol,
  - acrilamida,
  - metacrilamida,
  - una acrilamida de N-alquilo o N,N-dialquilo, y
  - una metacrilamida de N-alquilo o N,N-dialquilo,
  - en la que el alquilo comprende 1 a 3 átomos de C,
  - ácido acrílico,
  - ácido metacrílico
  - y combinaciones de los mismos,
- más preferentemente de entre metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), metacrilato de 2-hidroxipropilo (2-HPMA) y combinaciones de los mismos.
4. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el copolímero hidrofílico de la membrana espaciadora comprende por lo menos 60% molar o por lo menos 70% molar de monómeros hidrofílicos.
5. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el copolímero de la membrana espaciadora comprende por lo menos hasta 40% molar o hasta 30% molar de monómeros hidrofóbicos, preferentemente seleccionados de entre:
- acrilato de metilo,
  - metacrilato de metilo (MMA),
  - acrilato de etilo,
  - metacrilato de etilo (EMA),
  - acrilato de n-propilo o i-propilo,
  - metacrilato de n-propilo o i-propilo,
  - acrilato de n-butilo,
  - metacrilato de n-butilo (BUMA),
  - acrilato de neopentilo,
  - metacrilato de neopentilo,
  - y combinaciones de los mismos,
- más preferentemente de entre metacrilato de metilo (MMA), metacrilato de n-butilo (BUMA) y combinaciones de los mismos.

- 5
6. Sistema de electrodos según la reivindicación 5, en el que los monómeros hidrofóbicos son metacrilato de metilo (MMA) o metacrilato de n-butilo (BUMA) y los monómeros hidrofílicos son metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y/o metacrilato de 2-hidroxipropilo (2-HPMA).
- 10
7. Sistema de electrodos según la reivindicación 5 o 6, en el que la membrana espaciadora comprende un copolímero de entre metacrilato de n-butilo (BUMA), metacrilato de 2-hidroxietilo (2-HEMA) y metacrilato de 2-hidroxipropilo (2-HPMA), en el que el copolímero comprende más de 80% molar de monómeros de 2-HEMA.
- 15
8. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el copolímero hidrofílico es un copolímero aleatorio o un copolímero en bloque.
- 20
9. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el grosor de la membrana espaciadora es inferior a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , preferentemente inferior a 3  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ .
- 25
10. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la incorporación de agua relativa del copolímero hidrofílico no excede de 50% en peso, preferentemente 40% en peso, más preferentemente 30% en peso, respecto al peso total del copolímero.
- 30
11. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la barrera de difusión comprende un poliuretano hidrofílico o un copolímero en bloque que presenta por lo menos un bloque hidrofílico y por lo menos un bloque hidrofóbico.
- 35
12. Sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, 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 han dispuesto moléculas de enzima inmovilizadas (5) y opcionalmente la barrera de difusión (8) y una membrana espaciadora (9), que cubre por lo menos el electrodo de trabajo (1) y opcionalmente también el contraelectrodo (2).
- 40
13. Sensor que es insertable o implantable en un cuerpo, que comprende un sistema de electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el sensor preferentemente está destinado a la medición de la glucosa.
14. Utilización de un copolímero hidrofílico de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en la que el copolímero hidrofílico comprende más de 50% molar de monómeros hidrofílicos a modo de membrana espaciadora para un sistema de electrodos enzimático.
15. Utilización según la reivindicación 14 para la minimización de la reacción a cuerpos foráneos (RCF) contra el sistema de electrodos enzimático.

Figuras 1-3

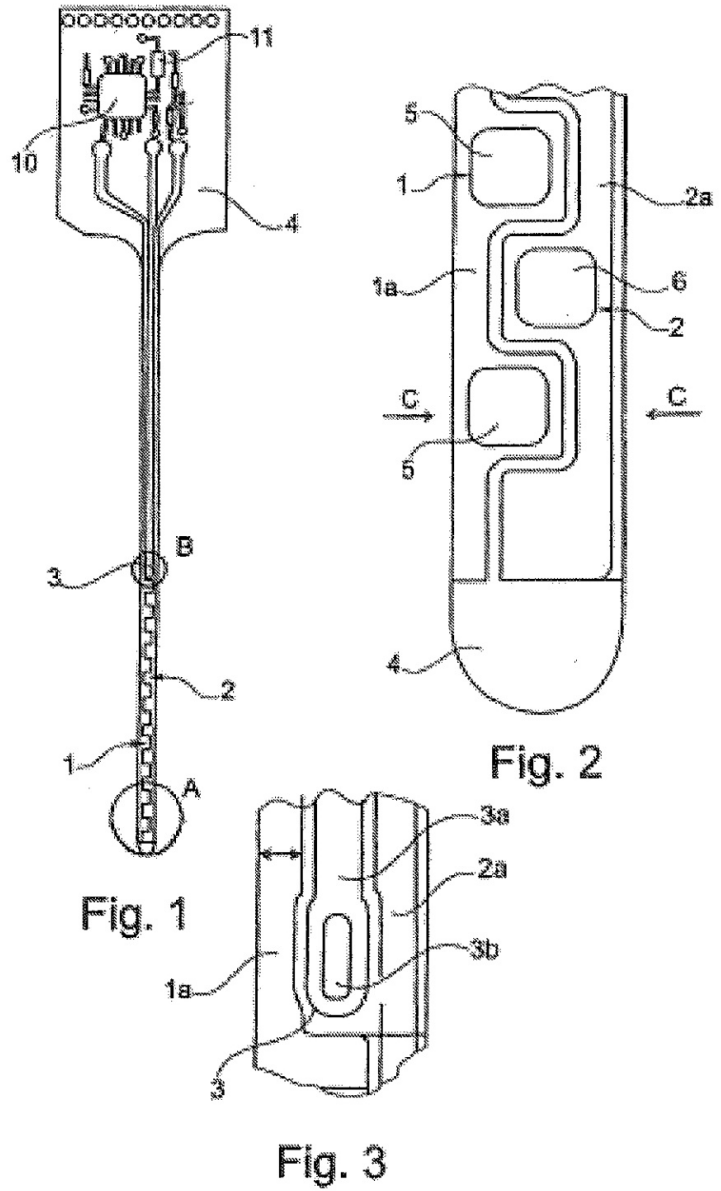


Figura 4

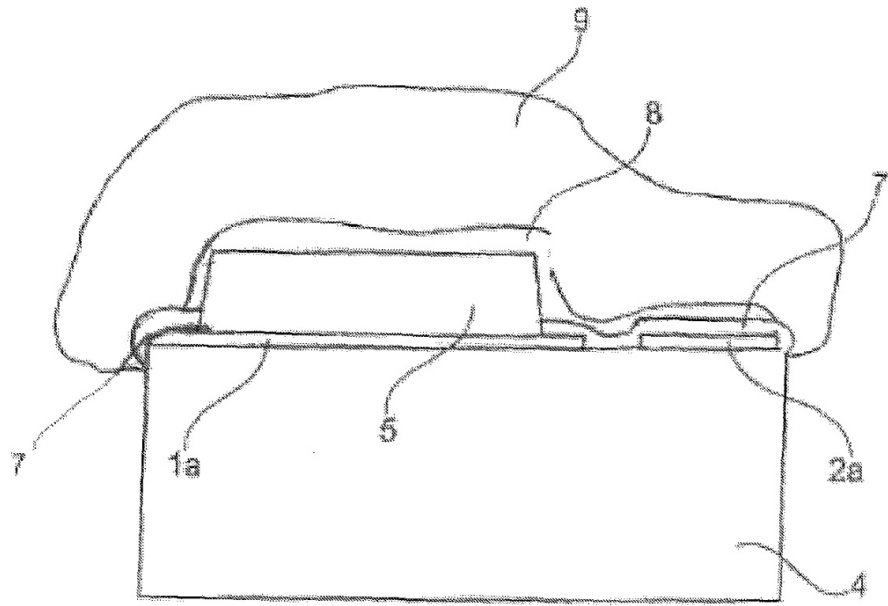


Figura 5

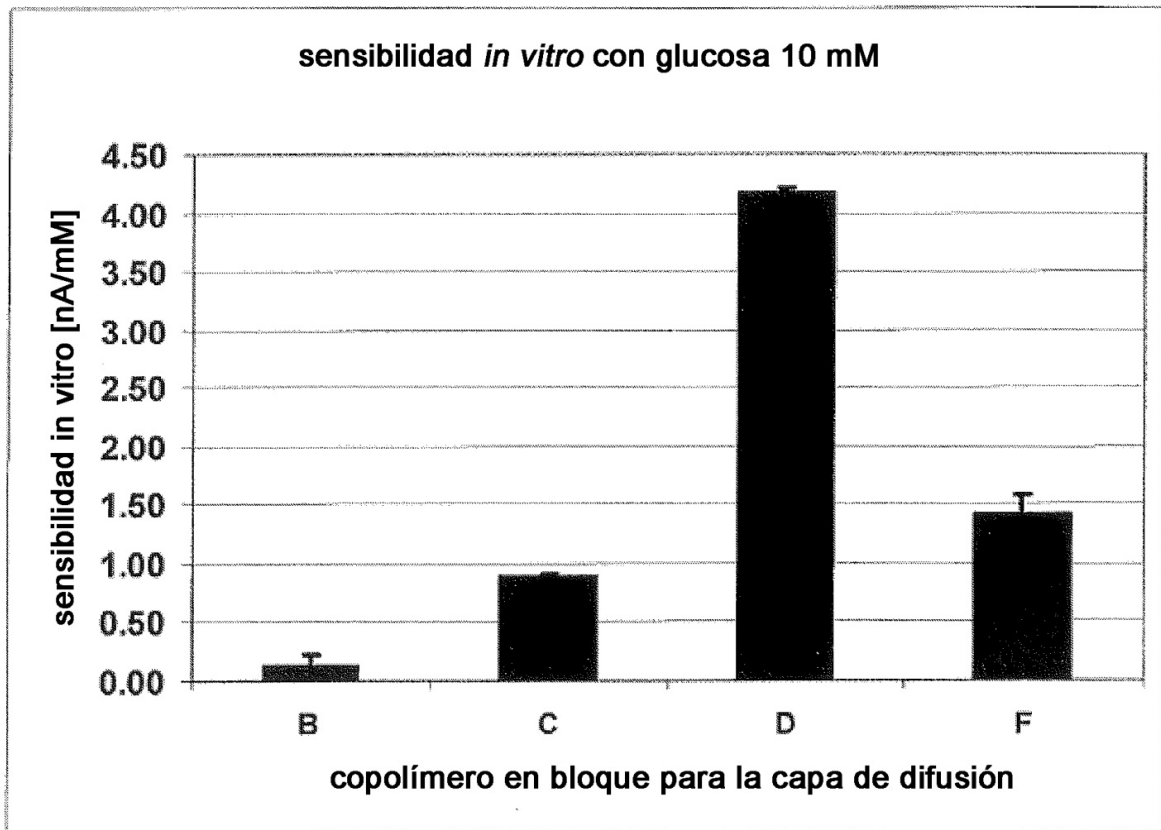


Figura 6

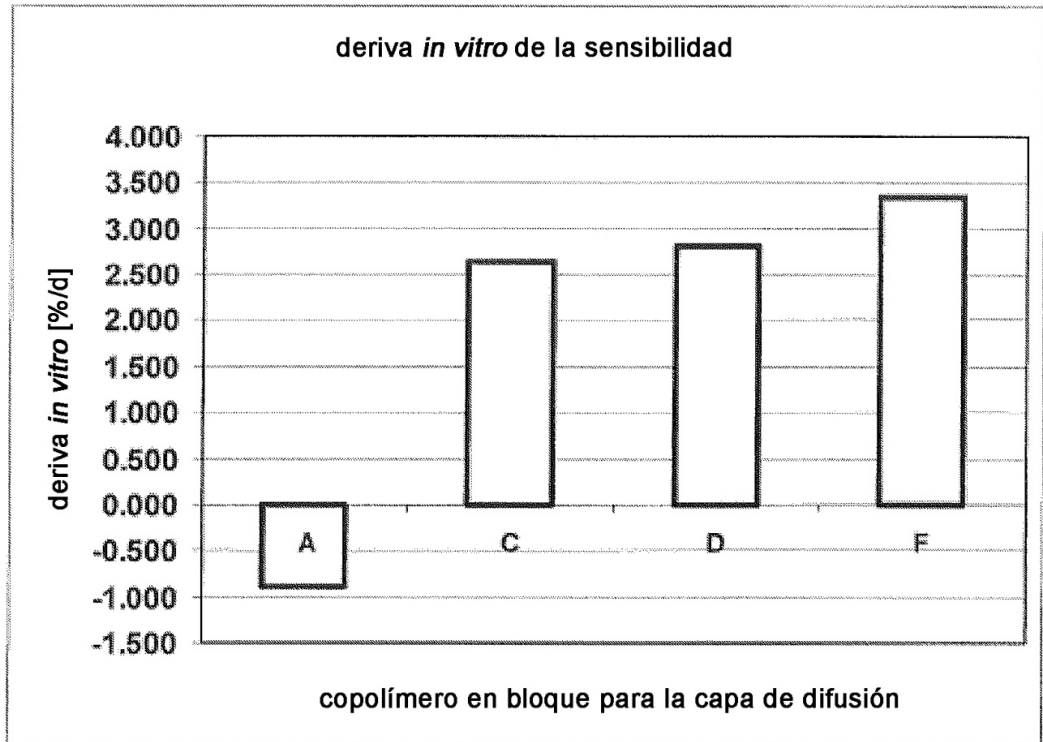


Figura 7

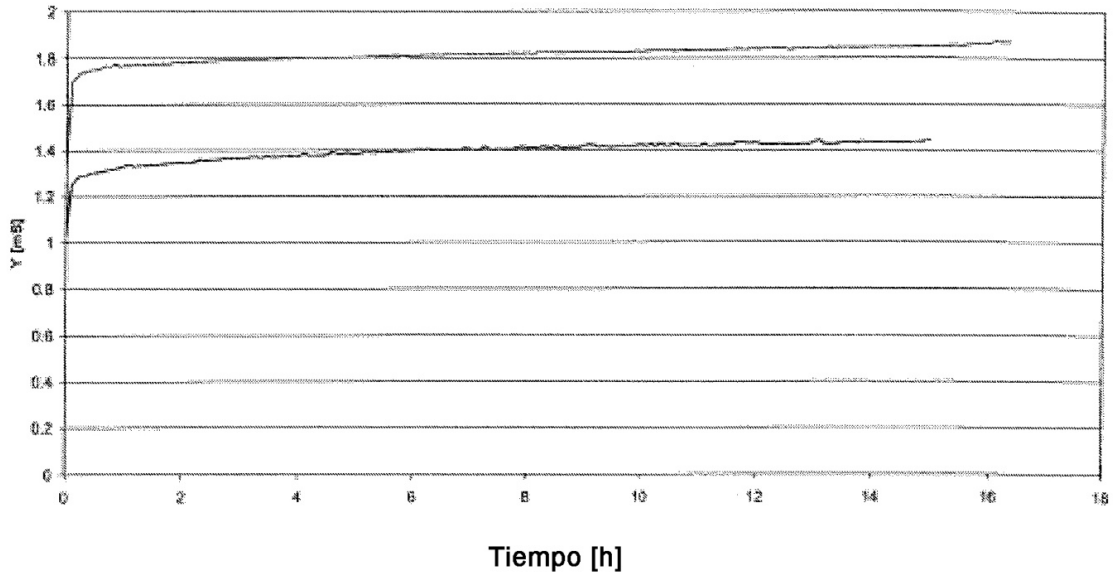




Figura 8

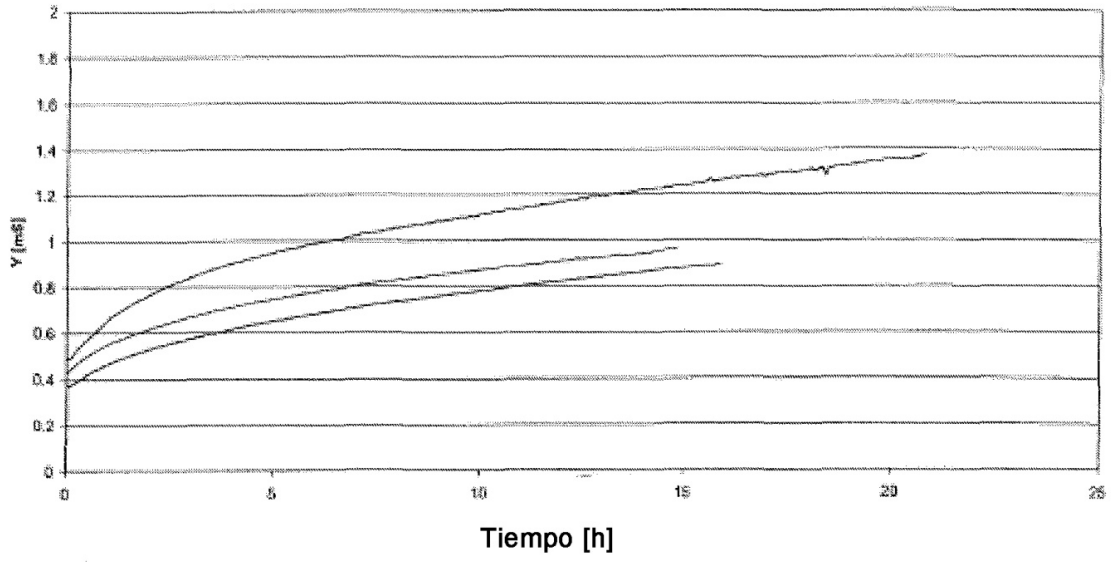


Figura 9

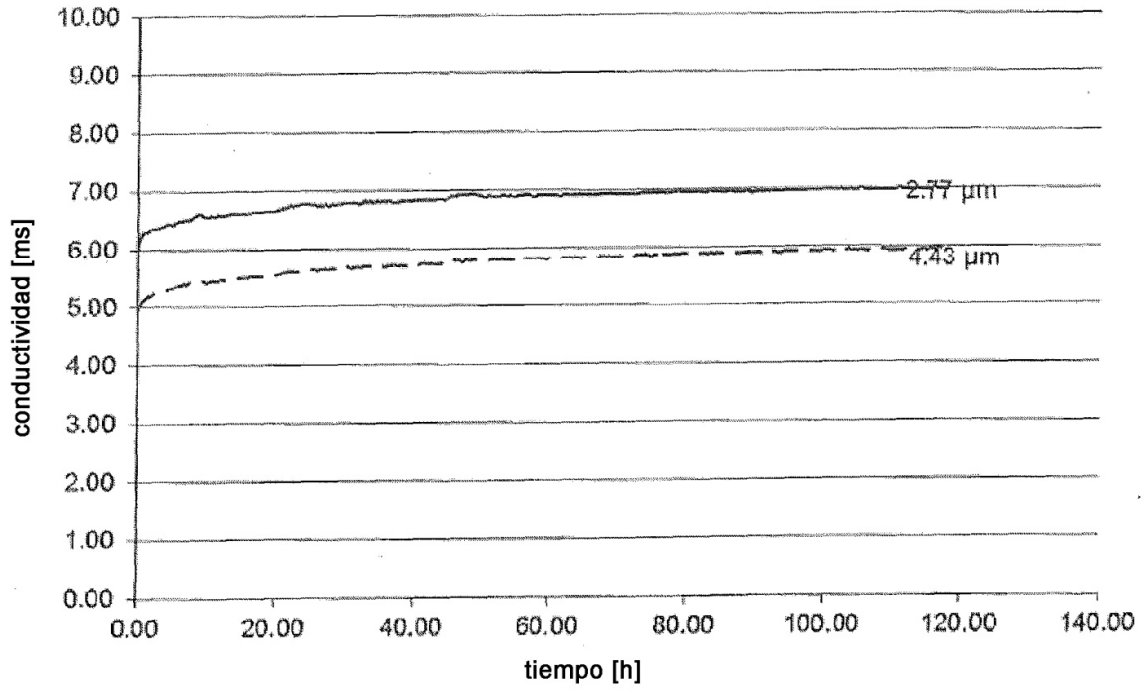


Figura 10

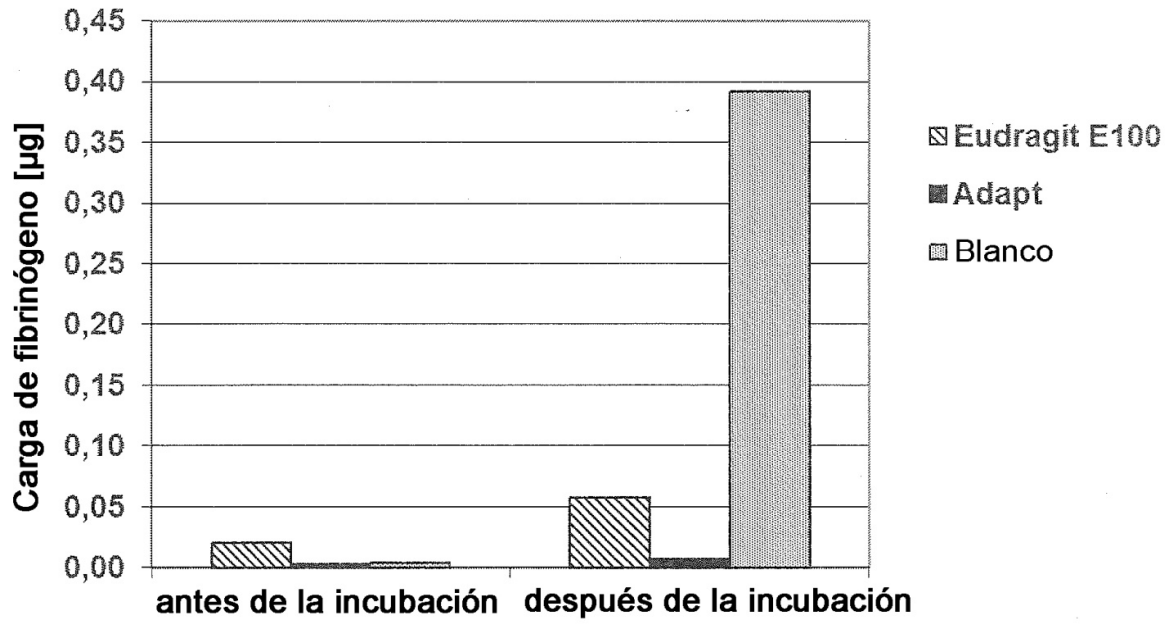


Figura 11

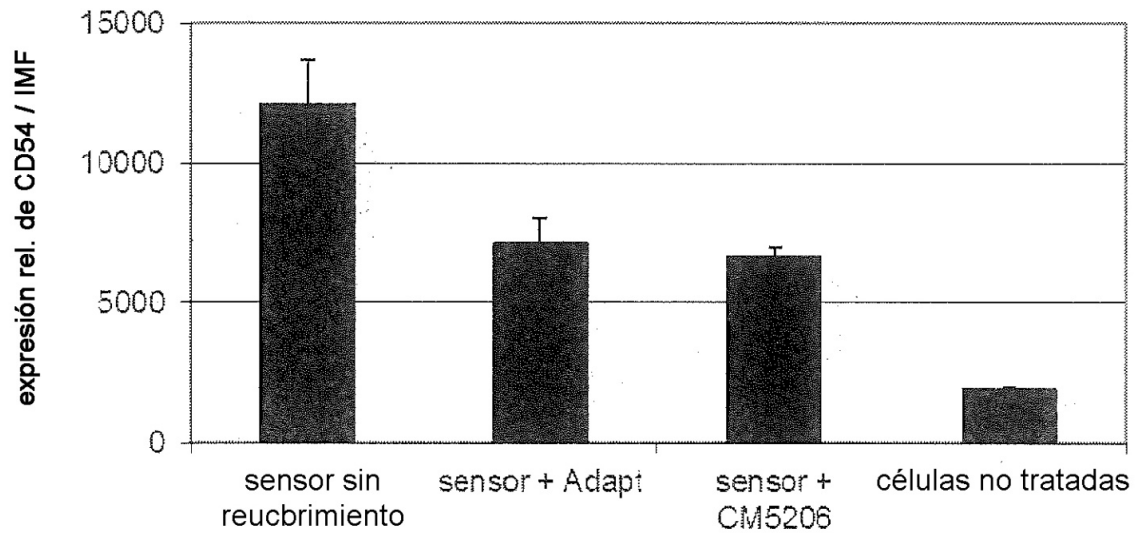


Figura 12a

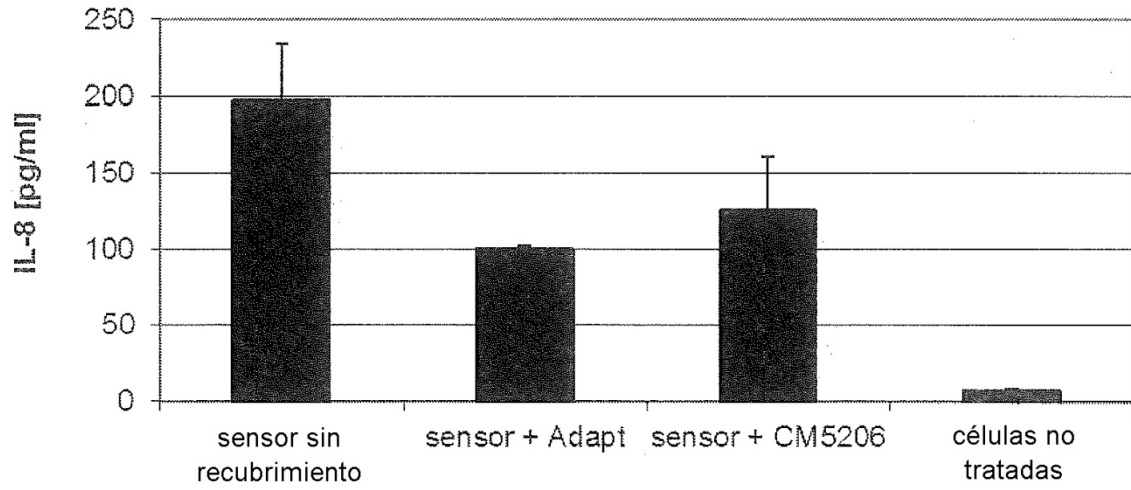


Figura 12b

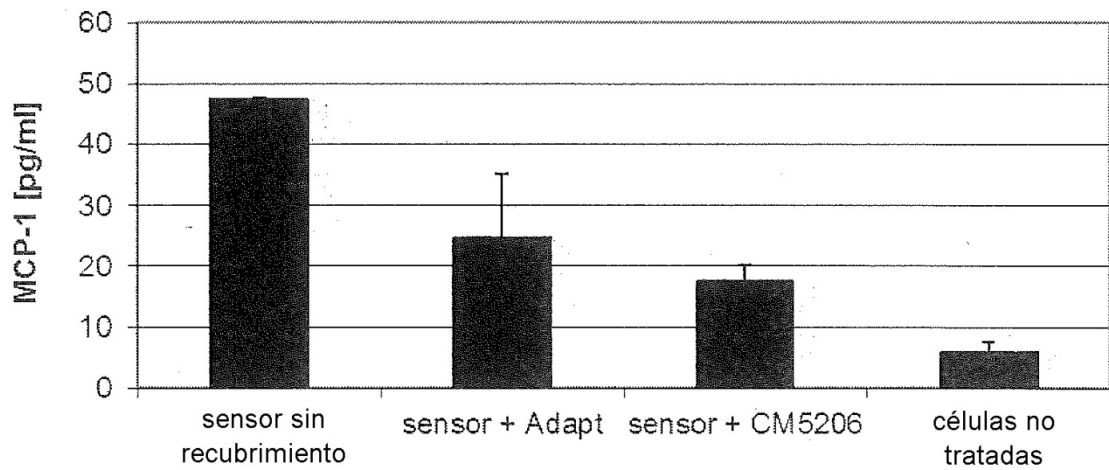


Figura 13

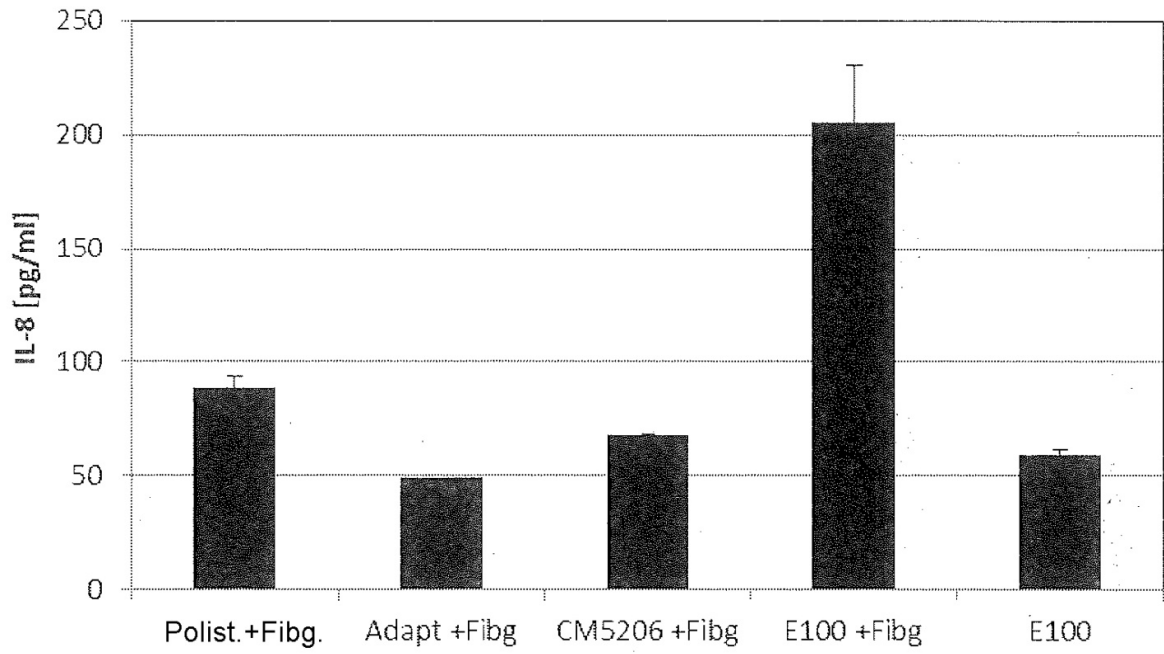


Figura 14

