

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 548**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/66** (2006.01)

**B01D 71/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**A61B 5/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2011 PCT/GB2011/000209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011 E 11704831 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2537034**

54 Título: **Capa de barrera para sensor de glucosa**

30 Prioridad:

**16.02.2010 US 304971 P**

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

**13.06.2019**

73 Titular/es:

**LIGHTSHIP MEDICAL LIMITED (100.0%)  
8 Clifford Street  
London W1S 2LQ, GB**

72 Inventor/es:

**CRANE, BARRY;  
PATERSON, WILLIAM y  
CULBERT, BRUCE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 716 548 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Capa de barrera para sensor de glucosa

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a sensores de glucosa, a métodos para fabricar tales sensores de glucosa y a métodos para detectar o determinar la cantidad de glucosa en una muestra.

10 **Antecedentes de la invención**

Se conoce desde hace cierto tiempo que los boronatos forman complejos de 5 miembros de anillo reversibles con los sacáridos. Más recientemente, esta propiedad de los boronatos se ha utilizado en el desarrollo de sensores para la medición de glucosa en fluidos biológicos. Por ejemplo, un sensor puede comprender un receptor de glucosa (el ácido borónico) y un fluoróforo que actúa como transmisor de la señal. Estas químicas indicadoras se pueden inmovilizar con facilidad sobre una fibra óptica de un diámetro apropiado, que a continuación se puede situar en los fluidos o tejidos corporales para medir la glucosa.

Se conoce desde hace cierto tiempo que los ácidos borónicos forman complejos reversibles con proteínas glucosiladas y glicosiladas. Aunque se han realizado intentos para elaborar químicas detectoras de ácido borónico que sean selectivas, es obvio que las proteínas glicosiladas representan interferencias potenciales en la determinación de glucosa en los fluidos corporales cuando se usan ácidos borónicos como sensores. Además, otros materiales endógenos de peso molecular medio a alto tienen el potencial de interferir con el receptor de ácido borónico actuando como inactivadores del fluoróforo transmisor. Por lo tanto, existe la necesidad de un medio para eliminar estas interferencias de un sensor de glucosa que usa química indicadora de ácido borónico/fluoróforo.

**Sumario de la invención**

La invención aborda el problema que se ha descrito anteriormente mediante el revestimiento de la química indicadora de glucosa de ácido borónico/fluoróforo con una capa de barrera protectora que es permeable a la glucosa pero que limita el paso de moléculas de peso molecular elevado tales como proteínas y proteínas glicosiladas. Por lo tanto, la presente invención proporciona un sensor óptico de glucosa que comprende

- una región detectora que comprende un receptor de ácido borónico para unirse a la glucosa y un fluoróforo asociado a dicho receptor;
- una guía de ondas óptica para dirigir la luz incidente a la región detectora; y
- una capa de barrera hidrófila, polimérica, permeable a la glucosa que comprende una membrana semipermeable que se proporciona sobre al menos una parte de la región detectora, en la que un polímero hidrófilo y/o un polímero cargado negativamente está presente dentro de los poros de la membrana, formándose la membrana por generación *in situ* del polímero hidrófilo y/o cargado negativamente por difusión de un monómero hidrófilo y/o cargado negativamente en los poros de una membrana e inicio de la polimerización;

en el que el sensor se adapta de un modo tal que la glucosa entra en la región detectora del sensor a través de dicha capa de barrera.

La capa de barrera es capaz de limitar el paso de proteínas y proteínas glicosiladas a la región detectora. Por lo general, la capa de barrera es básicamente impermeable a proteínas y proteínas glicosiladas. Por ejemplo, la capa de barrera puede limitar o prevenir el paso de, o ser básicamente impermeable a, moléculas que tienen un peso molecular mayor de 6000, preferentemente mayor de 5000, más preferente mayor de 4000.

La capa de barrera comprende una membrana semipermeable, por ejemplo una membrana de diálisis. El tamaño de poro de la membrana se puede seleccionar de un modo tal que asegure la permeabilidad a la glucosa pero limite o prevenga el paso de macromoléculas de mayor tamaño tales como proteínas y proteínas glicosiladas. El uso de una membrana de diálisis que tiene un valor de corte de peso molecular (MWCO) de 1000 a 5000 elimina interferencias potenciales tales como insulina, beta-microglobulina y albúmina y sus derivados glicosilados.

Un polímero hidrófilo y/o cargado negativamente está presente dentro de los poros de la membrana. Esto se consigue a través de una polimerización *in situ*, dentro de los poros de la membrana, de una mezcla de monómeros que comprende uno o más monómeros hidrófilos y/o uno o más monómeros cargados negativamente. La membrana resultante es particularmente eficaz como barrera para proteínas y proteínas glicosiladas debido a su hidrofiliidad y/o carga negativa y tiene la ventaja adicional de que el proceso de polimerización se puede usar para controlar, y para disminuir adicionalmente, el tamaño de poro de la membrana.

La presente invención también proporciona un método de detección o cuantificación de la cantidad de glucosa en una muestra, que comprende insertar en la muestra un sensor de glucosa de acuerdo con la invención, proporcionar luz incidente a la región detectora del sensor y detectar el patrón de emisión del fluoróforo.

Se describen características y realizaciones preferentes adicionales de la invención en la descripción acompañante y las reivindicaciones anexas.

### Breve descripción de las figuras

5 Las Figuras 1 y 1a representan un sensor de la invención que incorpora una fibra óptica y un monitor para tal sensor.

10 Las Figuras 2 y 3 representan diversas realizaciones de una región detectora de un sensor de la invención.

La Figura 4 muestra un gráfico de la calibración de glucosa de un sensor de fibra óptica revestido con una membrana de diálisis de fibra hueca de poliéter sulfona que está (a) modificada mediante el proceso de polimerización *in situ* que se describe en el Ejemplo 1 o (b) sin modificar. Las calibraciones se llevaron a cabo en sangre humana.

### 15 Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, el término hidrófilo indica un material que tiene afinidad por el agua. Los sensores de glucosa de la invención se usan por lo general para detectar o cuantificar glucosa en una solución acuosa. Por lo tanto, la capa de barrera hidrófila en el exterior de la región detectora tiene afinidad por la solución acuosa en la que está disuelta la glucosa. Además, la hidrofiliidad de la capa de barrera ayuda a repeler las proteínas plasmáticas cuando se usa un sensor en un fluido corporal, en particular en sangre.

20 Como se usa en el presente documento, una capa de barrera permeable a la glucosa es un material que permite el paso de glucosa a través de la capa pero que limita el paso de proteínas y proteínas glicosiladas.

La presente invención está prevista para su uso con cualquier sensor óptico de glucosa que use química detectora de glucosa de ácido borónico/fluoróforo. Están previstos particularmente los sensores de fibra óptica, pero la presente invención también se puede usar con sensores que tengan diferentes tipos de guías de onda ópticas. La detección de glucosa se lleva a cabo por lo general en fluidos corporales tales como tejido intersticial o sangre, aunque se puede llevar a cabo la detección de cualquier solución acuosa usando los sensores de la invención. Las realizaciones particulares que se describen en el presente documento están previstas para su uso como sensores invasivos para inserción en un vaso sanguíneo. Sin embargo, la presente invención no se limita a tales sensores invasivos. Los sensores no invasivos para uso *in vitro*, los sensores implantables y los sensores subcutáneos también están dentro del ámbito de la presente invención.

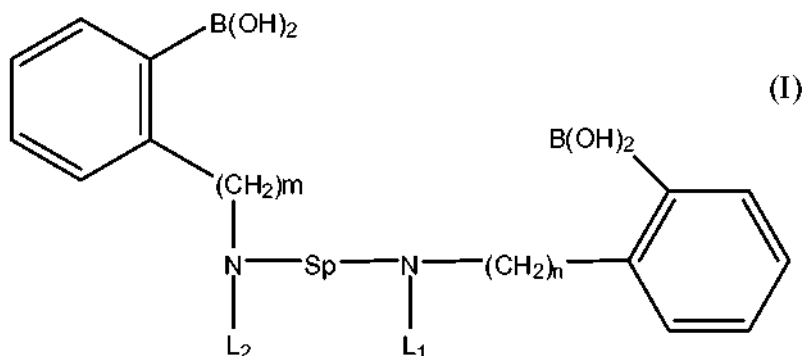
Un ejemplo de un sensor de la invención que incorpora una fibra óptica se representa en las Figuras 1 y 1a. El sensor 1 comprende una fibra óptica 2 que incluye una región detectora 3 en su extremo distal. En el caso de un sensor invasivo, la fibra 2 está adaptada para inserción en un paciente, por ejemplo inserción en un vaso sanguíneo a través de una cánula. La región detectora 3 (que se representa con mayor detalle en las Figuras 2 y 3) contiene una celda o cámara 7 en la que está contenida la química indicadora. La fibra óptica se prolonga a través del cable 4 al conector 5 que está adaptado para acoplarse con un monitor 8 apropiado. El monitor incluye por lo general un cable óptico 4a opcional que en un extremo se acopla al conector en 5a y en el otro se bifurca para conectarse a (a) una fuente apropiada de luz incidente para el sensor óptico 9 y (b) un detector para la señal 10 de retorno.

45 En una realización, el sensor de la invención es un sensor desechable. El sensor está adaptado por lo general para conectarse a un monitor no desechable que comprende una fuente 9 de luz y un detector 10.

50 Como se representa en la Figura 2, la región detectora 3 incorpora una celda 7 en forma de una cámara dentro de la fibra. La celda puede tener cualquier forma, siempre que permita que pueda estar contenida la química indicadora en la ruta de la luz incidente dirigida por la guía de ondas, en este caso una fibra. De ese modo, la celda puede estar unida al extremo distal de la fibra o guía de ondas o puede estar en forma de una cámara dentro de la fibra teniendo una forma deseada.

55 La celda 7 contiene la química indicadora, en concreto un receptor de ácido borónico para unirse a la glucosa y un fluoróforo asociado al receptor. El patrón de emisión (por ejemplo, la longitud de onda, intensidad, vida útil) del fluoróforo se altera cuando el analito se une al receptor permitiendo la detección óptica de glucosa. El receptor y el fluoróforo se pueden unir directamente entre sí en forma de un constructo receptor-fluoróforo. Algunos ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen antraceno, pireno y los derivados de los mismos. Algunos ejemplos de receptores de ácido borónico adecuados son los compuestos que tienen al menos uno, preferentemente dos grupos ácido borónico.

60 En una realización preferente, el receptor es un grupo de fórmula (I)



en la que  $m$  y  $n$  son iguales o diferentes y son por lo general uno o dos, preferentemente uno;  $Sp$  es un espaciador alifático, por lo general un resto alquileo, por ejemplo un resto alquileo C1-C12, por ejemplo un resto alquileo C6; y  $L1$  y  $L2$  representan los posibles puntos de unión a otros restos, por ejemplo a fluoróforo o a un hidrogel. Por ejemplo,  $L1$  y  $L2$  pueden representar un resto alquileo, alquileo-arileno o alquileo-arileno-alquileo, unido a un grupo funcional. Cuando no se prevé ninguna unión a otro resto, el grupo funcional está protegido o reemplazado por un átomo de hidrógeno. Los grupos alquileo habituales para  $L1$  y  $L2$  son grupos alquileo C1-C4, por ejemplo metileno y etileno. Los grupos arileno habituales son grupos fenileno. El grupo funcional es por lo general cualquier grupo que pueda reaccionar para formar un enlace, por ejemplo, con el fluoróforo o un hidrogel, por ejemplo éster, amida, aldehído o azida.

La variación de la longitud del espaciador  $Sp$  altera la selectividad del receptor. Por lo general, una cadena de alquileo C6 proporciona un receptor que tiene una buena selectividad por la glucosa.

Se encuentran detalles adicionales de tales receptores en el documento de Patente US 6.387.672.

El receptor y el fluoróforo están unidos por lo general entre sí y pueden estar unidos además a una matriz polimérica. Un hidrogel es un ejemplo de una matriz polimérica adecuada.

La región detectora 3 del sensor de glucosa tiene una o más aberturas 6a, 6b para permitir que la glucosa entre en la celda. La capa de barrera de la invención se proporciona por lo general a través de estas aberturas de un modo tal que la glucosa entre en la celda a través de la capa de barrera. En las Figuras 2 y 3, la capa de barrera se proporciona sobre la región detectora 3 completa. Sin embargo, alternativamente, la capa de barrera se puede proporcionar solamente sobre parte de la región detectora, por ejemplo solo a través de las aberturas 6a y 6b.

El sensor está diseñado por lo general de un modo tal que cualquier abertura en la región detectora a través de la cual pueda pasar la glucosa está cubierta con la capa de barrera. Esto asegura que la adsorción de proteínas este limitada al menos a las aberturas en la región detectora. Sin embargo, en una realización preferente, la región detectora completa, o la superficie completa del sensor que va a entrar en contacto con la muestra que se somete a ensayo, se reviste o se cubre con la capa de barrera. Esto ayuda a prevenir la adsorción de proteínas sobre cualquier superficie del sensor y mejora la biocompatibilidad del sensor en el caso de sensores invasivos o implantables.

Como se representa en la Figura 2, la capa de barrera BL puede aplicarse directamente sobre la región detectora, en este caso sobre la punta de la fibra óptica. En una realización alternativa que se representan la Figura 3, la región detectora 3 se proporciona dentro de un soporte 11 separado y la capa de barrera se proporciona sobre el soporte 11. El uso de una estructura de soporte separada proporciona resistencia adicional a la capa de barrera que por sí misma puede ser muy frágil. Se proporcionan orificios o poros en el soporte para permitir que la glucosa entre en la región detectora 3. Algunas estructuras de soporte adecuadas son tubos de polímero que se perforan con orificios, por ejemplo mediante ablación con láser. Las fibras huecas microporosas que se usan habitualmente en los oxigenadores médicos y que tienen poros de aproximadamente 0,2 micrómetros de diámetro proporcionan estructuras de soporte apropiadas para su uso con los sensores de fibra óptica. Algunas estructuras de soporte alternativas son cubiertas tejidas de materiales poliméricos o metálicos tales como las que se describen en el documento de Patente WO2009/019470.

Si se desea, la capa de barrera puede estar adherida a la superficie del sensor, por ejemplo, a la propia fibra óptica o al soporte 11. Se puede conseguir mediante la aplicación de un adhesivo adecuado tal como cianoacrilato. Alternativamente, cuando la superficie del sensor y el material de la capa de barrera son apropiados, la unión entre la capa de barrera y el sensor se puede termoformar, por ejemplo en Ja, Jb de las Figuras 2 y 3.

La capa de barrera se forma a partir de un material polimérico que es hidrófilo, permeable a la glucosa y que ofrece cierta restricción al paso de materiales de alto peso molecular tales como proteínas.

5 Un hidrogel, como se usa en el presente documento, es una matriz polimérica hidrófila que se hincha cuando se sitúa en agua. Cuando se sitúa en agua, el agua se dispersa a través de la matriz. Algunos ejemplos de materiales de hidrogel adecuados incluyen poliacrilamida reticulada, polidimetil acrilamida, polihidroxi metacrilato de etilo, polivinilpirrolidona, acrilatos de polietilenglicol y metacrilatos de polietilenglicol. El hidrogel se reviste por lo general directamente sobre la superficie exterior de la región detectora, y en el caso de una fibra óptica se reviste por lo general directamente sobre la punta de la fibra óptica. El hidrogel puede incorporar materiales adicionales tales como aniones, como se describe adicionalmente posteriormente.

15 La capa de barrera se forma mediante una membrana semipermeable tal como una membrana de diálisis. Las membranas de diálisis son membranas semipermeables que separan las moléculas en virtud de su forma, tamaño, hidratación y polaridad. Son particularmente adecuadas para su uso en la presente invención dado que su tamaño de poro permite que la glucosa permee la membrana pero es demasiado pequeña para permitir el paso de proteínas. Las membranas de diálisis están habitualmente en forma de fibras huecas y están disponibles en materiales tales como poliariletersulfona, poliamida, policarbonato, poliacrilonitrilo, polisulfona, polietersulfona, fluoruro de polivinilideno y materiales celulósicos o las mezclas o las modificaciones de los mismos.

20 En otro aspecto de esta realización, que se describe con detalle posteriormente, la membrana semipermeable se forma a partir de una membrana microporosa que tiene polímeros incorporados dentro de los poros de la membrana (por ejemplo, mediante polimerización *in situ* dentro de los poros). La presencia de los polímeros dentro de los poros causa una reducción en el tamaño de poro de un modo tal que la membrana actúa como membrana semipermeable, formando una barrera para los materiales de peso molecular elevado tales como proteínas y proteínas delicadas. Algunas membranas microporosas adecuadas para su uso en este aspecto tienen por lo general un tamaño de poro en la región de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo hasta 2  $\mu\text{m}$  o hasta 1  $\mu\text{m}$ , por ejemplo aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$ .

30 Las membranas semipermeables están disponibles con diferentes tamaños de poro que están relacionados con el valor de corte de peso molecular (MWCO) de la membrana. El valor de corte de peso molecular indica el peso molecular máximo de una molécula que puede atravesar los poros de la membrana. Los tamaños de poro pequeños se denominan "flujo bajo" con un bajo MWCO y un tamaño de poro mayor se denomina "alto flujo" con un alto MWCO. Las proteínas son macromoléculas que varían en peso molecular de aproximadamente 6000 para la insulina a 11.800 para la beta-microglobulina, de 66.200 para la albúmina a 970.000 para IG. De ese modo, para eliminar estas interferencias potenciales y sus derivados se debería elegir un material de bajo MWCO que no permita que los materiales de un peso molecular de 6000 o mayor pasen a través pero permita que pase la glucosa (Pm de 180). Sin embargo, el tamaño de poro se debería maximizar mientras que se eliminan estas interferencias con el fin de proporcionar un flujo máximo de glucosa en el interior del sensor.

40 Con el fin de proporcionar un tiempo de respuesta aceptable para un sensor intravascular que mide la glucosa de forma continua, la membrana se debería seleccionar preferentemente para que proporcione un tiempo de respuesta de un 90% de no más de tres minutos, preferentemente no más de dos minutos y medio. Las membranas preferentes tienen un MWCO de al menos 1000 y preferentemente no más de 5000. Por ejemplo, el MWCO puede ser al menos 1500 o al menos 2000, por ejemplo no más de 4000. Los tamaños de poro eficaces preferentes (tamaños de poro preferentes) son de 1 a 20 nm, preferentemente de 1 a 10 nm, por ejemplo aproximadamente 6 nm.

50 En la realización de la invención que se describe posteriormente en la que la polimerización se lleva a cabo dentro de los poros de la membrana, la etapa de polimerización disminuye el MWCO eficaz y el tamaño de poro de la membrana. El MWCO y los tamaños de poro preferentes que se han descrito anteriormente se refieren a la membrana final para su uso en el sensor de glucosa y por lo tanto son el MWCO eficaz y los tamaños de poro eficaces de la membrana resultante después de la polimerización *in situ*.

55 El sensor se puede revestir o cubrir directamente con la membrana, pero es preferente que la membrana se proporcione sobre un soporte, por ejemplo un tubo en el que se sitúa el sensor (véase la Figura 3). En una realización, la región detectora del sensor se reviste con un hidrogel y la membrana, por ejemplo la capa de barrera de membrana de diálisis se sitúa sobre la capa de hidrogel.

60 Algunos de los materiales que se usan como materiales de membrana de diálisis son inherentemente hidrófobos, por ejemplo polisulfona, polietersulfona y fluoruro de polivinilideno. De acuerdo con la presente invención, la capa de barrera es hidrófila con el fin de evitar adsorción de proteínas séricas sobre la capa. Por lo tanto, se modifican materiales que son por naturaleza hidrófobos con el fin de proporcionar cierto carácter hidrófilo, por ejemplo mediante injerto de grupos hidrófilos en el polímero o mediante polimerización de injerto usando monómeros hidrófilos. Algunos grupos y monómeros hidrófilos adecuados incluyen metacrilato de 2-hidroxietilo, ácido (met)acrílico y grupos o monómeros que portan hidroxilo o sulfonilo.

65

La polimerización de injerto se puede conseguir de acuerdo con las técnicas de M Belfort *et al.* (J Membr Sci. 1996.111. 193-215). Estos describen el uso de técnicas de radiación para polimerizar mediante injerto monómeros hidrófilos tales como metacrilato de 2-hidroxietilo, ácido acrílico, y ácido metacrílico sobre superficies de membrana de polisulfona, lo que da como resultado membranas con un aumento de flujo. Se describen técnicas alternativas por parte de Higuchiet *et al.* (J. Membr Sci. 1991.57.175-185.) en las que se injertan químicamente grupos terminados en los extremos con sulfonilo e hidroxilo a superficies de membrana de polisulfona, lo que conduce a una reducción de la adsorción de proteínas.

Se pueden proporcionar alternativamente membranas hidrófilas mediante el uso de injerto anfífilico o polímeros de peine como aditivos modificadores de superficie para las membranas (Mayes *et al.* Macromolecules. 2002.35.7652-61.). De forma similar, se pueden incorporar grupos polietilenglicol a un polímero de polisulfona como se describe por parte de Mayes *et al.* (Biomaterials. 2006. 27. 856-865.). Estas membranas han mostrado una resistencia considerable a la adsorción de proteínas y la adhesión celular. Algunos ejemplos de membranas adecuadas son los que se describen en el documento de Patente US 6.193.077. Estas son membranas de polietersulfona macroporosas (con poros de 0,1 a 100 micrómetros) hidrófilas que no se agrietan preparadas mediante revestimiento de la superficie con una solución acuosa de un polímero de óxido de polialqueno de alto peso molecular preformado (de 25.000 a 1.000.000 daltons) y un monómero polifuncional seguido de polimerización en plasma. Algunos ejemplos adicionales de membranas adecuadas son las que se describen en el documento de Patente US 5.468.390. Estas membranas son membranas de arilpolisulfona que se han modificado mediante polimerización de monómeros monofuncionales sobre la superficie sin el uso de un iniciador.

Aquí se describe, pero no es parte de la invención, una realización en la que el carácter hidrófilo se proporciona mediante la incorporación de uno o más polímeros hidrófilos durante formación por hilado por vía húmeda de una membrana de diálisis. Las membranas de diálisis se producen por lo general mediante hilado de una solución de un polímero apropiado con el fin de formar la estructura de membrana deseada (por ejemplo una membrana de diálisis de fibra hueca, que se puede usar para cubrir el sensor). En esta realización, se añade un polímero hidrófilo a la solución de polímero antes del hilado, lo que conduce de ese modo a una membrana de diálisis formada por el polímero o polímeros de membrana principales (por ejemplo polisulfona, polietersulfona o fluoruro de polivinilideno) así como el polímero o polímeros hidrófilos. La membrana resultante comprende por lo tanto áreas o bolsillos hidrófilos que permiten que el agua pase a través. La hidrofiliidad de la membrana resultante se puede controlar variando la cantidad de polímero hidrófilo que se incorpora. Por lo general, el polímero hidrófilo compone aproximadamente un 10% del contenido de polímero total de la solución antes de hilado.

Un polímero hidrófilo, como se usa en el presente documento, es un polímero que comprende unidades que tienen carácter hidrófilo, por ejemplo, que se prepara a partir de una mezcla de monómeros en la que al menos uno de los monómeros tiene carácter hidrófilo. Algunos ejemplos de polímeros hidrófilos adecuados son polietilenglicol, óxido de polietileno y polivinilpirrolidona.

En una realización alternativa adicional, se proporciona carácter hidrófilo mediante la provisión de un polímero hidrófilo, que tiene por lo general grupos funcionales con características repelentes de proteínas conocidas, dentro de los poros de la membrana. La provisión del polímero dentro de los poros de la membrana se consigue mediante la difusión de uno o más monómeros hidrófilos adecuados en la membrana (por ejemplo de un tamaño de poro de 6 a 20 nm) e iniciando una polimerización, por ejemplo aplicando activación por UV en presencia de un iniciador. Esto conduce a una polimerización que se produce dentro de los poros de la membrana y el polímero resultante queda atrapado dentro de los poros. Si se desea, las etapas de difusión y polimerización se pueden repetir una o más veces para aumentar la cantidad de polímero formada dentro de los poros de la membrana. La membrana está, por ejemplo, en forma de una membrana de diálisis de fibra hueca de un modo tal que el tubo resultante se podría usar para cubrir el sensor proporcionando las propiedades de barrera necesarias.

En un aspecto alternativo de esta realización, el polímero hidrófilo se proporciona dentro de los poros de una membrana microporosa, por ejemplo una fibra hueca microporosa (de un tamaño de poro habitual de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo hasta 2  $\mu\text{m}$  o hasta 1  $\mu\text{m}$ , por ejemplo aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$ ). La disminución inherente en el tamaño de poro causada por la polimerización *in situ* dentro de los poros de la membrana proporciona una membrana que es una barrera apropiada para las interferencias tales como proteínas y proteínas glicosiladas.

Cuando se usa una membrana microporosa, esta se puede aplicar sobre un soporte separado 11 como se representa en la Figura 3. Alternativamente, la propia membrana microporosa puede funcionar tanto como el soporte así como la capa de barrera.

En esta realización, el grupo funcional integrado en la membrana (por ejemplo la membrana microporosa o la membrana de diálisis) es preferentemente polietilenglicol u óxido de polietileno que tienen características conocidas repelentes de proteínas. Los monómeros hidrófilos adecuados para su uso en esta realización incluyen por lo tanto dimetacrilato de polietilenglicol, polietilenglicol dimetilacrilamida, diacrilato de polietilenglicol y polietilenglicol diacrilamida, o una combinación de los mismos. Es preferente el dimetacrilato de polietilenglicol. El dimetacrilato de polietilenglicol y el diacrilato de polietilenglicol, y diversos derivados, de pesos moleculares variables, se pueden obtener con facilidad en Sigma-Aldrich, UK.

Por lo general, la mezcla de polimerización que se difunde en los poros de la membrana comprende un monómero prolongador de cadena además del monómero o monómeros hidrófilos. Algunos ejemplos de prolongadores de cadena adecuados incluyen di(met)acrilato y di(met)acrilamida.

5 Se ha mostrado que las membranas de acuerdo con esta realización de la invención proporcionan una inhibición significativa de la adsorción de proteínas y una mejora como barrera a interferencias de receptor de ácido borónico/fluoróforo. Además, tales membranas tratadas proporcionan la capacidad de disminuir y ajustar finamente el tamaño de poro de la membrana. Dado que el monómero o monómeros hidrófilos se difunden en los poros de la membrana y se polimerizan *in situ*, el tamaño de poro disminuirá y por lo tanto aumentará el MWCO. Esta  
10 disminución en el tamaño de poro proporciona una membrana que actúa como una barrera más eficaz a las proteínas y las proteínas glicosiladas. Por lo tanto, mediante la variación de la concentración de la solución de monómero que se difunde y el reticulador, y el número de veces que se lleva a cabo la difusión y la polimerización, se pueden ajustar el tamaño de poro y el MWCO y se pueden determinar mediante experimento. El MWCO se  
15 puede determinar mediante la difusión de materiales monodispersos de pesos moleculares conocidos con una molécula fluorescente añadida. Se hacen pasar materiales de peso molecular gradualmente creciente través de la membrana y se puede determinar el avance de la difusión usando un fluorómetro como detector. Algunos ejemplos de materiales monodispersos adecuados son dextranos marcados con fluoresceína disponibles en Sigma-Aldrich y en una diversidad de pesos moleculares.

20 En un aspecto adicional de la invención, la eficacia de la capa de barrera se puede mejorar mediante la incorporación de una carga negativa en la capa. Las proteínas están cargadas negativamente a pH fisiológico de un modo tal que la incorporación de una carga negativa en la capa de barrera actúa como repelente para las proteínas incluyendo proteínas glicosiladas, u otras interferencias cargadas negativamente. Esto se puede conseguir mediante la incorporación de un monómero o polímero cargado negativamente o un anión a la capa de barrera.

25 Los aniones son particularmente adecuados para la incorporación a un hidrogel. Algunos ejemplos de aniones adecuados incluyen haluros, sulfonato, carboxilato, alcóxido.

30 Los monómeros o polímeros cargados negativamente son adecuados para la incorporación a una capa de barrera de membrana (por ejemplo, una membrana microporosa o una membrana de diálisis). Los monómeros o polímeros cargados negativamente adecuados incluyen sulfopropilmetacrilato de potasio, y los ácidos acrílico o metacrílico o sus polímeros correspondientes.

35 Se pueden difundir uno o más monómeros cargados negativamente tales como sulfopropilmetacrilato de potasio en la membrana (por ejemplo una membrana microporosa o una membrana de diálisis) y a continuación polimerizarlos *in situ*. La polimerización se puede llevar a cabo de una forma similar a la que se ha discutido anteriormente con respecto a los monómeros hidrófilos tales como dimetacrilato de polietilenglicol. Este proceso conduce a la formación de un polímero cargado negativamente que está atrapado en virtud de su tamaño, o a través de copolimerización con monómeros hidrófilos, en el interior de los poros de la membrana (por ejemplo una membrana microporosa o una membrana de diálisis). Tal polimerización se puede llevar a cabo usando uno o más monómeros  
40 cargados negativamente solos, o usando una mezcla de uno o más monómeros hidrófilos que se han descrito anteriormente y uno o más monómeros cargados negativamente.

45 En una realización alternativa, el material cargado negativamente es heparina. Esto tiene la ventaja de que la carga negativa aportada por la molécula de heparina repele las proteínas, pero tiene el beneficio añadido de ser antitrombogénico. La heparina se puede incorporar a un hidrogel o inyectarse a, o polimerizarse con, una membrana (por ejemplo una membrana microporosa o una membrana de diálisis).

50 El sensor se fabrica mediante la provisión de una región detectora que comprende un receptor de ácido borónico para unirse a la glucosa y un fluoróforo asociado a dicho receptor; la provisión de una guía de ondas óptica para dirigir la luz incidente sobre la región detectora; y la provisión de una capa de barrera hidrófila, polimérica, permeable a la glucosa sobre al menos una parte de la región detectora; y en el que el sensor está adaptado de un modo tal que la glucosa entra en la región detectora del sensor a través de dicha capa de barrera.

55 La capa de barrera comprende una membrana semipermeable y el método comprende difundir uno o más monómeros seleccionados entre monómeros hidrófilos y cargados negativamente en los poros de la membrana (por ejemplo una membrana de diálisis o una membrana microporosa) e iniciar la polimerización. Esto da como resultado un polímero hidrófilo y/o cargado negativamente que se forma dentro de los poros de la membrana (por ejemplo la membrana microporosa o de diálisis) y una disminución en el tamaño de poro. La polimerización para formar el  
60 polímero hidrófilo o cargado negativamente se puede llevar a cabo antes o después de aplicar la membrana (por ejemplo la membrana microporosa o la membrana de diálisis) a la región detectora del sensor.

#### Ejemplo 1

65 Se sumergió una membrana de diálisis de fibra hueca de polietersulfona en la mezcla de polimerización que se expone a continuación durante 10 minutos y a continuación se inició la polimerización mediante UV a 240 nm

## ES 2 716 548 T3

durante 30 segundos con un ajuste de energía de 8,3 milivatios. La membrana resultante se lavó en una solución de tampón fosfato a 37 °C durante 12 horas, se aclaró en agua destilada de a continuación se secó.

<u>Mezcla de polimerización</u>	
2,00 g	Metacrilato de polietilenglicol (600)
1,00 g	Dimetilacrilamida
0,50 g	Propilsulfometacrilato de potasio
0,02 g	Irgacure 651
0,20 g	Triton X
3,50	Agua

- 5 La membrana resultante contiene un polímero que tiene unidades obtenidas a partir de dimetil acrilamida, sulfopropilmetacrilato de potasio, y está reticulada con dimetacrilato de polietilenglicol dentro de los poros.

10 La región detectora de un sensor de glucosa de fibra óptica que utiliza un indicador de ácido diborónico/fluoróforo de acuerdo con los que se describen en el documento de Patente US 6.387.672 se cubrió con la membrana anterior y se usó para determinar las concentraciones de glucosa de sangre humana. Con fines de comparación, también se llevaron a cabo experimentos en muestras de sangre humana usando un sensor idéntico al que se ha descrito anteriormente excepto en que se cubrió con una membrana de diálisis de fibra hueca de polietersulfona sin modificar.

15 Los sensores se sometieron a ensayo por excitación con una longitud de onda de excitación apropiada y medición de la señal de emisión de la química del sensor. Se definió una curva de respuesta a glucosa variando la concentración de glucosa en tres puntos, y la curva se definió además mediante un conjunto de tres constantes que permite el cálculo de la concentración de glucosa para cualquier intensidad de emisión medida dada. La modulación es una medida del cambio de intensidad para un cambio dado en la concentración de glucosa y por lo tanto es una  
20 medida de la sensibilidad del sensor. Se determinó una modulación inicial a tiempo cero a partir de una calibración de 3 puntos en solución salina isotónica tamponada con fosfato y esta se comparó con las modulaciones calculadas a partir de calibraciones adicionales de 3 puntos seguidas de exposición de los sensores a sangre humana durante 5 y 20 horas. Los resultados se representan en la Figura 4.

25 La Figura 4 muestra comparativamente la intensidad de señal fluorescente de cada sensor. Se puede observar que la disminución en la intensidad fluorescente con el tiempo es mucho mayor para el sensor que tiene la membrana sin modificar que para el sensor con la membrana modificada. La membrana modificada tiene unas propiedades de barrera mucho mejores frente a las proteínas y las proteínas glicosiladas que están presentes en la sangre humana, dando como resultado un aumento significativo de la sensibilidad del sensor.

30 La presente invención se ha descrito por referencia a una diversidad de realizaciones y ejemplos particulares. Sin embargo, la invención no se limita a estas realizaciones y ejemplos específicos.



**REIVINDICACIONES**

1. Un sensor óptico de glucosa que comprende:

- 5           - una región detectora que comprende un receptor de ácido borónico para unirse a la glucosa y un fluoróforo asociado a dicho receptor;  
 - una guía de ondas óptica para dirigir luz incidente a la región detectora; y  
 - una capa de barrera hidrófila, polimérica, permeable a la glucosa que comprende una membrana semipermeable que se proporciona sobre al menos una parte de la región detectora, en la que está presente un  
 10       polímero hidrófilo y/o un polímero cargado negativamente dentro de los poros de la membrana, formándose la membrana mediante generación *in situ* del polímero hidrófilo y/o cargado negativamente por difusión de un monómero hidrófilo y/o cargado negativamente en los poros de una membrana e iniciando la polimerización;

15       en el que el sensor se adapta de modo que la glucosa entre en la región detectora del sensor a través de dicha capa de barrera.

2. Un sensor de glucosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la membrana limita el paso de proteínas y proteínas glicosiladas que tienen un peso molecular de 6000 o mayor.

20       3. Un sensor de glucosa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la membrana limita el paso de proteínas y proteínas glicosiladas que tienen un peso molecular de 5000 o mayor.

4. Un sensor de glucosa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la membrana tiene un diámetro de poro eficaz de 1 a 20 nm.

25       5. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que está presente un polímero cargado negativamente dentro de los poros de la membrana, formándose la membrana por difusión de un monómero cargado negativamente en los poros de una membrana e iniciando la polimerización.

30       6. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la membrana semipermeable se forma por difusión de un monómero hidrófilo y/o cargado negativamente en los poros de una membrana de diálisis e iniciando la polimerización.

35       7. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la membrana semipermeable se forma por difusión de un monómero hidrófilo y/o cargado negativamente en los poros de una membrana microporosa e iniciando la polimerización.

8. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la capa de barrera incorpora un anión o un grupo o molécula cargado negativamente.

40       9. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la capa de barrera comprende heparina.

45       10. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la región detectora se proporciona dentro de un soporte y la capa de barrera se proporciona sobre dicho soporte.

11. Un método de fabricación de un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende

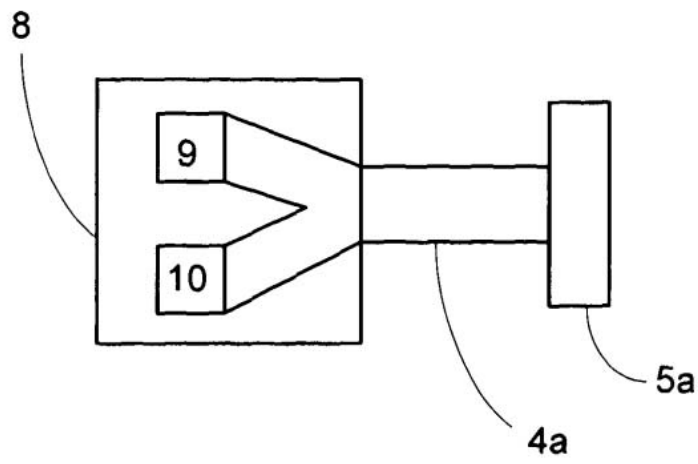
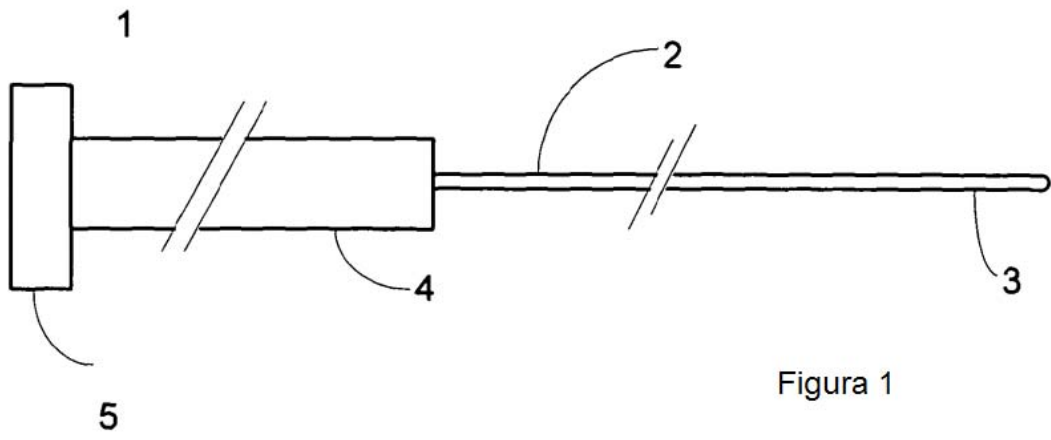
- 50           - proporcionar una región detectora que comprende un receptor de ácido borónico para unirse a la glucosa y un fluoróforo asociado a dicho receptor;  
 - proporcionar una guía de ondas óptica para dirigir luz incidente a la región detectora; y  
 - proporcionar una capa de barrera hidrófila, polimérica, permeable a la glucosa sobre al menos una parte de la región detectora en el que la capa de barrera es una membrana semipermeable y el método comprende difundir  
 55       un monómero o monómeros hidrófilos y/o cargados negativamente en los poros de una membrana e iniciar una polimerización, para proporcionar una membrana semipermeable que comprende un polímero hidrófilo y/o cargado negativamente dentro de los poros de la membrana;

60       en el que el sensor se adapta de modo que la glucosa entre en la región detectora del sensor a través de dicha capa de barrera.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el método comprende difundir un monómero o monómeros hidrófilos y/o cargados negativamente en los poros de una membrana microporosa e iniciar la polimerización.

65

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el método comprende difundir un monómero o monómeros hidrófilos y/o cargados negativamente en los poros de una membrana de diálisis e iniciar la polimerización.
- 5 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la capa de barrera es una membrana de diálisis producida por hilado de una solución de polímero que comprende al menos un polímero hidrófilo y/o cargado negativamente.
- 10 15. Un método de detección y/o cuantificación de la cantidad de glucosa en una muestra, que comprende insertar en la muestra un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, proporcionar luz incidente a la región detectora del sensor y detectar el patrón de emisión del fluoróforo.



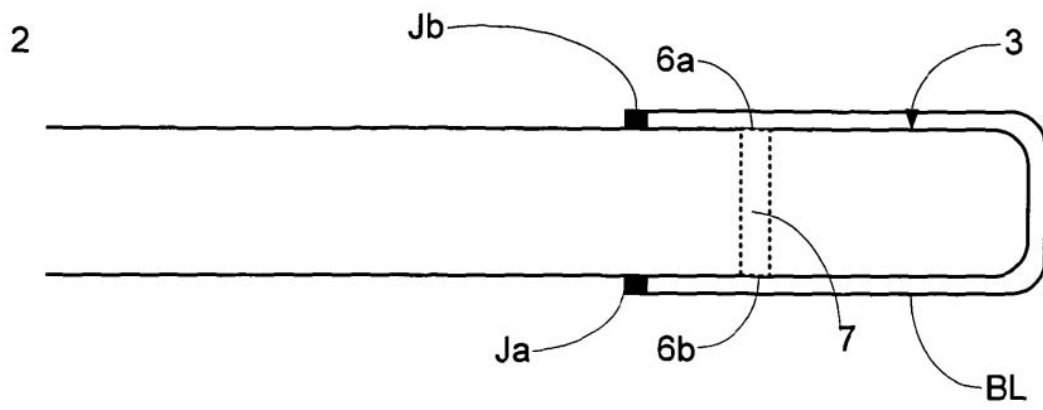


Figura 2

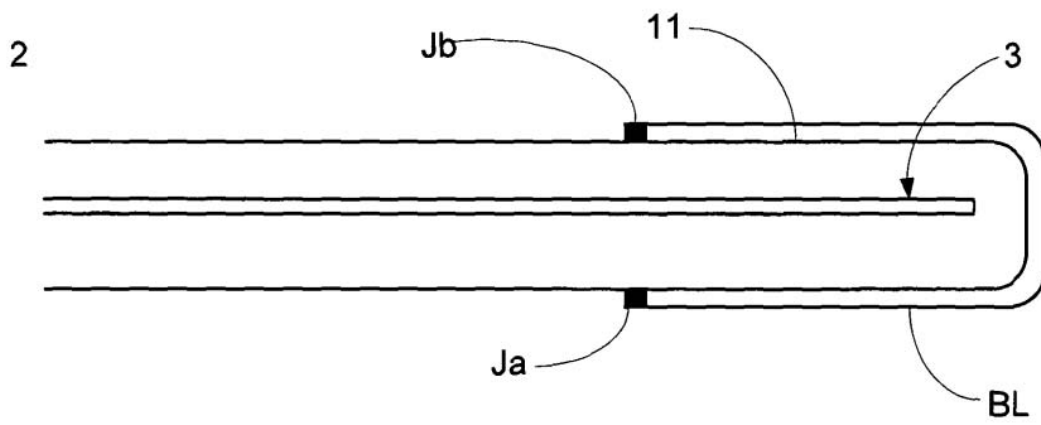


Figura 3

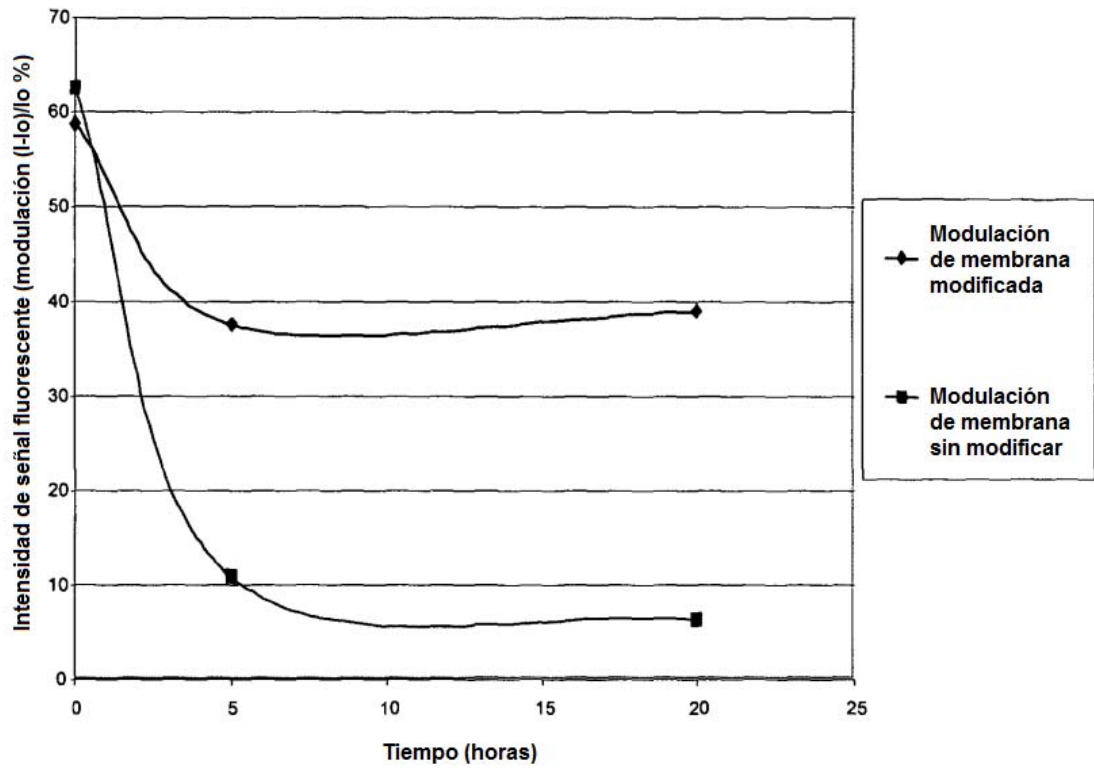


Figura 4