(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 707 347**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013 E 17169444 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3219807**

(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:
03.04.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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*

La presente invención se refiere a un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en condiciones *in vivo*, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas y una barrera de difusión mejorada que controla la difusión del analito desde el líquido corporal que rodea el sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima.

Además, la presente invención se refiere a un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en 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, y una membrana espaciadora mejorada que forma al menos una porción de la capa externa del sistema de electrodos.

Los sensores con sistemas de electrodos implantables o insertables facilitan las mediciones de analitos significativos desde el punto de vista fisiológico, tales como, por ejemplo, lactato o glucosa en el organismo de un paciente. Los electrodos de trabajo de los sistemas de este tipo tienen capas enzimáticas eléctricamente conductoras en las que están unidas moléculas de enzima que liberan portadores de carga por conversión catalítica de moléculas de analito. En el proceso, se genera como señal de medición una corriente eléctrica cuya amplitud se correlaciona con la concentración del analito.

Dichos sistemas de electrodos se conocen, por ejemplo, por los documentos WO 2007/147475 y WO 2010/028708.

Los electrodos de trabajo del sistema de electrodos están provistos de una barrera de difusión que controla la difusión del analito a determinar desde líquido o tejido corporal que rodea el sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima que están inmovilizadas en la capa enzimática. De acuerdo con el documento WO 2010/028708, la barrera de difusión del sistema de electrodos es una solución sólida de al menos dos polímeros distintos, 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.

El documento WO 2007/147475 divulga una barrera de difusión fabricada de un polímero que tiene una estructura zwitteriónica. Un ejemplo de tal polímero es poli(2-metacriloiloxietil fosforilcolina-co-n-butilmetacrilato). El polímero zwitteriónico se puede mezclar con otro polímero, por ejemplo poliuretano.

El uso de mezclas de polímeros o copolímeros, sin embargo, presenta desventajas en el aspecto de que la preparación de la mezcla y su aplicación al sensor es tediosa y potencialmente problemática. Habitualmente, los polímeros a mezclar se disuelven de forma individual y las soluciones resultantes se mezclan a continuación en la proporción deseada. Esto, sin embargo, puede dar como resultado la precipitación de uno de los componentes y, en consecuencia, problemas de operabilidad, por ejemplo en un procedimiento de pulverización. Se producen mayores dificultades cuando la mezcla comprende un polímero con características iónicas, es decir, cuando uno de los polímeros a mezclar comprende un monómero que tiene grupos aniónicos o catiónicos. La presencia de tales grupos cargados, sin embargo, tiene un fuerte efecto sobre la solubilidad, haciendo difícil encontrar un disolvente adecuado tanto para el polímero cargado como para un polímero no cargado.

El documento WO 2006/058779 divulga un sensor basado en enzimas con una capa combinada de difusión y enzimática que comprende al menos un material polimérico, y partículas que transportan una enzima, en donde las partículas están dispersas en el material polimérico. El polímero puede comprender secuencias de cadena de polímero hidrófilas así como hidrófobas, por ejemplo, el polímero puede ser un copolímero de poliéter-poliuretano de alta o baja captación de agua. No se divulga el uso de copolímeros de bloque que tengan al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo como capa de difusión.

El documento EP-A-2 163 190 describe un sistema de electrodos para la medición de una concentración de analito *in vivo* que comprende un contraelectrodo con un conductor eléctrico, y un electrodo de trabajo con un conductor eléctrico sobre el cual se emplaza una capa enzimática que comprende moléculas de enzima inmovilizadas. Una barrera de difusión controla la difusión del analito desde los líquidos corporales que lo rodean hasta las moléculas de enzima. La barrera de difusión puede comprender poliuretanos hidrofilizados obtenibles por policondensación de 4,4'-metilen-bis-(ciclohexilisocianato) y mezclas de dioles que pueden ser polietilenglicol y polipropilenglicol. La capa de poliuretano hidrófila puede cubrirse con un espaciador, por ejemplo un copolímero de metacrilato de butilo y 2-metacriloiloxietil-fosforil colina. No se divulga el uso de copolímeros de bloque que tengan al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo como capa de difusión. Tampoco se divulga el uso de un copolímero hidrófilo de monómeros (met)acrílicos que comprende más del 50 % molar de monómeros hidrófilos.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una barrera de difusión en un sistema de electrodos de un sensor enzimático *in vivo* que proporcione características fisicoquímicas convenientes y que pueda fabricarse fácilmente.

Este objetivo se cumple proporcionando una barrera de difusión que consiste en un copolímero de bloque único que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo. Los bloques hidrófilos e hidrófobos están unidos covalentemente entre sí. Preferentemente, los bloques son bloques poliméricos de (met)acrilato.

La barrera de difusión basada en copolímero en bloque proporciona excelentes características fisicoquímicas como sigue:

(i) permeabilidad de la barrera de difusión para el analito a determinar,
(ii) características de permeabilidad de la barrera de difusión que son 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, lo que permite fabricar sensores *in vivo* con múltiples electrodos extendidos;
(iv) incorporación eficaz de grupos iónicos en la capa de difusión, es decir, la densidad de las cargas catiónicas o aniónicas dentro del polímero se puede ajustar de forma eficaz, esto es importante para la repulsión o atracción de los analitos cargados y/o el control de la adhesión celular, por ejemplo de monocitos del líquido o tejido corporal circundante.

Una materia objeto de la presente invención es un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en 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 hasta las moléculas de enzima, caracterizado por que la barrera de difusión comprende un copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo.

Preferentemente, la barrera de difusión comprende un único, es decir, solo un copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo, es decir, están ausentes otros polímeros o copolímeros. Más preferentemente, la barrera de difusión consiste en un copolímero de bloque único que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo.

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

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

El sistema de electrodos de la invención es preferentemente parte de un sensor enzimático, no fluido (ENF), en donde 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, lo que da como resultado la generación de una señal eléctrica. Las enzimas pueden estar presentes en una capa que cubre el electrodo. Adicionalmente, pueden estar presentes mediadores redox y/o electrocatalizadores, así como partículas conductoras y formadores de poros. Este tipo de electrodo se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/147475.

El área del electrodo de trabajo es el área sensible del sensor. Esta área sensible está provista de una barrera de difusión que controla la difusión del analito desde el exterior, por ejemplo, el líquido y/o tejido corporal que rodea el sistema de electrodos, hasta las moléculas de enzima. La barrera de difusión puede, por ejemplo, ser una capa de cobertura que cubra la capa enzimática, es decir, una capa sin enzima. Sin embargo, también es factible que las partículas que controlan la difusión estén incorporadas en la capa enzimática para servir como una barrera de difusión. Por ejemplo, los poros de la capa enzimática se pueden rellenar con el polímero que controla la difusión de las moléculas de analito. El espesor de la barrera de difusión es habitualmente de aproximadamente 2-20 µm, por ejemplo de aproximadamente 2-15 µm o de aproximadamente 5-20 µm, particularmente de aproximadamente 5-10 µm o de aproximadamente 10-15 µm (en estado seco).

La barrera de difusión del sistema de electrodos de la presente invención comprende un copolímero de bloque, preferentemente un único copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo. El copolímero de bloque puede comprender una secuencia alterna de bloques, es decir, un bloque hidrófilo está unido a un bloque hidrófobo. Los bloques hidrófilos e hidrófobos están unidos covalentemente entre sí dentro de una molécula polimérica. El peso molecular promedio del polímero (en peso) es habitualmente de 20-70 kD, particularmente de 25-60 kD y más particularmente de 30-50 kD. La relación molar de las porciones hidrófilas a hidrófobas en el copolímero de bloque está habitualmente en el intervalo de aproximadamente 75 % (hidrófila): 25 % (hidrófoba) a aproximadamente 25 % (hidrófila): 75 % (hidrófoba), en el intervalo de aproximadamente 65 % (hidrófila): 35 % (hidrófoba) a aproximadamente 35 % (hidrófila): 65 % (hidrófoba) o en el intervalo de aproximadamente 60 % (hidrófila): 40 % (hidrófoba) a aproximadamente 40 % (hidrófila): 60 % (hidrófobo). Un bloque hidrófilo del copolímero de bloque consiste en al menos el 90 %, al menos el 95 % y, particularmente, completamente de unidades monoméricas hidrófilas. Habitualmente tiene una longitud de 50-400, por ejemplo de 50-200 o de 150-300,

particularmente de 100-150 o de 200-250 moléculas monoméricas. Un bloque hidrófobo del copolímero consiste en al menos el 90 %, más particularmente al menos el 95 % e incluso más particularmente completamente de unidades monoméricas hidrófobas. Tiene Habitualmente una longitud de 50-300, por ejemplo de 50-200 o de 150-250, particularmente de 80-150, o de 170-200 unidades monoméricas.

Los bloques hidrófilos y/o los bloques hidrófobos consisten preferentemente en unidades basadas en (met)acrílico. Más preferentemente, tanto los bloques hidrófilos como los bloques hidrófobos consisten en unidades monoméricas basadas en (met)acrílico.

Las unidades monoméricas hidrófilas del bloque hidrófilo se seleccionan preferentemente de ésteres de (met)acrilo hidrófilos, es decir, ésteres con un grupo polar, es decir, OH, OCH_3 o OC_2H_5 dentro de la porción alcohol del éster, (metacrilamidas hidrófilas con un grupo amida (NH_2) o un grupo N-alquil- o N,N-dialquilamida, en donde el grupo alquilo comprende 1-3 átomos de C y opcionalmente grupos hidrófilos tales como OH, OCH_3 o OC_2H_5, y de unidades (met)acrílicas adecuadas que tienen un grupo cargado, por ejemplo uno aniónico o catiónico, tal como ácido acrílico (acrilato) o ácido metacrílico (metacrilato). Además, se pueden emplear combinaciones de unidades monoméricas.

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

acrilato de 2-hidroxietilo,
metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA),
acrilato de 2-metoxietilo,
metacrilato de 2-metoxietilo,
acrilato de 2-etoxietilo,
metacrilato de 2-etoxietilo,
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 N-alquil- o N,N-dialquilacrilamida, y
una N-alquil- o N,N-dialquilmetacrilamida, en donde el alquilo comprende 1-3 átomos de C, tal como metilo, etilo o propilo, ácido acrílico (acrilato),
ácido metacrílico (metacrilato)
y combinaciones de los mismos.

Los monómeros hidrófilos preferentes son metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y/o metacrilato de 2- o 3-hidroxipropilo (2- o 3-HPMA). Más preferentemente, el bloque hidrófilo consiste en al menos dos unidades monoméricas hidrófilas distintas. Por ejemplo, puede ser un copolímero aleatorio de al menos dos unidades monoméricas hidrófilas distintas, tal como HEMA y 2-HPMA.

Para introducir grupos iónicos en el monómero, se pueden incorporar en el bloque hidrófilo unidades monoméricas cargadas, tales como ácido acrílico (acrilato) y/o ácido metacrílico (metacrilato). Por lo tanto, en una realización particular de la presente invención, el bloque hidrófilo puede fabricarse con al menos una unidad monomérica hidrófila no iónica (por ejemplo, como se describe anteriormente) y al menos una unidad monomérica hidrófila iónica, en donde la unidad monomérica iónica está presente en una cantidad molar de preferentemente el 1-20 % molar. En caso de que el bloque hidrófilo comprenda una unidad monomérica iónica tal como ácido acrílico o ácido metacrílico, es preferente la copolimerización con un monómero hidrófilo seleccionado del grupo de (metacrilamidas, particularmente N,N-dialquil acril- o metacrilamidas.

Las unidades monoméricas hidrófobas del bloque hidrófobo se seleccionan preferentemente de unidades acrílicas y/o metacrílicas hidrófobas, unidades monoméricas basadas en estireno o combinaciones de los mismos. Preferentemente, las unidades monoméricas hidrófobas se seleccionan de ésteres de (met)acrilo hidrófobos, por ejemplo, ésteres que tienen una porción alcohol con 1-3 átomos de C sin grupo hidrófilo. Los ejemplos específicos de unidades monoméricas para el bloque hidrófobo se seleccionan de:

acrilato de metilo,
metacrilato de metilo (MMA),
acrilato de etilo
metacrilato de etilo (EMA),
acrilato de n- o i-propilo,
metacrilato de n- o i-propilo,

acrilato de n-butilo,
metacrilato de n-butilo (BUMA),
acrilato de neopentilo,
metacrilato de neopentilo,
y combinaciones de los mismos.

El bloque hidrófobo comprende preferentemente al menos dos unidades monoméricas hidrófobas distintas, que están presentes, por ejemplo, como un copolímero aleatorio. En una realización preferente, el bloque hidrófobo comprende metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de n-butilo (BUMA). En una realización especialmente preferente, el bloque hidrófobo es un copolímero aleatorio de MMA y BUMA. La relación molar entre MMA y BUMA es preferentemente de aproximadamente 60 % (MMA): 40 % (BUMA) a aproximadamente 40 % (MMA): 60 % (BUMA), por ejemplo aproximadamente 50 % (MMA): 50 % (BUMA). La temperatura de transición vítrea del bloque hidrófobo es preferentemente de 100 ºC o menos, 90 ºC o menos u 80 ºC o menos, por ejemplo, alrededor de 40-80 ºC. En una realización alternativa, el bloque hidrófobo puede consistir en unidades estirénicas, por ejemplo de poliestireno que tenga una temperatura de transición vítrea de aproximadamente 95 ºC.

Los copolímeros de bloque utilizados en la presente invención pueden fabricarse de acuerdo con métodos conocidos. (Böker *et al*., Macromolecules 34 (2001), 7477-7488).

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

Cuando el copolímero de bloque se pone en contacto con agua, muestra una captación de agua de aproximadamente el 15 %-30 % en peso (basado en el peso seco del polímero) a una temperatura de 37 ºC y un pH de 7,4 (tampón de fosfato acuoso $KH2PO_4$ 10 mM, NaH_2PO_4 10 Mm y NaCl 147 mM).

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

La barrera de difusión de la invención tiene un alto coeficiente de difusión efectivo D_{ef} para la glucosa que es preferentemente de ≥ 10^{-10} cm^2/s, más preferentemente de ≥ 5-10^{-10} cm^2/s e incluso más preferentemente de ≥ 10^{-9} cm^2/s, y por ejemplo de hasta 10^{-7} o 10^{-8} cm^2/s a una temperatura de 37 ºC y un pH de 7,4. El coeficiente de difusión efectivo se determina preferentemente como se describe en el Ejemplo 4, de acuerdo con la ecuación:

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

en donde SE_m es la sensibilidad del electrodo de trabajo, F es el área del electrodo de trabajo y L_m es el espesor de la capa de la barrera de difusión. SE_m y L_m pueden determinarse como se describe en los Ejemplos.

El sistema de electrodos de la presente invención es adecuado para medir la concentración de un analito en condiciones *in vivo*, es decir, cuando se inserta o se implanta en un cuerpo. El analito puede ser cualquier molécula o ion presente en el tejido o líquido corporal, por ejemplo oxígeno, dióxido de carbono, sales (cationes y/o aniones), grasas o componentes lipídicos, hidratos de carbono o componentes de hidratos de carbono, proteínas o componentes de proteínas, u otro tipo de biomoléculas. Es especialmente preferente la determinación de analitos que pueden transferirse de forma eficaz entre un líquido corporal, por ejemplo sangre, y los tejidos, tales como oxígeno, dióxido de carbono, cationes de sodio, aniones cloruro, glucosa, urea, glicerol, lactato y piruvato.

El sistema de electrodos comprende una enzima inmovilizada sobre un electrodo. La enzima es adecuada para la determinación de un analito deseado. Preferentemente, la enzima tiene la capacidad de convertir catalíticamente al analito y, de este modo, de generar una señal eléctrica detectable por el conductor eléctrico del electrodo de trabajo. La enzima para medir el analito es preferentemente una oxidasa, por ejemplo glucosa oxidasa o lactato oxidasa, o una deshidrogenasa, por ejemplo una glucosa deshidrogenasa o una lactato deshidrogenasa. Además de la enzima, la capa enzimática también puede comprender un electrocatalizador o un mediador redox que favorezca la transferencia de electrones a componentes conductores del electrodo de trabajo, por ejemplo, partículas de grafito. Los electrocatalizadores adecuados son óxidos metálicos tales como dióxido de manganeso o compuestos organometálicos tales como ftalocianina de cobalto. En una realización preferente, el mediador redox tiene la capacidad de degradar el peróxido de hidrógeno contrarrestando de este modo la reducción de oxígeno en los alrededores del electrodo de trabajo. En una realización distinta, puede unirse covalentemente un mediador redox a la enzima y, de este modo, efectuar la transferencia electrónica directa al electrodo de trabajo. Los mediadores redox adecuados para la transferencia directa de electrones son los grupos prostéticos, tales como pirroloquinolina quinona (PQQ), flavina adenina dinucleótido (FAD) u otros grupos prostéticos conocidos. Las enzimas inmovilizadas sobre electrodos se describen, por ejemplo, en el documento 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 disponen una capa enzimática y la barrera de difusión. La capa enzimática se diseña preferentemente en forma de múltiples campos que están dispuestos sobre el conductor del electrodo de trabajo a una distancia, por ejemplo, de al menos 0,3 mm o al menos 0,5 mm entre sí. 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 estar recubierto por una capa de aislamiento. Disponiendo los campos de la capa enzimática en la parte superior de las aberturas de una capa eléctricamente aislante, se puede mejorar la relación señal/ruido. Dicha disposición se divulga en el documento WO 2010/028708.

El sistema de electrodos de la invención puede comprender adicionalmente un electrodo de referencia que tenga la capacidad de suministrar un potencial de referencia para el electrodo de trabajo, por ejemplo, un electrodo de referencia Ag/AgCI. Además, un sistema de electrodos de acuerdo con la invención puede tener contraelectrodos y/o electrodos de trabajo adicionales.
El sistema de electrodos puede ser parte de un sensor, por ejemplo, al estar conectado a un potenciostato y un amplificador para la amplificación de señales de medición del sistema de electrodos. El sensor es preferentemente un sensor enzimático no fluido (ENF), más preferentemente un sensor electroquímico ENF. Los electrodos del sistema de electrodos pueden estar dispuestos sobre un sustrato que porta el potenciostato o estar unidos a una placa de circuito que porta el potenciostato.

Una materia objeto adicional de la invención se refiere al uso de un copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo como barrera de difusión para un electrodo enzimático. El copolímero de bloque es preferentemente como se describe anteriormente, por ejemplo, un único copolímero en bloque. La barrera de difusión y el electrodo enzimático también son preferentemente como se describe anteriormente.

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

La Fig. 1 muestra una realización ejemplar de un sistema de electrodos de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 muestra una vista en detalle de la Fig. 1.

La Fig. 3 muestra otra vista en detalle de la Fig. 1.

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

La Fig. 5 muestra la sensibilidad (con desviación típica) de cuatro sensores de glucosa (a glucosa 10 mM) provistos de distintos polímeros de bloque (C, F, D, B) como capas de barrera.

La Fig. 6 muestra la deriva del sensor de cuatro sensores de glucosa provistos de distintos copolímeros de bloque (A, C, D, F) como capas de barrera.

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

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

La Fig. 9 muestra la conductividad del copolímero de bloque H dependiente del tiempo para un espesor de capa de 2,77 µm o 4,43 µm, respectivamente.

La Fig. 10 muestra la adhesión del fibrinógeno a distintos polímeros de membrana espaciadora *in vitro* (Adapt® y Eudragit E100) con respecto a una placa sin recubrimiento (blanco).

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

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

La Fig. 13 muestra la secreción de la citocina IL-8 por parte de células THP-1 después de la incubación con placas de cultivo de tejidos recubiertas con una membrana espaciadora (Adapt®, Lipidure CM5206 y Eudragit E100) o sin recubrimiento (poliestireno) y una capa adicional de fibrinógeno.

La Fig. 14 muestra la hemólisis después de la incubación con sensores recubiertos con una membrana espaciadora (Adapt® y Lipidure CM5206) o sin recubrimiento, en comparación con el polímero espaciador Adapt® sin sensor (control negativo = solo medio de incubación; control positivo = 100 % de lisis osmótica).

La Figura 1 muestra una realización ejemplar de un sistema de electrodos para la inserción en el tejido corporal de un ser humano o un animal, por ejemplo, en la piel o en el tejido adiposo subcutáneo. En la Figura 2 se muestra un aumento de la vista en detalle A, en la Figura 3 se muestra un aumento de la vista en 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 tiene un electrodo de trabajo 1, un contraelectrodo 2 y un electrodo de referencia 3. Los conductores eléctricos de los electrodos 1a, 2a, 3a están dispuestos en forma de trazados de conductores metálicos, preferentemente hechos de paladio u oro, sobre un sustrato 4. En la realización ejemplar mostrada, el sustrato 4 es una placa de plástico flexible, por ejemplo hecha de poliéster. El sustrato 4 tiene menos de 0,5 mm de espesor, por ejemplo de 100 a 300 micrómetros y, por lo tanto, es fácil de curvar de forma que pueda adaptarse a los movimientos del tejido corporal circundante después de su inserción. El sustrato 4 tiene un eje estrecho para la inserción en el tejido corporal de un paciente y una cabeza ancha para la conexión a un sistema electrónico que está dispuesto fuera del cuerpo. El eje del sustrato 4 tiene preferentemente al menos 1 cm de longitud, en particular, de 2 cm a 5 cm.

En la realización ejemplar mostrada, una parte del equipo de medición, en concreto, la cabeza del sustrato, sobresale del cuerpo de un paciente durante el uso. Como alternativa, también es factible, no obstante, implantar todo el equipo de medición y transmitir datos de medición de forma inalámbrica a un receptor que está dispuesto fuera del cuerpo.

El electrodo de trabajo 1 porta una capa enzimática 5 que contiene moléculas de enzima inmovilizadas para la conversión catalítica del analito. La capa enzimática 5 puede aplicarse, por ejemplo, en forma de una pasta de endurecimiento de partículas de carbono, un agente polimérico aglutinante, un mediador redox o un electrocatalizador, y moléculas de enzima. Los detalles de la producción de una capa enzimática 5 de este tipo se divulgan, por ejemplo, en el documento WO 2007/147475, al que se hace referencia a este contexto.

En la realización ejemplar mostrada, la capa enzimática 5 no se aplica de forma continua sobre el conductor 1a del electrodo de trabajo 1, sino más bien en forma de campos individuales que están dispuestos con una distancia entre sí. Los campos individuales de la capa enzimática 5 en la realización ejemplar mostrada están dispuestos en una serie.

El conductor 1a del electrodo de trabajo 1 tiene sitios estrechos entre los campos de capa enzimática que se observan particularmente bien en la Figura 2. El conductor 2a del contraelectrodo 2 tiene un contorno que sigue el curso del conductor 1a del electrodo de trabajo 1. Estos medios dan como resultado una disposición intercalada o interdigitada del electrodo de trabajo 1 y el contraelectrodo 2 con trazados de corriente ventajosamente cortos y baja densidad de corriente.

Para aumentar su superficie eficaz, el contraelectrodo 2 puede estar provisto de una capa porosa eléctricamente conductora 6 que está situada en forma de campos individuales sobre el conductor 2a del contraelectrodo 2. Al igual que la capa enzimática 5 del electrodo de trabajo 1, esta capa 6 se puede aplicar en forma de una pasta de endurecimiento de partículas de carbono y un agente aglutinante polimérico. Los campos de la capa 6 tienen preferentemente las mismas dimensiones que los campos de la capa enzimática 5, aunque esto no es obligatorio. Sin embargo, las medidas para aumentar la superficie del contraelectrodo pueden omitirse y el contraelectrodo 2 también puede diseñarse para ser un trazado de conductor lineal sin recubrimientos de ningún tipo, o con un recubrimiento fabricado del copolímero de bloque descrito y opcionalmente un espaciador.

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

La figura 4 muestra una vista en sección esquemática 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 enzimática 5, el conductor 1a del electrodo de trabajo 1 puede estar recubierto por una capa de aislamiento 7, como el conductor 2a del contraelectrodo 2 entre los campos de capas conductoras 6, para evitar reacciones de interferencia que de otra forma podrían ser catalizadas por el metal de los trazados de conductor 1a, 2a. Por lo tanto, los campos de la capa enzimática 5 están situados en las aberturas de la capa de aislamiento 7. Asimismo, los campos de la capa conductora 6 del contraelectrodo 2 también se pueden colocar en la parte superior de las aberturas de la capa de aislamiento 7.

La capa enzimática 5 está recubierta por una capa de cobertura 8 que presenta una resistencia a la difusión del analito a medir y, por lo tanto, actúa como una barrera de difusión. La barrera de difusión 8 consiste en un único copolímero con bloques alternos hidrófilos e hidrófobos como se describe anteriormente.

Un espesor favorable de la capa de cubertura 8 es, por ejemplo, de 3 a 30 µm, particularmente de aproximadamente 5-10 µm o de aproximadamente 10-15 µm. Debido a su resistencia a la difusión, la capa de cobertura 8 provoca que menos moléculas de analito alcancen la capa enzimática 5 por unidad de tiempo. Por consiguiente, la capa de cobertura 8 reduce la velocidad a la que se convierten las moléculas de analito y, por lo tanto, contrarresta la reducción de la concentración de analito en los alrededores del electrodo de trabajo.

La capa de cobertura 8 se extiende de manera continua esencialmente sobre toda el área del conductor 1a del electrodo de trabajo 1. Sobre la capa de cobertura 8, puede estar dispuesta una membrana biocompatible como un espaciador 9 que establece una distancia mínima entre la capa enzimática 5 y las células del tejido corporal circundante. Este medio genera, ventajosamente, un depósito para moléculas de analito desde el que las moléculas de analito pueden llegar al campo de capa enzimática 5 correspondiente en el caso de una alteración transitoria del intercambio de líquido en los alrededores de un campo de capa enzimática 5. Si el intercambio de líquido corporal en los alrededores del sistema de electrodos se limita o incluso se impide transitoriamente, las moléculas de analito almacenadas en el espaciador 9 continúan difundiendo a la capa enzimática 5 del electrodo de trabajo 1, donde se convierten. Por lo tanto, el espaciador 9 provoca una notable reducción de la concentración de analito y la falsificación correspondiente de los resultados de medición se produce después de un periodo de tiempo significativamente más largo. En la realización ejemplar mostrada, la membrana que forma el espaciador 9 también cubre el contraelectrodo 2 y el electrodo de referencia 3.

La membrana espaciadora 9 puede, por ejemplo, ser una membrana de diálisis. En este contexto, se entiende que una membrana de diálisis es una membrana que es impermeable para moléculas más grandes que un tamaño máximo. La membrana de diálisis se puede prefabricar en un proceso de fabricación separado y después se puede aplicar durante la fabricación del sistema de electrodos. El tamaño máximo de las moléculas para las cuales la membrana de diálisis es permeable se selecciona de forma que las moléculas de analito puedan pasar, mientras que las moléculas más grandes se retienen.

Como alternativa, en lugar de una membrana de diálisis, se puede aplicar sobre el sistema de electrodos como membrana espaciadora 9 un recubrimiento hecho de un polímero que es altamente permeable para el analito y el agua, por ejemplo teniendo como base poliuretano o acrilato.

Preferentemente, el espaciador se fabrica de un copolímero de (met)acrilatos. Preferentemente, la membrana espaciadora es un copolímero de al menos 2 o 3 (met)acrilatos. Más preferentemente, la membrana espaciadora comprende más del 50 % molar, al menos el 60 % molar o al menos el 70 % molar de unidades de monoméricas hidrófilas, por ejemplo de HEMA y/o 2-HPMA, y hasta el 40 % molar o hasta el 30 % molar de unidades hidrófobas, por ejemplo BUMA y/o MMA. El espaciador puede ser un copolímero aleatorio o de bloque. Una membrana espaciadora especialmente preferente comprende MMA o BUMA como fracciones hidrófobas y 2-HEMA y/o 2-HPMA como fracciones hidrófilas. Preferentemente, la cantidad de monómeros hidrófilos HEMA y/o HPMA está entre el 80 % molar y el 85 % molar, y la cantidad de componente hidrófobo MMA y/o BUMA está entre el 15 % molar y el 20 % molar.

La membrana espaciadora muy preferente de la invención está hecha del copolímero Adapt® (BioInteractions Ltd, Reading, Inglaterra). Adapt® comprende BUMA como fracción hidrófoba y 2-HEMA y 2-HPMA como fracciones hidrófilas, en donde la cantidad de monómeros hidrófilos 2-HEMA es de aproximadamente el 80 % molar.

La membrana espaciadora es altamente permeable para el analito, es decir, reduce significativamente la sensibilidad por área del electrodo de trabajo, por ejemplo, el 20 % o menos, o el 5 % o menos con un espesor de capa de menos de aproximadamente 20 µm, preferentemente menos de 5 µm. Un espesor especialmente preferente de la membrana espaciadora es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µm.

La capa enzimática 5 del sistema de electrodos puede contener partículas de óxido metálico, preferentemente partículas de dióxido de manganeso, como mediador catalítico redox. El dióxido de manganeso convierte catalíticamente el peróxido de hidrógeno que se forma, por ejemplo, mediante oxidación enzimática de la glucosa y otros bioanalitos. Durante la degradación del peróxido de hidrógeno, las partículas de dióxido de manganeso transfieren los electrones a los componentes conductores del electrodo de trabajo 1, por ejemplo a partículas de grafito en la capa enzimática 5. La degradación catalítica del peróxido de hidrógeno contrarresta cualquier disminución de la concentración de oxígeno en la capa enzimática 5. Ventajosamente, esto permite que la conversión del analito a detectar en la capa enzimática 5 no esté limitada por la concentración de oxígeno local. El uso del mediador redox catalítico, por lo tanto, contrarresta una falsificación del resultado de medición porque la concentración de oxígeno es baja. Otra ventaja de un mediador redox catalítico es que impide la generación de concentraciones dañinas para las células de peróxido de hidrógeno.

El polímero de membrana espaciadora preferente descrito en el presente documento se puede usar como un recubrimiento externo para una barrera de difusión de la presente invención, pero también como recubrimiento externo de un sistema de electrodos en general, particularmente de un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en 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 hasta las moléculas de enzima. Por lo tanto, la membrana espaciadora se puede disponer sobre la barrera de difusión, sin embargo, la membrana espaciadora también se puede disponer directamente sobre la capa enzimática. En este último contexto, la membrana espaciadora también puede actuar como una barrera de difusión en sí misma y ralentizar la difusión de las moléculas de analito hacia la capa enzimática.

Cuando el sistema de electrodos de la invención se inserta o implanta en un cuerpo, la membrana espaciadora es la interfaz entre el sensor implantado y el líquido o tejido corporal circundante. En consecuencia, cuando se expone al líquido o tejido corporal, la membrana espaciadora de la invención debe ser mecánicamente resistente de forma que no se deforme ni se salga del sensor. Con este fin, la captación de agua del copolímero de membrana espaciadora y la consiguiente hinchazón del copolímero deben limitarse, a pesar de la hidrofilicidad inherente del copolímero.

Preferentemente, la captación relativa de agua del copolímero de la membrana espaciadora no debe superar el 50 % en peso, preferentemente el 40 % en peso, más preferentemente el 30 % en peso basado en la tasa total del copolímero. Dentro del contexto de la presente invención, la medición de la captación relativa de agua se realiza sometiendo el copolímero seco a un exceso de tampón fosfato (pH 7,4) durante 48 h a una temperatura de 37 ºC. La captación relativa de agua (% de CA) se determina preferentemente de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ de CA} = (m_2-m_1)/m_1 \times 100,$$

en donde m_1 y m_2 representan, respectivamente, la masa del copolímero seco y el copolímero después de la hidratación de acuerdo con las condiciones de medición anteriores.

Los inventores de la presente invención determinaron que la membrana espaciadora preferente hecha del copolímero Adapt® absorbe hasta el 33 ± 1,8 % en peso de tampón fosfato (pH 7,4) con respecto a su propio peso durante 48 h a 37 ºC. En las mismas condiciones, una membrana de polímero Lipidure CM5206 (NOF Corporation, Japón) absorbe hasta el 157 ± 9,7 % en peso de tampón fosfato con respecto a su propio peso. La menor captación de agua del polímero aumenta ventajosamente la estabilidad mecánica de la membrana espaciadora de la presente invención. Por el contrario, Lipidure CM5206 muestra una mayor captación de agua y se hincha a un hidrogel que es más frágil, fácilmente deformable o que se sale, particularmente cuando se aplica sobre un sistema de electrodos de un sensor enzimático *in vivo*.

Adicionalmente, durante la inserción y la implementación del sistema de electrodos, el espaciador está en contacto directo con el tejido y/o el líquido corporal, como el líquido intersticial o la sangre, que contiene biomoléculas, como proteínas, y células. Ventajosamente, la membrana espaciadora debe proteger el sensor insertado e implantado en el entorno del tejido y/o del líquido corporal y, por lo tanto, minimiza la reacción tisular del cuerpo frente al implante. De hecho, las reacciones del cuerpo contra el material implantado se conocen como *"respuesta a cuerpos extraños"* (FBR, forma siglada del inglés: *foreign body response*). Mediante la FBR, el cuerpo intenta destruir el implante o, si no es posible, crear una cápsula para separarlo del tejido circundante (granuloma de cuerpo extraño). La primera etapa de la reacción de FBR es la unión de proteínas (por ejemplo, fibrinógeno, albúmina, inmunoglobulina, complemento) a la superficie del material anterior, es decir, el implante. Esta cubierta proteica presenta sitios de unión a receptores en células inmunitarias. Por ejemplo, el fibrinógeno contiene un motivo estructural que se une al receptor de monocitos MAC-1. Cuando el fibrinógeno se une a la superficie del implante, cambia su conformación y expone el sitio de enlace para MAC-1. En consecuencia, se reúnen en el implante y se activan células inmunitarias, como monocitos, que secretan enzimas y radicales para atacar el implante. Adicionalmente, las células inmunitarias secretan factores solubles, es decir, citocinas, para reunir y activar otras células inmunitarias y, de este modo, amplificar la respuesta inmunitaria. Si el implante no se puede eliminar, las células y las proteínas del tejido conjuntivo forman una cápsula fibrosa. Esta cápsula, sin embargo, es una barrera de difusión para que los analitos alcancen el sensor. En conjunto, los sucesos de la respuesta a cuerpos extraños como se describió anteriormente probablemente interfieran con la función del sistema de electrodos *in vivo* y con su vida útil.

Por lo tanto, una membrana espaciadora mejorada sobre un sistema de electrodos de un sensor enzimático *in vivo* proporciona adicionalmente la reducción de la respuesta del tejido frente al implante e inhibe la formación de una cápsula que separe el sensor del tejido circundante y de los líquidos corporales.

Por lo tanto, es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en 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 por que una membrana espaciadora forma al menos una porción de la capa externa del sistema de electrodos, en donde la membrana espaciadora comprende un copolímero hidrófilo de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en donde el polímero comprende más del 50 % molar de monómeros hidrófilos.

Como se ha descrito anteriormente, la membrana espaciadora de la invención tiene una capacidad de unión a proteínas limitada para proteger el sistema de electrodos del sensor de la adsorción de proteínas que podría desencadenar la respuesta de las células inmunitarias, y que podría limitar o interferir con su desempeño *in vivo.* Los ejemplos 5 y 6 muestran que la membrana espaciadora preferente de la invención proporciona poca unión a fibrinógeno e impide el cambio conformacional del fibrinógeno que conduciría a la exposición del motivo de unión de MAC-1 para monocitos. Ventajosamente, el material de copolímero de la membrana espaciadora no activa de por si a las células inmunitarias. En el Ejemplo 6, se pudo demostrar que el copolímero de la membrana espaciadora de la invención tiene la capacidad de atenuar la activación de células inmunitarias por parte del 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 muestra que el copolímero de la membrana espaciadora de la presente invención tiene la capacidad de impedir la hemólisis y la activación del complemento por parte del sensor implantado. Por lo tanto, ventajosamente, la membrana espaciadora de la invención no solo muestra una alta estabilidad mecánica, sino que también tiene propiedades biocompatibles óptimas, lo que es sorprendente debido a la baja captación de agua cuando se humedece.

Las características de esta realización, particularmente con respecto a la estructura del sistema de electrodos, el analito y las moléculas de enzima, son como se describen en el presente documento. La barrera de difusión es preferentemente como se describe en el presente documento, sin embargo, también puede tener una composición distinta o puede estar ausente. De acuerdo con una realización preferente, la barrera de difusión comprende preferentemente un copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo como se describe en el presente documento.

De acuerdo con una realización preferente adicional, la barrera de difusión comprende poliuretanos hidrófilos. Los poliuretanos hidrófilos utilizados como membrana de difusión pueden producirse por poliadición de un (poli)diisocianato, preferentemente 4-4-metilen-bis(ciclohexilisocianato) con un polialcohol, preferentemente un mezcla de dioles.

Los componentes de la mezcla de dioles son preferentemente polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), y dioles alifáticos, tales como etilenglicol. Preferentemente, el poliuretano hidrófilo comprende el 45-55 % molar, preferentemente el 50 % molar de isotiocianato y el 25-35 % molar, preferentemente el 30 % molar de etilenglicol. El grado de hidrofilización se ajusta entonces por la relación de PEG con respecto al PPG. Preferentemente, el poliuretano comprende el 2-3 % molar, más preferentemente el 2,5 % molar de PEG y el 17-18 % molar, preferentemente el 17,5 % molar de PPG. Para aumentar la hidrofilicidad del poliuretano, puede aumentarse la proporción de PEG, por ejemplo, al 4,5 - 5,5 % molar, preferentemente al 5 % molar de PEG, para obtener un poliuretano extremadamente hidrófilo. Las distintas variantes hidrófilas de los poliuretanos también se pueden mezclar para optimizar las propiedades de la barrera de difusión.

Los monómeros acrílicos y metacrílicos preferentes del copolímero de membrana espaciadora son como se describen en el presente documento.

Las unidades monoméricas hidrófilas se seleccionan preferentemente de ésteres de (met)acrilo hidrófilos, es decir, ésteres con un grupo polar, es decir, OH, OCH_3 o OC_2H_5 dentro de la porción alcohol del éster, (met)acrilamidas hidrófilas con un grupo amida (NH_2) o un grupo N-alquil- o N,N-dialquilamida, en donde el grupo alquilo comprende 1-3 átomos de C y opcionalmente grupos hidrófilos tales como OH, OCH_3 o OC_2H_5, y de unidades (met)acrílicas adecuadas que tienen una carga, por ejemplo un grupo aniónico o catiónico, tal como ácido acrílico (acrilato) o ácido metacrílico (metacrilato). Además, se pueden emplear combinaciones de unidades monoméricas.

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

acrilato de 2-hidroxietilo,
metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA),
acrilato de 2-metoxietilo,
metacrilato de 2-metoxietilo,
acrilato de 2-etoxietilo,
metacrilato de 2-etoxietilo,
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 N-alquil- o N,N-dialquilacrilamida, y
una N-alquil- o N,N-dialquilmetacrilamida, en donde el alquilo comprende 1-3 átomos de C, tal como metilo, etilo o propilo, ácido acrílico (acrilato),
ácido metacrílico (metacrilato)
y combinaciones de los mismos.

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

Las unidades monoméricas hidrófobas se seleccionan preferentemente de unidades acrílicas y/o metacrílicas hidrófobas, o combinaciones de las mismas. Preferentemente, las unidades monoméricas hidrófobas se seleccionan de ésteres de (met)acrilo hidrófobos, por ejemplo, ésteres que tienen una porción alcohol con 1-3 átomos de C sin grupo hidrófilo.

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

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

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

La membrana espaciadora externa cubre preferentemente al menos la porción del electrodo de trabajo que comprende las moléculas de enzima y opcionalmente también otras porciones, por ejemplo, el contraelectrodo. Si hay uno presente, la membrana espaciadora también cubre el electrodo de referencia. La membrana espaciadora cubre preferentemente toda la superficie implantada del sistema de electrodos. La membrana espaciadora cubre preferentemente el electrodo de trabajo, opcionalmente el contraelectrodo y el electrodo de referencia, si están presentes, en forma de una capa continua.

El sistema de electrodos que comprende la membrana espaciadora mejorada de la invención puede ser parte de un sensor, por ejemplo, al estar conectado a un potenciostato y un amplificador para la amplificación de señales de medición del sistema de electrodos. El sensor es preferentemente un sensor enzimático no fluido (ENF), más preferentemente un sensor electroquímico ENF. Los electrodos del sistema de electrodos pueden estar dispuestos sobre un sustrato que porta el potenciostato o estar unidos a una placa de circuito que porta el potenciostato. Preferentemente, el sensor es para la medición de glucosa.

Una materia objeto adicional de la invención se refiere al uso de un copolímero hidrófilo de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en donde el copolímero hidrófilo comprende más del 50 % molar de monómeros hidrófilos como una membrana espaciadora para un electrodo enzimático. El copolímero hidrófilo es preferentemente como se describe anteriormente. Preferentemente, la membrana espaciadora se usa para minimizar la reacción a cuerpos extraños (FRB) contra el electrodo enzimático, cuando se inserta o implanta en el cuerpo.

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

El sensor se construyó sobre la estructura de un conductor de tira de paladio prefabricado sobre un sustrato de poliéster con un espesor de 250 µm. El electrodo de trabajo (ET) y el contraelectrodo (CE) se dispusieron de forma repartida (como se muestra en las Fig 1-2).

Los campos del CE se sobreimprimieron con pasta de carbono, el resto del conductor de tira estaba aislado. Los campos del ET se sobreimprimieron con una mezcla de glucosa oxidasa (enzima) reticulada, una pasta polimérica conductora y un catalizador eléctrico, en este caso óxido de manganeso (IV) (Technipur). Los trazados restantes del conductor de tira se aislaron otra vez. El electrodo de referencia (ER) consiste en pasta de Ag/AgCl. Los electrodos cubren aproximadamente 1 cm del eje del sensor.

Los campos del ET se recubrieron con una capa de difusión de copolímero de bloque que consiste en un bloque de HEMA y un bloque de BUMA. El espesor de la capa es de 7 µm.

Se produjeron cuatro lotes de sensores, cada uno provisto de un copolímero de bloque específico como capa de difusión (véase la lista a continuación). Todos los copolímeros de bloque se obtuvieron de Polymer Source, Montreal y se enumeran a continuación en la

Tabla 1.

Nombre	relación 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

El copolímero de bloque respectivo se disolvió en un disolvente orgánico (concentración del 25 %) y se recubrieron los sensores con el mismo. Después de secar mediante secadores de cinta (2 min, 30 a 50 ºC), los sensores recubiertos se analizaron *in vitro* en soluciones de glucosa de distintas concentraciones. De cada lote de sensores se midieron 10 sensores como muestra aleatoria. Como medida de la sensibilidad *in vitro*, la señal se calculó por la diferencia de las corrientes medidas a una concentración de glucosa de 10 mM y 0 mM, que luego se dividió por 10 mM (ver Ejemplo 4).

Todos los sensores se hicieron funcionar a un voltaje de polarización de 350 mV frente a Ag/AgCl, la temperatura medida se mantuvo constante a 37 ºC. Los sensores utilizados para esta serie de mediciones no comprendían el espaciador descrito en el documento WO 2010/028708, lo que, sin embargo, no hizo ninguna diferencia en vista del nivel de señal analizado. La Fig. 5 muestra la sensibilidad del sensor con las desviaciones típicas para las cuatro capas de difusión distintas.

Respecto a los copolímeros de bloque C, D y F, hay una clara conexión entre la sensibilidad *in vitro* y la relación molar del bloque hidrófobo en comparación con el bloqueo hidrófilo. A una longitud de cadena total aproximadamente idéntica del copolímero, la sensibilidad aumenta a medida que aumenta la cantidad de bloque hidrófilo (HEMA).

Los sensores que tienen una capa de difusión de copolímero de bloques B son una excepción. Aunque el polímero B tiene una relación relativa de cantidad de hidrófobo con respecto a hidrófilo similar al polímero F, la sensibilidad y, por lo tanto, la permeabilidad para la glucosa se reducen. Se puede afirmar empíricamente que, en el caso del polímero B, la longitud total de la cadena - que corresponde al peso molecular (total) de la molécula de copolímero - es tan grande que se reduce la permeabilidad de la capa. Esto también puede observarse en la captación de agua determinada gravimétricamente del copolímero de bloque B en comparación con los polímeros restantes. El polímero B tiene una captación de agua del 10,6 % ± 1,5 % (porcentaje en peso referido al peso seco del polímero). El polímero C se encuentra en el 15,6 % ± 0,0 %, el polímero F en el 16,5±3,1 % y el polímero D en el 27 %±1,7 %.

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

El sensor se fabricó como se describe en el documento WO2010/028708, sin embargo, tiene una capa de difusión de acuerdo con la presente invención. Se asumió que la temperatura de transición vítrea (Tg) es un parámetro sustituto de la flexibilidad mecánica. Además, se asumió que la temperatura de transición vítrea, que puede asignarse al bloque hidrófobo, determina la flexibilidad mecánica en aplicaciones *in vivo*. Cabe señalar que se pueden identificar varias Tg para un copolímero de bloque, correspondientes al número de bloques.

Los sensores se recubrieron con las mismas pastas para electrodos que en el Ejemplo 1. Después, algunos de los sensores se recubrieron con un copolímero seleccionado de MMA-HEMA (producido por Polymer Source, Montreal). Este polímero (llamado E) tiene un peso molecular total de 41 kD, la relación molar de MMA (cantidad hidrófoba) con respecto a HEMA es 60 %:40 %. La temperatura de transición vítrea del bloque hidrófobo es de 111 °C, determinada por CDB, y una velocidad de calentamiento de 10 ºC/min.

Además, a otros sensores se les proporcionó una capa de difusión de un copolímero de bloque de la invención (llamado A). El bloque hidrófobo de dicho copolímero A contiene MMA y BUMA en cantidades molares iguales en una secuencia aleatorizada. De nuevo, la relación molar de la parte hidrófoba con respecto a la parte hidrófila es 60 %:40 %. El peso molecular es de 36 kD. La Tg del bloque hidrófobo disminuye, debido a la secuencia aleatorizada de MMA y BUMA (Tg de aproximadamente 45 ºC), a 73 ºC.

Ambas capas de difusión se generaron a partir de la solución respectiva (25 %) de los copolímeros en éter y se secaron como en el Ejemplo 1. El espesor de la capa de difusión era de 7 µm. Posteriormente, se aplicó una capa espaciadora mediante recubrimiento por inmersión y se secó 24 h a temperatura ambiente. La capa espaciadora se hizo de Lipidure CM 5206, producido por NOF Japón.

Después de la explantación del tejido, los sensores que tienen una capa de difusión de copolímero E muestran grietas esporádicas en la capa de difusión. Esto se considera un efecto de la carga mecánica. En contraste con esto, los sensores que tienen una capa de difusión de copolímero A, no muestran ninguna grieta con una carga idéntica. Esto se debe obviamente a la reducción de la Tg, que aumenta la estabilidad mecánica del copolímero. Ya no es necesaria una mezcla física de dos copolímeros, como se divulga en el documento WO2010/028708.

Ejemplo 3 Comportamiento optimizado de permeación de un sensor de glucosa ENF con electrodo distribuido y capa de difusión de acuerdo con la invención.

Se fabricó un sensor como se describe en el Ejemplo 1, pero con una capa espaciadora adicional sobre el total del eje del sensor. Se produjeron sensores con la respectiva capa de difusión para los copolímeros A, C, D y F de los Ejemplos 1 y 2. Para este fin, se generó una solución de éter al 24 % del copolímero. Cada solución se aplicó sobre un conjunto de sensores (N=10) y después se secó en un secador de banda. De este modo, se obtuvieron capas de difusión que tenían un espesor de 7 µm.

A continuación, se proporcionó a los sensores una capa espaciadora como se describe en el Ejemplo 2.

El sensor se conectó con un sistema de medición sobre la cabeza del sensor, que transfiere los datos medidos a una memoria de datos. Las mediciones *in vitro* se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1, pero durante un período de medición de 7 días. A partir de los datos medidos, se calculó la deriva de la sensibilidad a lo largo del período de medición respectivo para cada sensor. La figura 6 muestra para cada variante de sensor, es decir, los sensores de una variante de la capa de difusión, el valor medio del valor de deriva *in vitro* para el grupo. La fase inicial de la medición - las primeras 6 h, la llamada fase de inicio - se excluyó del cálculo.

Para todos los copolímeros C, D y F que tienen un bloque hidrófobo de BUMA, hay una deriva positiva, es decir, la sensibilidad aumenta con el tiempo. Contrariamente a ello, el copolímero A con el bloque hidrófobo de un copolímero aleatorio de MMA y BUMA, conduce a una deriva muy baja, ligeramente negativa.

Estas diferencias pueden explicarse por la respuesta de permeabilidad prolongada de las capas de difusión respectivas, lo 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 enzimática - excluyendo la influencia de su comportamiento de hinchamiento en los resultados - se recubrieron con las soluciones de polímero anteriores y, después del secado, se midió el espesor de la capa. Posteriormente, se midió la conductividad en solución de tampón que contenía sodio y cloruro.

La figura 7 muestra que la conductividad del copolímero A se mantuvo casi constante después de una corta fase de inicio.

Este no es el caso del copolímero F, incluso en condiciones de medición idénticas, como puede observarse en la Fig. 8. En este caso, se observó una respuesta de permeabilidad duradera y fuerte de la capa de difusión del copolímero F, que fue prácticamente independiente del espesor de la capa. Para el copolímero F - y también los copolímeros C y D (no mostrado) - con un bloque hidrófobo de BUMA, se produce como resultado un aumento de la permeabilidad incluso durante un período de tiempo prolongado. Cuando se mide, esto conduce a un aumento continuo de la sensibilidad si la capa de difusión se aplica sobre el sensor con la capa de enzima distribuida. Esto explica la deriva positiva observada del sensor.

Por el contrario, un sensor que tiene un copolímero de bloque A muestra una desviación insignificante, que se debe a una alteración de permeabilidad muy baja en la medición de conductividad. Sin embargo, directamente después de iniciar la medición (hasta aproximadamente 1 h después), se observa un fuerte aumento de la conductividad en el copolímero A. En este caso, se observa un inicio muy rápido, que termina después de aproximadamente 1 hora. En este momento, la capa de difusión está completamente humedecida y ha terminado su reorganización estructural debido a la captación de agua. La grado del cambio estructural depende supuestamente de la Tg. Parece plausible que un copolímero que tiene una Tg aumentada experimente una reorganización, que sea limitada en tiempo y amplitud, en comparación con un copolímero que tiene una Tg en el intervalo de la temperatura ambiente.

Además, debe indicarse que los sensores con el copolímero A muestran una sensibilidad comparativamente alta al inicio de las mediciones, en comparación con los sensores que tienen una capa de difusión de copolímero F. Esto es de esperar debido a las relaciones relativas idénticas entre los bloques hidrófobos e hidrófilos. El intervalo de sensibilidad logrado de 1 a 1,5 nA/mM (véase el Ejemplo 1) se considera ideal. Asimismo, esta sensibilidad se obtiene para sensores que tienen una capa de difusión que consiste en copolímero A.

Con respecto a la suma de las tres características fisicoquímicas - permeabilidad, estabilidad mecánica y respuesta de permeabilidad - se puede obtener preferentemente un sensor óptimo con una capa de difusión de un copolímero de bloque, que tenga un bloque hidrófobo con al menos dos unidades monoméricas hidrófobas distintas dispuestas aleatoriamente, tal como el copolímero de bloque A. Ninguno de los otros copolímeros de bloque, cuyos bloques hidrófobos consisten solo en una única unidad monomérica, alcanza una calidad que pueda compararse en los tres parámetros con el copolímero A.

Ejemplo 4 Caracterización de los copolímeros de bloque

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

Se le proporcionó al sensor una capa de difusión que consistía en un copolímero de bloque que comprende un bloque hidrófobo de metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de n-butilo (BUMA) copolimerizados aleatoriamente y un bloque hidrófilo de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). Estos polímeros (especificados como G y H) habían sido producidos por Polymer Source, Montreal, y son más permeables que el polímero A de los Ejemplos 1-3.

A continuación se describen los polímeros en la Tabla 2:

Polímero	G	H	A
Peso molecular Mn [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 (estequiométricamente)	53,5	47,4	40
% molar de HEMA (medido por NMR de ^{1}H,^{13}C)	51	46	32,6
Tg [ºC] bloque hidrófobo	65	68	86
Unidades monoméricas de HEMA	223	157	115
Unidades monoméricas de MMA	194	174	174

Los pesos moleculares Mn de cada bloque se indican por separado en la Tabla 2 anterior y representan valores promedio, dado que se sabe que los polímeros tienen distribuciones de longitudes de cadenas moleculares en torno a un valor medio especificado. Esto también se aplica a las cantidades obtenidas en la Tabla 2.

Las temperaturas de transición vítrea indicadas del bloque hidrófobo están dentro del intervalo deseado para 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). La sensibilidad SE se calculó a partir de las mediciones de corriente (I) a 10 mM y a una concentración de glucosa 0 mM en una solución tamponada con fosfato (pH 7,4), en nA/mM:

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

para cada uno de los sensores analizados. A partir de los valores de medición individuales (N=8) se determinó la sensibilidad media SE_m. Los valores de sensibilidad obtenidos se dividieron por el área total geométrica F medida por microscopía de todos los puntos de electrodo de trabajo sobre el sensor de múltiples campos. De este modo, 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 del control de la difusión de la capa de cobertura polimérica sobre el electrodo de trabajo. Se calculó a partir de las mediciones de corriente a una concentración de glucosa 20 mM, 10 mM y 0 mM en %:

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

para cada uno de los sensores analizados. A partir de los valores de medición individuales, se determinó el valor de linealidad medio y su desviación típica (véase la Tabla 3).

Por último, se determinó para cada uno de los polímeros el espesor de capa L de la barrera de difusión de los sensores mediante medición óptica. Los valores medios correspondientes se calcularon para una muestra de ≥ 23 sensores con el mismo polímero. A partir de ellos, se puede calcular el coeficiente de difusión eficaz D_{ef} de la capa de cobertura:

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

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

La deriva del sensor se calculó a partir de repeticiones de las fases de concentración de glucosa durante 7 días de mediciones *in vitro*. Los resultados para el polímero H que muestran una conductividad sustancialmente constante se representan en la Figura 9.

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

Polímero	G	H
SE_m/F [nA/mM*mm^2)]	1,85	1,25
Deriva [%d]	-1,5±0,2	0,3±0,1

Polímero	G	H
$Y^{20\ mM}$ [%]	88,2±0,7	88,6±0,3
espesor de capa L_m [µm]	11,61	12,69
D_{ef} [cm^2/s]	$1,11305*10^{-9}$	$8,22019*10^{-10}$

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

Ejemplo 5 Unión de proteínas al material de la capa espaciadora

Para evaluar la unión de proteínas al material de la capa espaciadora, se llenó una placa de incubación (FluoroNunc Maxisorp, Thermo Scientific) con las soluciones etanólicas de Adapt® (Biointeractions Ltd, Reading, Inglaterra) o Eudragit E100 (Evonik Industries). Eudragit E100 es un copolímero catiónico basado en metacrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo. Los polímeros se secaron durante una noche a 40 ºC. A continuación, los materiales espaciadores se cubrieron con una solución de fibrinógeno. La solución contenía fibrinógeno procedente de plasma humano que se conjugó con el colorante fluorescente Alexa488 (adquirido de Invitrogen). Después de 4 h de incubación, la solución de fibrinógeno se aspiró y las capas espaciadoras se lavaron ocho veces con tampón borato. La cantidad de proteína unida al espaciador se analizó midiendo la intensidad de fluorescencia en la placa de incubación a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una 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 para convertir las lecturas de fluorescencia en cantidad de proteína.

Como cabía esperar, el fibrinógeno se unió a la placa de incubación sin recubrimiento (blanco), lo que dio como resultado 390 ng de proteína unida (Fig. 10). La placa recubierta con Eudragit E100 mostró una unión de proteínas reducida de 60 ng. Apenas pudo detectarse unión de proteínas en la placa recubierta con Adapt®. Las lecturas antes de la incubación resultaron de fluorescencia de fondo. Estos resultados demuestran claramente que las superficies recubiertas con los materiales espaciadores, en especial las recubiertas con Adapt®, están bien protegidas frente a la adhesión de fibrinógeno.

Ejemplo 6 Liberación de citocinas por parte de células después del contacto con la capa espaciadora

Se fabricaron sensores como se describe en el Ejemplo 2. A continuación, se proporcionó a los sensores una capa espaciadora como se describe en el Ejemplo 2. La capa espaciadora se hizo de Lipidure CM 5206 (NOF Corporation, Japón) o se hizo de Adapt® (Biointeractions Ltd, Reading, Inglaterra).

Se incubaron con células monocíticas THP-1 los sensores sin capa espaciadora, los sensores con capa espaciadora hecha de Lipidure CM 5206 o los sensores con capa espaciadora hecha de Adapt®, y se analizó la inducción de marcadores inflamatorios.

Las células THP-1 se cultivaron en presencia de los sensores durante 24 h a 37 ºC. Después, las células se recogieron mediante centrifugación. El sobrenadante se utilizó para determinar la liberación de citocinas, mientras que el sedimento celular se resuspendió en PBS que contenía el 1 % de seroalbúmina bovina (BSA) y se usó 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 colorante fluorescente ficoeritrina (BD Bioscience). Después de la incubación durante 45 min a 4 ºC, las células se lavaron en PBS/BSA al 1 % y se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM) de 10000 células utilizando un citómetro de flujo (longitud de onda de excitación 532 nm, longitud de onda de emisión 585 nm) (BD FACSArray, BD Bioscience). En comparación con las células THP-1 no tratadas, la incubación con sensores sin recubrimiento dio como resultado una expresión relativa de CD54 aumentada (inducción de 6 veces), como lo indican las altas lecturas de IFM (Fig. 11). La incubación de las células con los sensores recubiertos con las capas espaciadoras de CM 5206 o Adapt® dio como resultado una atenuación de la expresión de CD54 en un 45 % o 41 %, respectivamente.

El sobrenadante se utilizó para determinar la cantidad de citocinas interleucina 8 (IL-8) y "proteína quimiotáctica de monocitos-1" (MCP-1) utilizando un inmunoensayo basado en perlas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Flex sets, BD Bioscience) y el posterior análisis por citometría de flujo (BD FACSArray, BD Bioscience). El análisis de los datos se realizó utilizando el programa informático 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 se redujo cuando los sensores se cubrieron con las capas espaciadoras de CM 5206 o Adapt®. Los sensores recubiertos con Adapt® indujeron la liberación de 100 pg/ml de IL-8 y 25 pg/ml de MCP-1. Los sensores recubiertos con CM 5206 dieron como resultado la secreción de 125 pg/ml de IL-8 y 18 pg/ml de MCP-1.

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

Para analizar el papel de la adsorción de proteínas en la activación de las células THP-1, las placas de cultivo de tejidos se recubrieron con CM 5206, Adapt® o Eudragit E100. Después, el espaciador se incubó con fibrinógeno humano (Sigma-Aldrich). Las células THP-1 se incubaron con distintos espaciadores + capas de fibrinógeno. Después de 48 h de incubación a 37 ºC, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se analizó el sobrenadante en cuanto a la liberación de IL-8. Como control, las células se cultivaron en placas de cultivo sin espaciador, pero se recubrieron con fibrinógeno (Poliestireno = material de placa de cultivo). Como se muestra en la Fig. 13, estas células liberaron 89 pg/ml de IL-8. Las células cultivadas en CM 5206 + fibrinógeno o en Adapt® + fibrinógeno liberaron 68 o 49 pg/ml, respectivamente. Por el contrario, las células cultivadas en Eudragit E100 + fibrinógeno liberaron 206 pg/ml de IL-8. De forma destacable, las células cultivadas en Eudragit E100 sin recubrimiento de fibrinógeno secretaron solo 59 pg/ml de IL-8. La adsorción de fibrinógeno en la superficie del polímero y los cambios conformacionales en la proteína podrían exponer el sitio de unión de MAC-1. Las células THP-1 que se activan a través de la unión a su receptor de MAC-1 liberan citocinas, como la IL-8, y de este modo desencadenan una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, las capas espaciadoras hechas de Adapt® o CM 5206 evitan la deposición de proteína y la exposición de motivos estructurales en las superficies (como sensores) y minimizan de este modo las reacciones inflamatorias contra los implantes.

Ejemplo 7 Hemólisis limitada de sensores recubiertos con una capa espaciadora

Se fabricaron sensores como se describe en el Ejemplo 2. A continuación, se proporcionó a los sensores una capa espaciadora como se describe en el Ejemplo 2. La capa espaciadora se hizo de Lipidure CM 5206 (NOF Corporation, Japón) o se hizo de Adapt® (Biointeractions Ltd, Reading, Inglaterra).

Se analizó el potencial hemolítico de los sensores sin capa espaciadora, los sensores con capa espaciadora hecha de Lipidure CM 5206 o los sensores con capa espaciadora hecha de Adapt®. Por lo tanto, los sensores con una superficie total de 6 cm^2 se incubaron con glóbulos rojos y después se determinó la lisis midiendo la liberación de hemoglobina al sobrenadante. Los eritrocitos se aislaron de sangre humana recién extraída mediante centrifugación (se utilizó citrato para evitar la coagulación). Después, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a continuación se diluyeron 1:40 en PBS. La suspensión de eritrocitos se incubó con los sensores durante 24 h a 37 ºC en oscuridad, en una plataforma giratoria (350 rpm). A continuación, las células se sedimentaron mediante centrifugación y el contenido de hemoglobina del sobrenadante se determinó de forma espectroscópica midiendo 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 liberación de hemoglobina en el control positivo (= lisis osmótica completa de eritrocitos en agua destilada). Los resultados se muestran en la Fig. 14.

Los sensores sin una capa espaciadora provocaron hemólisis de forma significativa, como lo indica un índice hemolítico alto del 47,4 %. El recubrimiento de los sensores con una capa espaciadora de Lipidure CM 5206 redujo el potencial hemolítico de los sensores, como lo demuestra un índice lítico del 14,7 %. Los sensores recubiertos con una capa espaciadora de Adapt® provocaron hemólisis de forma marginal, lo que dio como resultado un índice lítico del 7,5 %, que está en el intervalo del control negativo (= eritrocitos en PBS incubados sin ningún material de prueba) o Adapt® solo. Estos resultados indicaron la función protectora de la capa espaciadora para reducir la hemólisis.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes puntos:

Puntos

1. Un sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en 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 al menos una porción de la capa externa del sistema de electrodos y en donde la membrana espaciadora comprende un copolímero hidrófilo de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en donde el copolímero hidrófilo comprende más del 50 % molar de monómeros hidrófilos.

2. El sistema de electrodos del punto 1, en donde la membrana espaciadora es un copolímero hidrófilo de al menos 2 o 3 monómeros acrílicos y/o metacrílicos.

3. El sistema de electrodos del punto 1 o 2, en donde los monómeros hidrófilos se seleccionan de (met)acrilésteres hidrófilos con un grupo polar, por ejemplo OH, OCH_3 o OC_2H_5, (met)acrilamidas hidrófilas, ácido (met)acrílico o combinaciones de los mismos.

4. El sistema de electrodos del punto 3, en donde los monómeros hidrófilos se seleccionan de:

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

acrilato de 2-metoxietilo,
metacrilato de 2-metoxietilo,
acrilato de 2-etoxietilo,
metacrilato de 2-etoxietilo,
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 N-alquil- o N,N-dialquilacrilamida, y
una N-alquil- o N,N-dialquilmetacrilamida,
en donde el alquilo comprende 1-3 átomos de C,
ácido acrílico,
ácido metacrílico
y combinaciones de los mismos,

preferentemente de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), metacrilato de 2-hidroxipropilo (2-HPMA) y combinaciones de los mismos.

5. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-4, en donde el copolímero hidrófilo de la membrana espaciadora comprende al menos el 60 % molar o al menos el 70 % molar de monómeros hidrófilos.

6. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-5, en donde el copolímero de la membrana espaciadora comprende adicionalmente hasta el 40 % molar o hasta el 30 % molar de monómeros hidrófobos.

7. El sistema de electrodos del punto 6, en donde los monómeros hidrófobos se seleccionan de:

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

preferentemente de metacrilato de metilo (MMA), metacrilato de n-butilo (BUMA) y combinaciones de los mismos.

8. El sistema de electrodos del punto 6 o 7, en donde los monómeros hidrófobos son metacrilato de metilo (MMA) o metacrilato de n-butilo (BUMA), y los monómeros hidrófilos son metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y/o metacrilato de 2-hidroxipropilo (2-HPMA).

9. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 6-8, en donde la membrana espaciadora comprende un copolímero de metacrilato de n-butilo (BUMA), metacrilato de 2-hidroxietilo (2-HEMA) y metacrilato de 2-hidroxipropilo (2-HPMA), en donde el copolímero comprende aproximadamente el 80 % molar de monómeros 2-HEMA.

10. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-9, en donde el copolímero hidrófilo es un copolímero aleatorio o un copolímero de bloque.

11. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-10, en donde el espesor de la membrana espaciadora es de menos de aproximadamente 20 µm, preferentemente menos de 5 µm, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µm.

12. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-11, en donde la captación relativa de agua del copolímero hidrófilo no supera el 50 % en peso, preferentemente el 40 % en peso, más preferentemente el 30 % en peso, basándose en el peso total del copolímero.

13. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-12, en donde la barrera de difusión comprende un poliuretano hidrófilo o un copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo.

14. El sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-13, que comprende un contraelectrodo (2) que tiene un conductor eléctrico (2a), un electrodo de trabajo (1) que tiene un conductor eléctrico (1a) sobre el que están dispuestas las moléculas de enzima (5) inmovilizadas y opcionalmente la barrera de difusión (8), y una membrana espaciadora (9) que cubre al menos el electrodo de trabajo (1) y opcionalmente también el contraelectrodo (2).

15. Un sensor que es insertable o implantable en un cuerpo, que comprende un sistema de electrodos de uno cualquiera de los puntos 1-15.

16. El sensor del punto 15 para la medición de glucosa.

17. Uso de un copolímero hidrófilo de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en donde el copolímero hidrófilo comprende más del 50 % molar de monómeros hidrófilos como una membrana espaciadora para un sistema de electrodos enzimático.

18. El uso del punto 17, para minimizar la reacción a cuerpos extraños (FRB) contra el sistema de electrodos enzimático.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de electrodos para medir la concentración de un analito en condiciones *in vivo*, que comprende un electrodo con moléculas de enzima inmovilizadas, una barrera de difusión que controla la difusión del analito desde el exterior del sistema de electrodos hasta las moléculas de enzima, y una membrana espaciadora que forma al menos una porción de la capa externa del sistema de electrodos,
caracterizado por que la barrera de difusión comprende un copolímero de bloque que tiene al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo, y por que la membrana espaciadora comprende un copolímero hidrófilo de monómeros acrílicos y/o metacrílicos, en donde el copolímero hidrófilo comprende más del 50 % molar de monómeros hidrófilos.

2. El sistema de electrodos de la reivindicación 1, en donde la barrera de difusión comprende un copolímero de bloque que tiene un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo.

3. El sistema de electrodos de la reivindicación 1 o 2, en donde la temperatura de transición vítrea del bloque hidrófobo de la barrera de difusión está entre 40 y 100 ºC.

4. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde

(i) un bloque hidrófilo del copolímero de bloque de la barrera de difusión tiene una longitud de 50-200, o de 150-300, particularmente de 100-150, o de 200-250 unidades monoméricas y/o
(ii) un bloque hidrófobo del copolímero de bloque de la barrera de difusión tiene una longitud de 50-200, o de 150-250, particularmente de 80-150, o de 170-200 unidades monoméricas.

5. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde un bloque hidrófilo de la barrera de difusión está fabricado de unidades monoméricas hidrófilas seleccionadas de (met)acrilésteres hidrófilos con un grupo polar, por ejemplo OH, OCH_3 u OC_2H_2, (met)acrilamidas hidrófilas, ácido (met)acrílico o combinaciones de los mismos.

6. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el bloque hidrófilo de la barrera de difusión se fabrica de unidades monoméricas hidrófilas seleccionadas de:

acrilato de 2-hidroxietilo,
metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA),
acrilato de 2-metoxietilo,
metacrilato de 2-metoxietilo,
acrilato de 2-etoxietilo,
metacrilato de 2-etoxietilo,
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 N-alquil- o N,N-dialquilacrilamida, y
una N-alquil- o N,N-dialquilmetacrilamida,
en donde el alquilo comprende 1-3 átomos de C,
ácido acrílico,
ácido metacrílico
y combinaciones de los mismos.

7. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el bloque hidrófilo de la barrera de difusión comprende al menos dos unidades monoméricas hidrófilas distintas, particularmente al menos una unidad monomérica hidrófila no iónica y al menos una unidad monomérica hidrófila iónica, en donde la unidad monomérica iónica está presente en una cantidad molar preferentemente del 1-20 % molar.

8. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde un bloque hidrófobo de la barrera de difusión se fabrica de unidades monoméricas seleccionadas de (met)acrilésteres hidrófobos, monómeros basados en estireno o combinaciones de los mismos.

9. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde un bloque hidrófobo de la barrera de difusión se fabrica de unidades monoméricas seleccionadas de:

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

10. El sistema de electrodos de las reivindicaciones 1-9, en donde el bloque hidrófobo de la barrera de difusión comprende al menos dos unidades monoméricas hidrófobas distintas y, preferentemente, una temperatura de transición vítrea de aproximadamente 40-80 ºC.

11. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la relación molar de bloque hidrófilo: bloque hidrófobo de la barrera de difusión está en el intervalo de 75 % (hidrófilo): 25 % (hidrófobo) a 25 % (hidrófilo): 75 % (hidrófobo), particularmente en el intervalo de 65 % (hidrófilo): 35 % (hidrófobo) a 35 % (hidrófilo): 65 % (hidrófobo), y más particularmente en el intervalo de 60 % (hidrófilo): 40 % (hidrófobo) a 40 % (hidrófilo): 60 % (hidrófobo).

12. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende
un contraelectrodo (2) que tiene un conductor eléctrico (2a),
un electrodo de trabajo (1) que tiene un conductor eléctrico (1a) sobre el que están dispuestas las moléculas de enzima (5) inmovilizadas y la barrera de difusión (8), y una membrana espaciadora (9), que cubre al menos el electrodo de trabajo (1) y opcionalmente también el contraelectrodo (2), y en donde las moléculas de enzima (5) inmovilizadas están presentes preferentemente en forma de múltiples campos que están dispuestos sobre el conductor (1a) del electrodo de trabajo (1) con una distancia entre sí.

13. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la barrera de difusión (8) forma una capa que cubre la capa enzimática (5) con un espesor de preferentemente 2-20 µm, más preferentemente de 5-20 µm, e incluso más preferentemente de 10-15 µm.

14. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el espesor de la membrana espaciadora es de menos de aproximadamente 20 µm, preferentemente menos de 5 µm, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µm.

15. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la barrera de difusión comprende solo un copolímero de bloque.

16. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la barrera de difusión comprende adicionalmente un plastificante.

17. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la barrera de difusión tiene un coeficiente de difusión efectivo D_{ef} para la glucosa de $\geq 10^{-10}$ cm^2/s, más preferentemente de $\geq 5\text{-}10^{-10}$ cm^2/s, e incluso más preferentemente de $\geq 10^{-9}$ cm^2/s.

18. El sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la captación relativa de agua del copolímero hidrófilo de la membrana espaciadora no supera el 50 % en peso, preferentemente el 40 % en peso, más preferentemente el 30 % en peso, basándose en el peso total del copolímero.

19. Un sensor que es insertable o implantable en un cuerpo, que comprende un sistema de electrodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el sensor es preferentemente para la medición de glucosa.

Figuras 1-3

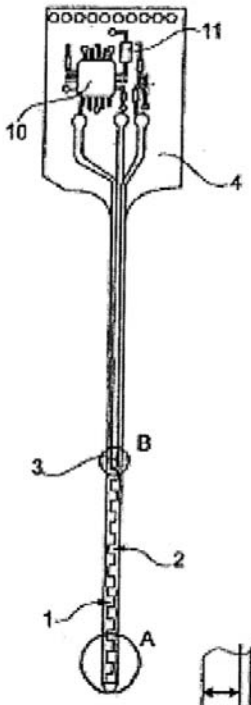


Fig. 1

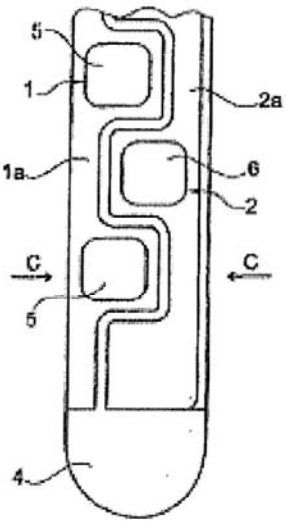


Fig. 2

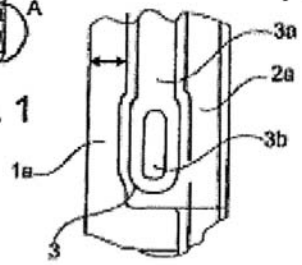


Fig. 3

Figura 4

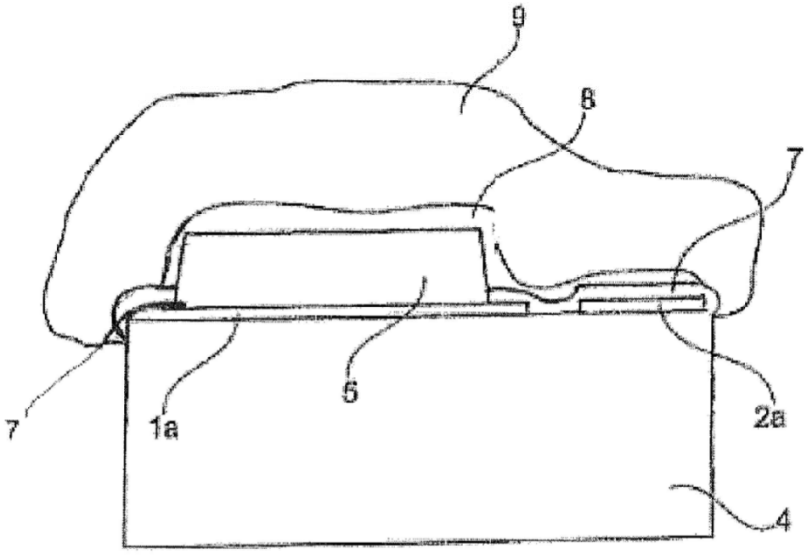


Figura 5

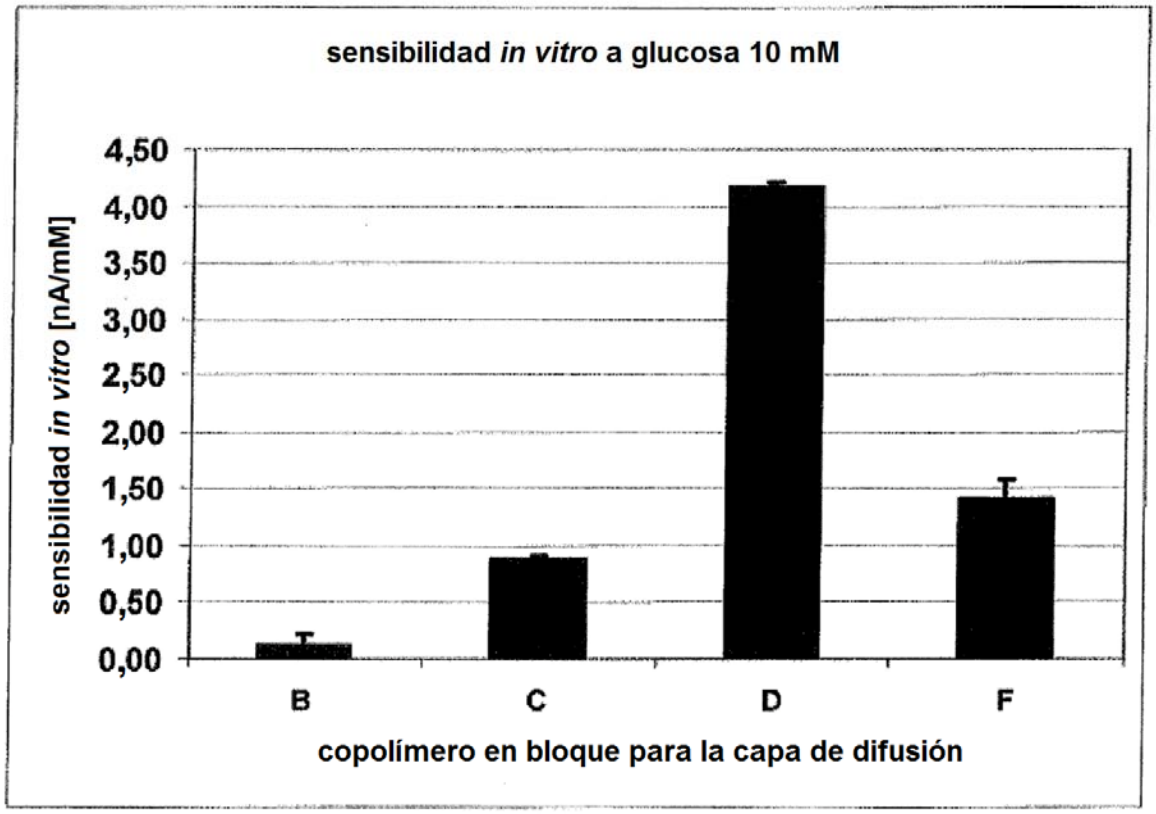

sensibilidad *in vitro* a glucosa 10 mM
sensibilidad *in vitro* [nA/mM]
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
B
C
D
F
copolímero en bloque para la capa de difusión

Figura 6

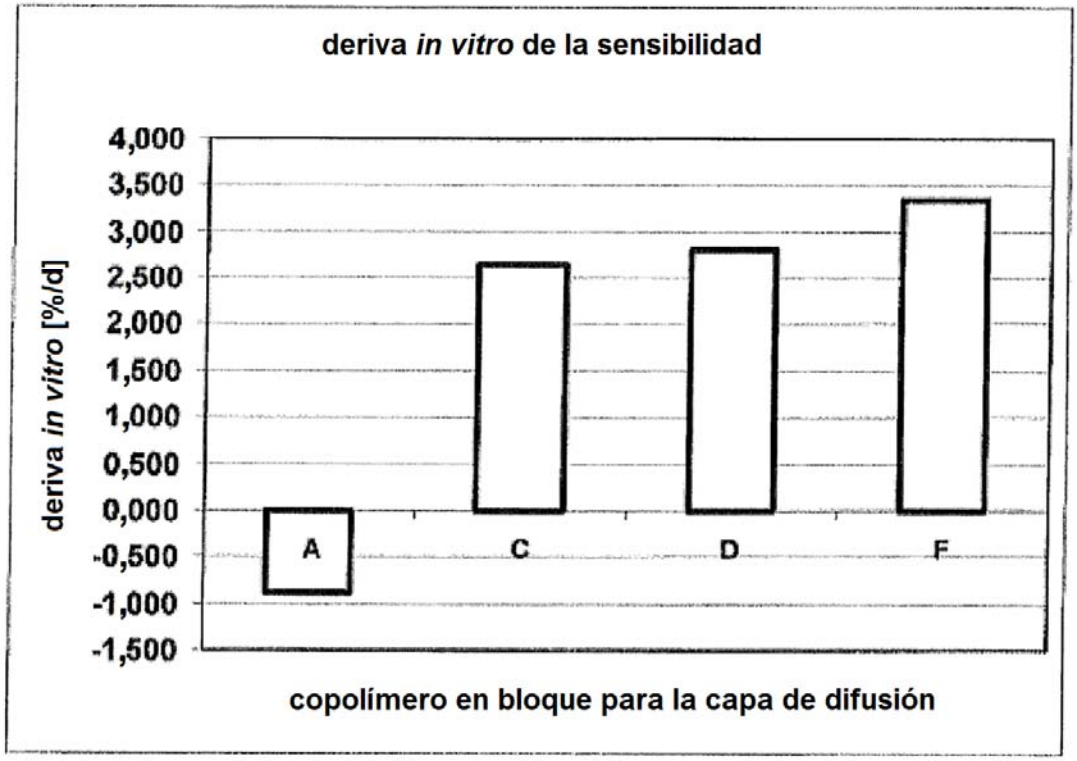

deriva *in vitro* de la sensibilidad
deriva *in vitro* [%/d]
4,000
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
-0,500
-1,000
-1,500
A
C
D
F
copolímero en bloque para la capa de difusión

Figura 7

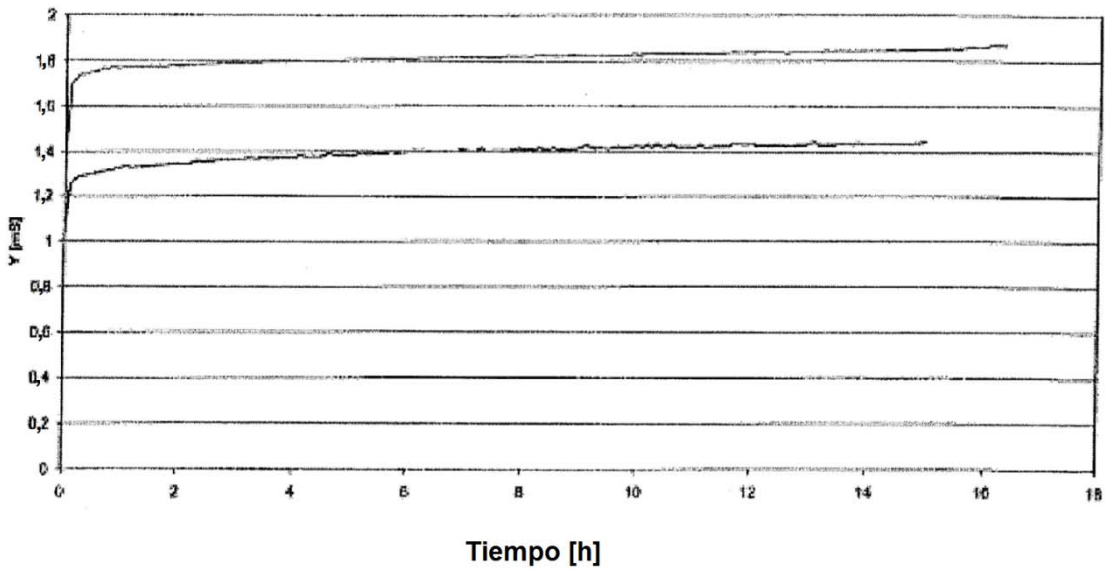


Figura 8

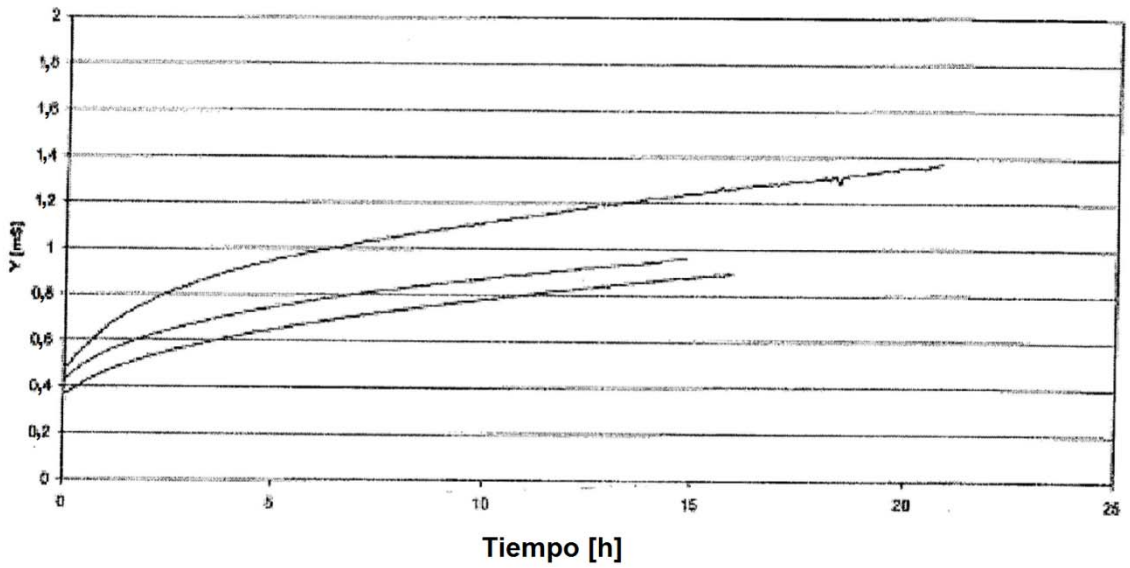


Figura 9

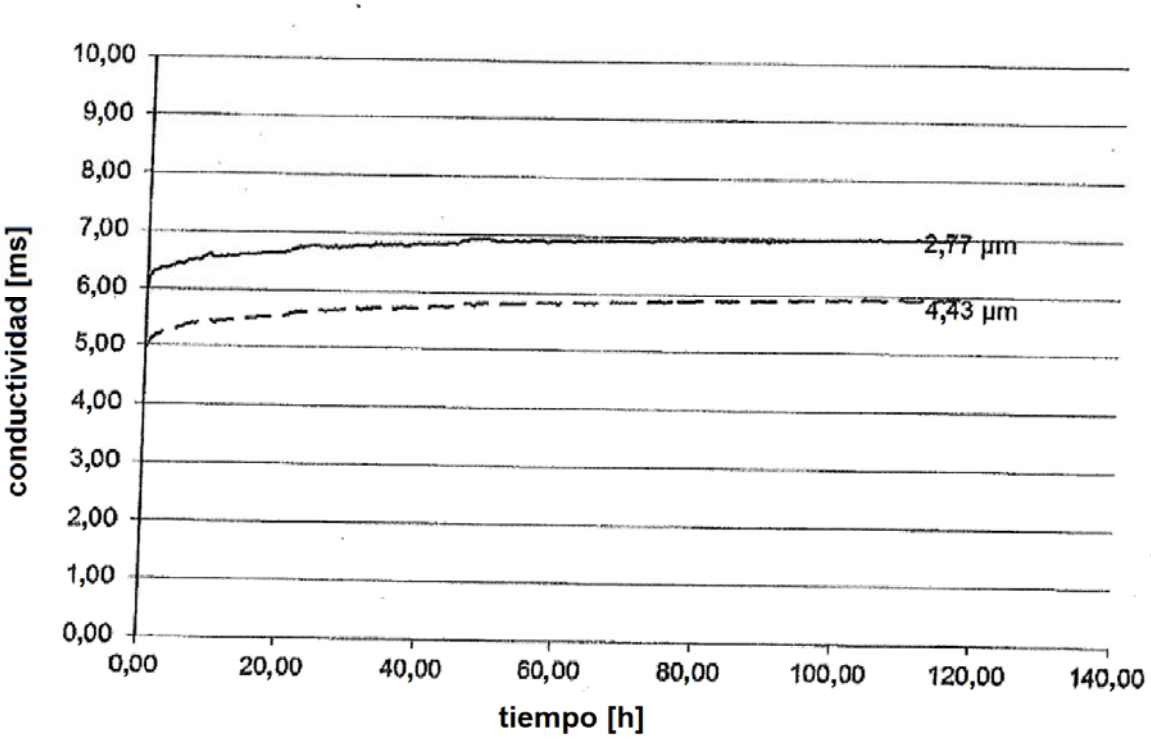

10,00
9,00
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
conductividad [ms]
0,00
20,00
40,00
60,00
80,00
100,00
120,00
140,00
tiempo [h]
2,77 µm
4,43 µm

Figura 10

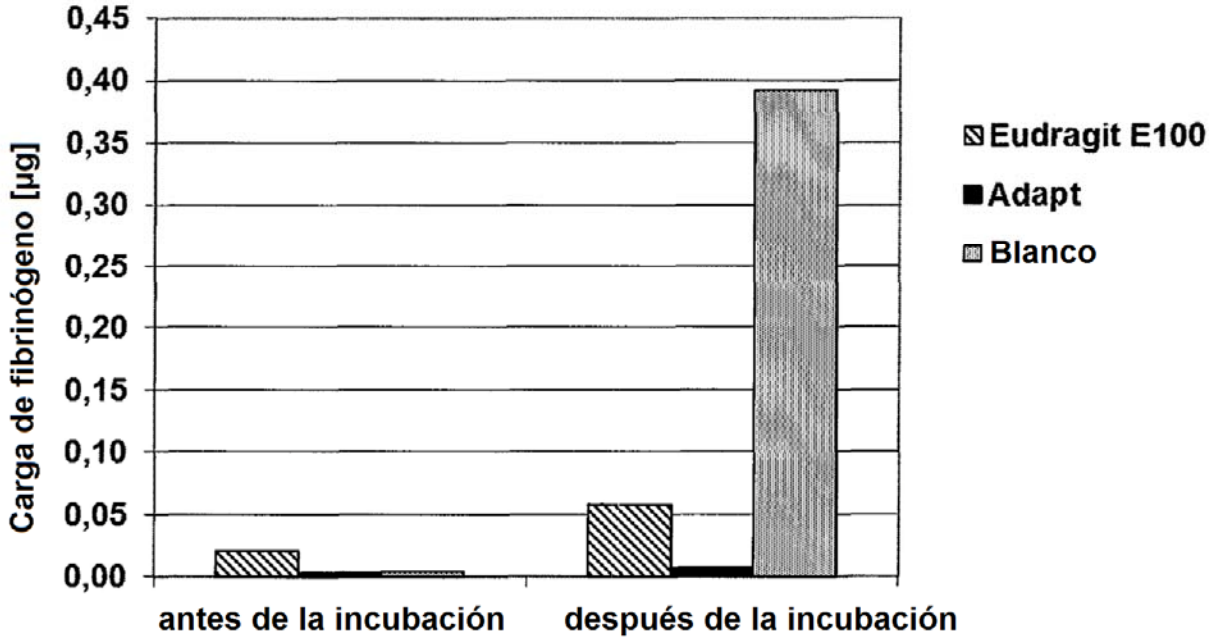

0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Carga de fibrinógeno [µg]
antes de la incubación
después de la incubación
Eudragit E100
Adapt
Blanco

Figura 11

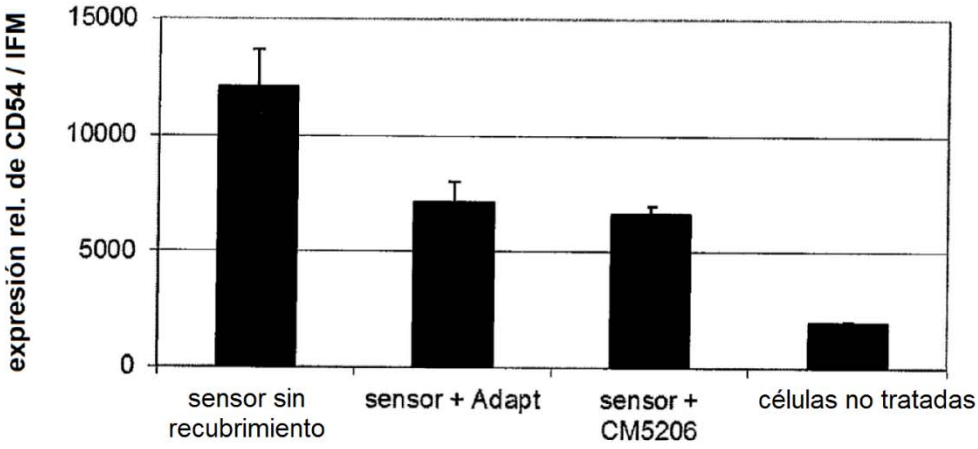

expresión rel. de CD54 / IFM
15000
10000
5000
0
sensor sin recubrimiento
sensor + Adapt
sensor + CM5206
células no tratadas

Figura 12a

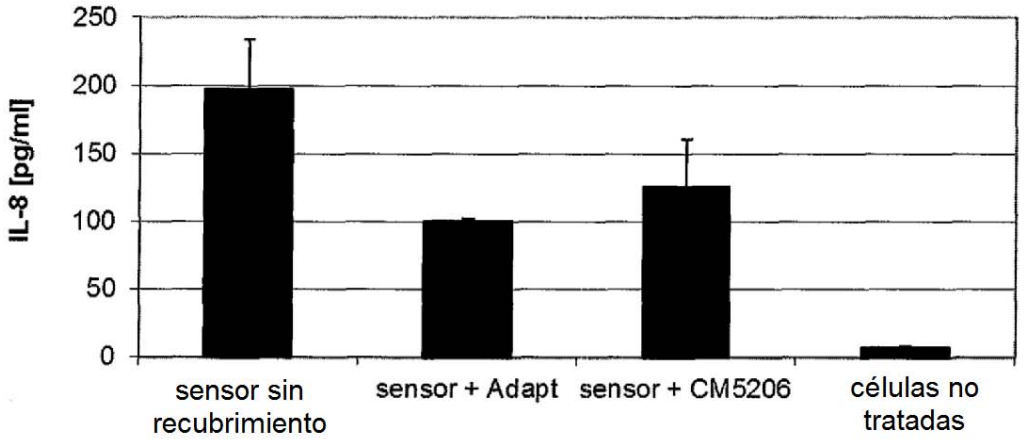


Figura 12b

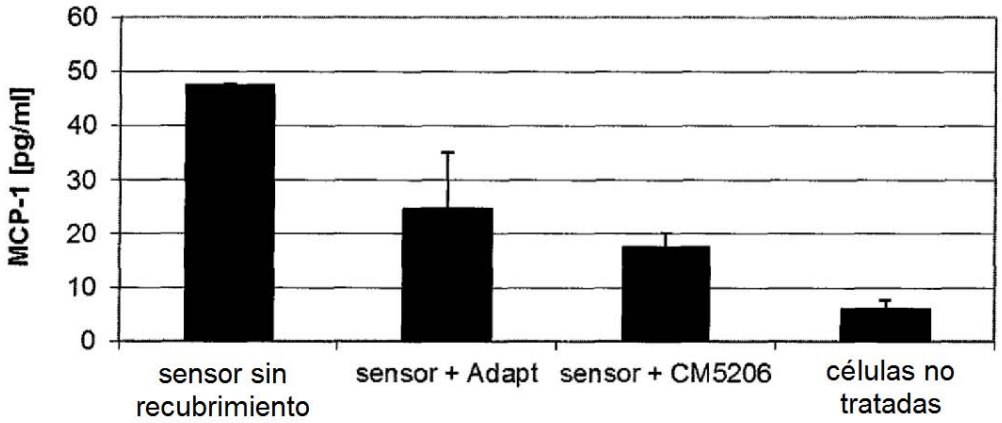


Figura 13

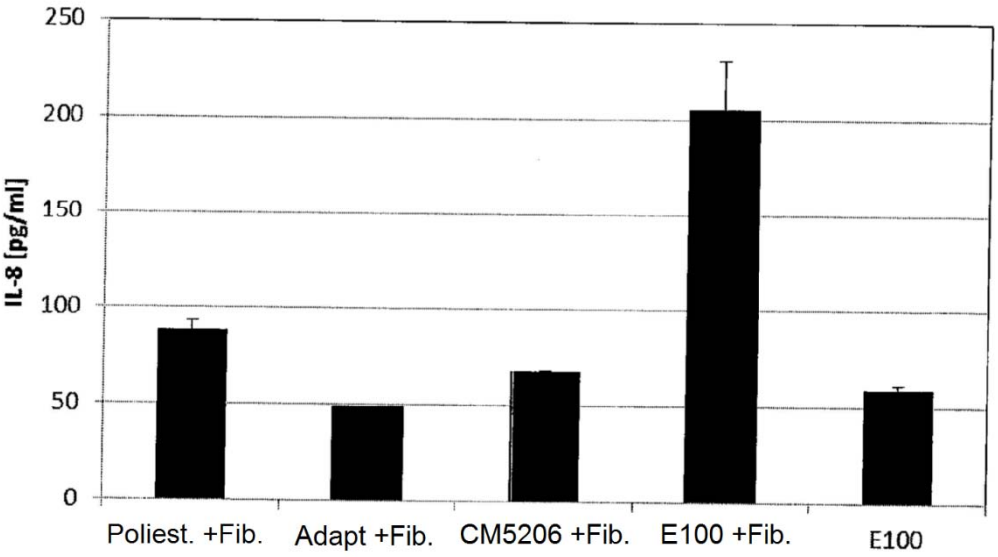
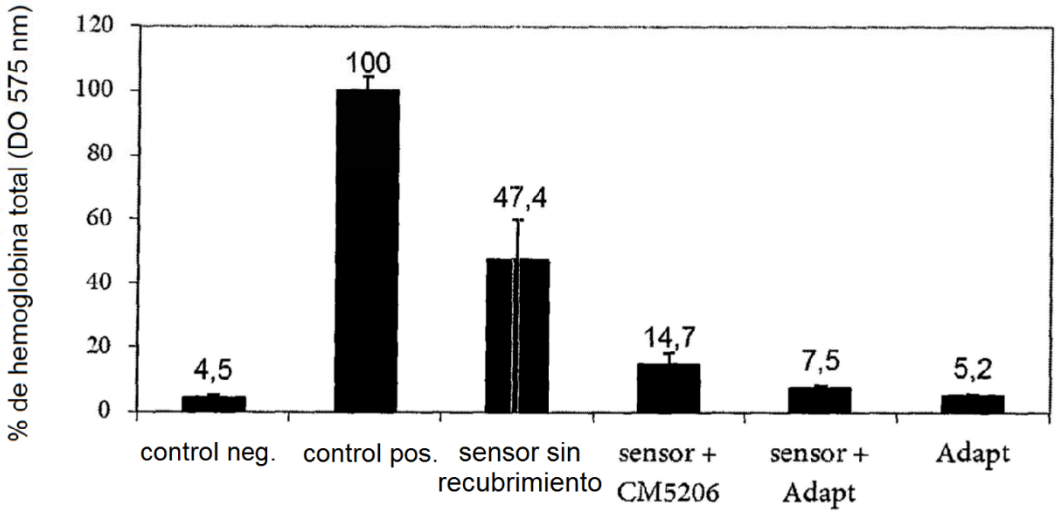

250
200
150
100
50
0
IL-8 [pg/ml]
Poliest. +Fib.
Adapt +Fib.
CM5206 +Fib.
E100 +Fib.
E100

Figura 14


% de hemoglobina total (DO 575 nm)
120
100
80
60
40
20
0
4,5
100
47,4
14,7
7,5
5,2
control neg.
control pos.
sensor sin recubrimiento
sensor + CM5206
sensor + Adapt
Adapt