



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 341 963**

(51) Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04789425 .8**

(96) Fecha de presentación : **30.09.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1681992**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

(54) Título: **Detector con biocompatibilidad mejorada.**

(30) Prioridad: **30.09.2003 US 507399 P**
30.09.2003 US 507426 P
09.02.2004 US 542953 P

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.06.2010

(72) Inventor/es: **Mang, Andre;**
Buck, Harvey, B.;
Garrison, Michael D. y
Jernigan, Walter

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.06.2010

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 341 963 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

Detector con biocompatibilidad mejorada.

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a mediciones *in vivo*. Más específicamente, la presente invención se refiere a la detección de la concentración de sustancias específicas en fluidos corporales y a detectores para dicha detección.

10 La medición de la concentración de agentes químicos específicos en fluidos corporales se utiliza para muchos tipos de diagnósticos y tratamientos médicos. Por ejemplo, los pacientes diabéticos dependientes de insulina podrían medir la concentración de glucosa en su cuerpo varias veces al día. Los detectores *in vivo* han sido desarrollados y son útiles en algunas situaciones para pruebas repetidas o continuas, pero son limitados en duración, exactitud, facilidad de fabricación y vida útil potencial de utilización. Por lo tanto, existe la necesidad de detectores *in vivo* y técnicas de 15 detección mejorados.

20 Algunos detectores han sido desarrollados para limitar la reacción entre el analito y el reactivo utilizando membranas para controlar el flujo de analito de modo pasante. La utilización de estas membranas aumenta los costes de diseño, de fabricación y la dificultad de utilización de dichos detectores. Por lo tanto, existe todavía la necesidad de detectores y técnicas de detección *in vivo* mejorados.

El documento US 5.916.156 da a conocer un detector de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.

Resumen

25 Por lo tanto, es un objeto de las diferentes realizaciones de la presente invención dar a conocer detectores y técnicas de detección con características mejoradas de coste, exactitud, simplicidad, duración y vida útil *in vivo*.

30 Estos y otros objetivos son conseguidos en algunas realizaciones de la presente invención limitando el flujo de la muestra hacia el electrodo o hacia adentro del mismo, utilizando la configuración geométrica del detector, por ejemplo, proporcionando una pequeña abertura en una cavidad tridimensional que contiene una matriz conductora que incluye un reactivo.

35 La invención queda definida por las reivindicaciones adjuntas.

En la presente invención un detector electroquímico comprende un substrato, un electrodo de referencia en el substrato y un electrodo de trabajo que sustancialmente llena una cavidad sustancialmente definida por el substrato. El electrodo de trabajo comprende una matriz conductora y una enzima. En una variante de esta realización la matriz conductora comprende partículas de carbón y en otras la enzima es glucosa oxidasa. En otras variaciones adicionales 40 de esta realización, el electrodo de trabajo comprende también un catalizador tal como dióxido de manganeso. En otras variaciones adicionales, el electrodo comprende también un agente aglomerante, tal como un polímero, y puede incluir además un catalizador, tal como dióxido de manganeso. El aglomerante es en algunas de estas variantes un polímero.

45 En variantes de esta realización la cavidad tiene una forma sustancialmente cilíndrica, mientras que en otras tiene sustancialmente las dimensiones de un tronco de pirámide o un tronco de cono. En algunas de estas últimas variantes la cavidad tiene una superficie circular más reducida que está abierta suficientemente para permitir que pase el analito hacia adentro de la cavidad, y una superficie circular más grande que es adyacente a un material permeable al oxígeno. En otras variantes de esta realización, una superficie del electrodo de trabajo está abierta de manera que una muestra 50 puede entrar dentro del electrodo sin que la muestra pase a través de una capa que limita la difusión del analito.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es una vista en planta de la capa de substrato de un detector de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las figuras 2A-2G son vistas en sección transversal del detector mostrado en la figura 1 en varias fases de fabricación, de acuerdo con otra realización de la presente invención.

60 Las figuras 3A-3G son vistas en sección transversal del detector mostrado en la figura 1 en diferentes etapas de fabricación de acuerdo con otra realización de la presente invención.

La figura 4 es una vista en perspectiva del extremo de una tira detectora de acuerdo con una realización de la presente invención.

65 La figura 5 es una vista en perspectiva de la configuración de una cavidad alternativa para su utilización en el detector de la figura 4.

La figura 6 es una vista en perspectiva de otra configuración de cavidad alternativa para su utilización en el detector de la figura 4.

La figura 7 es una vista en sección de un detector de acuerdo con otra realización de la presente invención.

5 La figura 8 es una vista en planta de un detector según otra realización de la presente invención.

La figura 9 es una vista en sección de un detector según la realización mostrada en la figura 8.

10 La figura 10 es una sección de un detector según otra realización de la presente invención.

Descripción

15 Con el objetivo de ayudar a la comprensión de los principios de la presente invención, se hará referencia a continuación a la realización mostrada en los dibujos y se utilizará lenguaje específico para describir la misma. No obstante, se comprenderá que no se desea introducir limitación alguna en el ámbito de la invención. Cualesquiera alteraciones y otras modificaciones de las realizaciones descritas o ilustradas, y cualesquiera aplicaciones adicionales de los principios de la invención, tal como se han mostrado, se considerarán que se le ocurrirían de modo normal a un técnico en la materia a la que se refiere la invención.

20 Diferentes realizaciones de la presente invención dan a conocer un detector de analito que utiliza la geometría del detector para conseguir un control ventajoso de la disposición del analito y elementos de interferencia en el “área activa” del detector, que en este caso se refiere: 1) cuando se utiliza un electrodo sustancialmente plano, a la zona sustancialmente plana en la que tiene lugar la reacción del analito y la detección electroquímica; y 2) cuando se utiliza una matriz porosa, de un reactivo conductor, al área sustancialmente plana de la abertura que conecta el volumen que contiene la matriz conductora porosa al volumen del fluido corporal. El detector es implantado por debajo de la piel y comprende una parte que está en contacto con el fluido corporal circundante que contiene el analito a medir. En general, el detector comprende una matriz conductora, porosa, que tiene una superficie en contacto con el fluido corporal, y una segunda superficie en contacto con la superficie de un trazador conductor que comunica con un medidor que puede funcionar evaluando el analito basándose en la señal eléctrica recibida del detector. El área operativa del reactivo poroso es significativamente mayor que la superficie de contacto con el fluido o que la superficie del trazador conductor, proporcionando de esta manera un área superficial más grande para la reacción del analito y la reacción de detección electroquímica, y para la captación de subproductos tóxicos de la reacción medida en los electrodos, especialmente en comparación con un diseño más plano.

35 En una realización específica, el volumen ocupado por la matriz conductora incrementa en general en el área de sección transversal al alejarse de la superficie de contacto con el fluido hacia la superficie del trazador conductor. En otras que tienen cavidades parcialmente llenas, la cavidad aumenta de manera general en el área en sección transversal al alejarse desde la abertura que contiene el fluido descendiendo al volumen del reactivo. Todavía en otras, la cavidad aumenta de manera general en el área en sección transversal al alejarse de la superficie en contacto con el fluido.

40 En algunas realizaciones, se abre un cierto volumen a través del substrato y se coloca reactivo en el mismo. Una membrana por encima de la abertura de la cavidad es permeable al analito pero no a ciertos agentes de interferencia. Otra membrana cubre la otra abertura y no es permeable al analito. En variantes de esta realización, la segunda membrana es permeable selectivamente para excluir el analito, pero permite el paso de uno o varios cofactores (tales como oxígeno) en el fluido para que entren en la cavidad de reacción.

45 Algunas realizaciones de la presente invención son útiles para la detección subcutánea de una amplia variedad de analitos medibles por medios electroquímicos. A título de ejemplo, la explicación se facilitará haciendo referencia a un detector de glucosa, y se identifican elementos químicos y otros componentes de modo correspondiente. No obstante, se observará por los técnicos en la materia que se pueden detectar fácilmente otros analitos utilizando la presente invención con cambios correspondientes en los elementos químicos y similares de manera bien conocida en la técnica.

55 Haciendo referencia en particular a las figuras, la figura 1 muestra los componentes de un detector de acuerdo con una realización de la presente invención. La tira detectora (10) tiene una parte de cabecera (12) y una parte de cuerpo (14). La parte de cabecera (12) comprende los contactos (16, 18, 20) para conexión eléctrica a un voltímetro, un potenciómetro, un amperímetro y/u otros componentes de detección o de visualización. Los contactos pueden estar conectados directamente o indirectamente con dichos dispositivos que funcionan para controlar el potencial o la corriente en el detector, y para recibir y evaluar la señal eléctrica procedente de la parte detectora del detector, tal como es bien conocido en la técnica de los biodetectores electroquímicos.

60 La parte del cuerpo (14) comprende el electrodo de referencia (28), el electrodo de trabajo (30) y contraelectrodo (29). El trazador conductor (22) conecta el contacto (16) al electrodo de referencia (28), el trazador conductor (24) conecta el contacto (18) al electrodo de trabajo (30) y el trazador conductor (26) conecta el contacto (20) con el contraelectrodo (29). Tal como se explica en los ejemplos más adelante, cada una de estas estructuras es fabricada en un substrato (32) o sobre el mismo, cuyo substrato es preferentemente una capa flexible que tiene un grosor comprendido aproximadamente entre 2 y 10 milésimas de pulgada (entre unos 50 μm y 250 μm) de un material, tal como una

poliimida o poliéster, que no es permeable a los analitos de interés. Los trazadores (22, 24, 26) están realizados preferentemente en oro o carbón, pero también se pueden utilizar otros materiales conductores.

En una forma de esta realización, la parte del cuerpo (14) de la tira detectora (10) es aproximadamente rectangular en su forma, teniendo aproximadamente 25 mm de longitud y 450 μm de anchura, y está situada dentro de una membrana de fibras huecas (no mostrada) para aumentar la biocompatibilidad mientras se utiliza. El electrodo de trabajo (30) es rectangular (como mínimo apreciado desde arriba, tal como en la figura 1) y tiene aproximadamente 100 μm de anchura y 325 μm de longitud. El electrodo de trabajo (30) contiene una mezcla de reactivos adecuada para la aplicación. En una forma de esta realización la mezcla de reactivos comprende una matriz conductora (de 10 partículas de carbón), un catalizador (dióxido de manganeso), una enzima (glucosa oxidasa), un aglomerante polímero y un disolvente para el aglomerante polímero. Esta mezcla de reacción, al eliminar el disolvente, forma una matriz conductora, porosa, que llena o por lo menos llena sustancialmente una cavidad del substrato (32) para formar el electrodo (30). La construcción de estas estructuras se explica más adelante. En estas formas, la matriz de reactivo poroso expone una gran proporción de área superficial del reactivo para la reacción, aunque la parte plana del electrodo 15 es muy pequeña. La abertura de la cavidad contenedora regula la difusión del analito hacia adentro y hacia afuera de la cavidad, lo que en algunas realizaciones proporciona un mejor control de las variables en la medición de la reacción y una mejora correspondiente en la exactitud de la medición.

Cuando el detector está colocado, el fluido biológico entra en la cavidad que contiene el electrodo de trabajo (30) 20 y la glucosa del fluido reacciona con la enzima, cambiando las características de impedancia eléctrica del electrodo de trabajo (30). Un circuito controlador es puesto en comunicación eléctrica con el electrodo (30) con intermedio del contacto (18) y el trazador (24) y con el electrodo de referencia (28) y contraelectrodo (29) con intermedio de los contactos (16) y (20), y trazadores (22, 26) respectivamente. El potencial eléctrico en uno o varios electrodos es 25 controlado y la corriente o corrientes resultantes son analizadas (o viceversa) para determinar la concentración de glucosa en el fluido, tal como es conocido en la técnica.

En varias realizaciones alternativas, se incluyen en la tira detectora (10) un número mayor o menor de electrodos, tal como se comprenderá por los técnicos en la materia.

El fluido se encuentra en contacto con una cavidad que está dimensionada de manera específica para conseguir un 30 resultado especial. Una parte de estas realizaciones comprenden un volumen contenedor ("cavidad" en otros lugares de la descripción) que es aproximadamente cilíndrico en su forma. En otras realizaciones, un extremo del volumen contenedor puede ser sustancialmente más ancho que el otro extremo (por ejemplo, una abertura circular que tiene un diámetro que es el doble que el diámetro de la abertura circular del otro extremo), en el que una membrana permeable 35 al analito se encuentra encima de la abertura más pequeña y una membrana permeable al correactivo está dispuesta sobre la abertura más grande, de manera que la transferencia del analito se puede controlar por un lado, pero se puede captar suficiente correactivo del fluido por el otro lado.

Dentro de la cavidad se encuentra el reactivo y, en algunos casos, un reactivo cofactor que reacciona con un 40 componente del fluido biológico del volumen circundante. Se crea un potencial eléctrico en el lugar de la reacción y debe ser llevado a los circuitos de medición para efectuar la medición de la concentración del analito en la muestra. En estas realizaciones preferentes, el volumen de la cavidad es, como mínimo, un 20% aproximadamente (preferentemente un mínimo de 50% aproximadamente, más preferentemente un mínimo de 80% aproximadamente y, más preferentemente, 45 100% aproximadamente) llenado con una matriz conductora, porosa, que presenta reactivo en una parte significativa de la cavidad y, además (dada la naturaleza conductora de la matriz) lleva la carga producida en el lugar de la reacción a un trazador conductor que se extiende dentro de la cavidad, preferentemente en su superficie circundante. El trazador conductor se extiende a la superficie del substrato y a una patilla de contacto, que establece contacto eléctrico con una unidad medidora u otros circuitos de prueba.

Haciendo referencia a las figuras 2A-2G, haciendo referencia a ciertas estructuras de la figura 1, se ha mostrado en forma algo esquemática un método de construcción de un tipo de detector de acuerdo con la presente invención. La figura 2A muestra un substrato (32) que puede ser una sustancia de más o menos rigidez, tal como podría ser evidente a un técnico en la materia. Por ejemplo, el substrato (32) puede ser de una poliimida, un material cerámico u otros materiales.

La figura 2B muestra que una capa conductora (34) de material conductor ha sido depositada sobre el substrato (32). En varias realizaciones la capa conductora (34) es depositada por bombardeo iónico, depósito en forma de vapor u otros métodos como serían evidentes a los técnicos en la materia. La capa conductora (34) es modelada utilizando técnicas litográficas o de corte por rayos láser, por ejemplo, para definir las trazadores conductores (22, 24, 60 26) sobre el substrato (32), tal como se muestra en la figura 2C. En otras realizaciones, los trazadores conductores (22, 24, 26) son impresos o formados de otro modo sobre el substrato (32) utilizando serigrafía u otra técnica de modelado.

La figura 2D muestra que una capa de material relativamente no conductor (36) ha sido depositada sobre los conductores (22, 24, 26). El material (36) puede ser, por ejemplo, PYRALUX o VACREL, de la firma E.I. DuPont de Nemours and Company (en esta descripción "DuPont") o similares, tal como sería evidente para un técnico en la materia.

La figura 2E muestra que el rebaje (38) ha sido realizado en la capa (36). El rebaje (38) es formado, por ejemplo, por ataque químico selectivo, corte por rayos láser u otras técnicas. El reactivo (40) es depositado a continuación sobre la estructura (31E) incluyendo el rebaje (38) para conseguir la estructura (31F) mostrada en la figura 2F. El reactivo (40) comprende una matriz conductora, tal como partículas de carbón, un catalizador tal como dióxido de manganeso, una 5 enzima tal como glucosa oxidasa y un aglomerante polímero. Estos componentes son dispersados de manera típica en un disolvente orgánico durante la etapa de depósito. El exceso (por encima del material (36)) es retirado por rasquetar, pulido químico-mecánico (CMP) o técnicas similares para conseguir la estructura (31G) mostrada en la figura 2G. El reactivo (40) portador de un disolvente es evaporado a continuación por acción de calor o vacío, dejando el reactivo 10 (40) sustancialmente llenando el rebaje (38). En otras realizaciones el reactivo (40) es depositado directamente en el rebaje (38).

Otro método para la construcción de un detector de acuerdo con la presente invención se describirá a continuación en relación con las figuras 3A-3G, haciendo referencia continuada a ciertas estructuras de la figura 1. El dispositivo (50A) comprende el sustrato (52) realizado en un material que no es permeable a la sangre. La cavidad (54), 15 mostrada en la figura 3B, está formada en el substrato (52) por extracción para crear el dispositivo (50B). Tal como se ha mostrado en la figura 3C, el dispositivo (50C) comprende el dispositivo (50B) con la adición de una capa conductora (56) que se extiende hacia adentro del rebaje (54) y a lo largo de la superficie superior del dispositivo (50C).

20 La capa conductora (56) está modelada para formar el dispositivo (50D) mostrado en la figura 3D. Los trazadores conductores (22', 24', 26') corresponden de manera general a los conductores (22, 24, 26) de la figura 1. El compuesto reactivo (58) es depositado encima del dispositivo (50D), por lo menos en grado suficiente para llenar el rebaje (54), para formar el dispositivo (50E), mostrado en la figura 3E.

25 El exceso de reactivo (58) (el que se encuentra por encima de la superficie superior del substrato (52)) es eliminado para conseguir el dispositivo (50D) mostrado en la figura 3F. Esta eliminación puede ser llevada a cabo también por rasquetar, CMP u otro cualquier procedimiento adecuado que se sería evidente para un técnico en la materia. Una capa de material de encapsulado (60) es superpuesta sobre el dispositivo (50F) para formar el dispositivo (50G) tal como se ha mostrado en la figura 3G. En su utilización el fluido corporal establece contacto directamente con el reactivo 30 conductor (58) en la abertura superficial (62). El oxígeno u otra sustancia utilizada para la detección es transportado a través de la capa (60) pasando al reactivo (58) a través de la abertura/superficie (64).

35 En una forma preferente de esta realización, un detector de glucosa, el substrato (52) es poliimida y la capa de encapsulado (60) es silicona. La capa conductora (56) (y por lo tanto los trazadores conductores (22', 24', 26')) son de oro. El reactivo (58) comprende partículas de carbón en una matriz conductora porosa que funciona no solamente como matriz inmovilizadora y estabilizante para la enzima, sino también como elemento de electrodo activo. La matriz conductora en el rebaje (54) establece contacto con el trazador conductor (24') que forma una ruta conductora desde el electrodo de trabajo al área conductora del detector (tal como el contacto (18) de la figura 1) para conexión a un medidor u otro tipo de circuitos.

40 En otras realizaciones, los conectores están constituidos por otro metal o son trazadores de carbón impresos o depositados de otra manera sobre una superficie del substrato. En otras realizaciones, el conductor es depositado alrededor de la circunferencia dentro del rebaje (54), es depositado sobre una pared del rebaje (54), es depositado sobre el reactivo (58) o establece contacto de otro modo con la matriz de electrodo. En varias realizaciones la mezcla de reactivos (incluyendo la matriz conductora) llena como mínimo aproximadamente 20% del rebaje (54), preferentemente un mínimo del 80% aproximadamente del rebaje (54) y más preferentemente sustancialmente la totalidad de dicho rebaje (54). El resto del rebaje (54) contiene aire (en un detector no utilizado), fluido (en un detector utilizado), u otros materiales, tal como sería evidente para un técnico en la materia. En otras realizaciones, el rebaje (54) tiene una profundidad que es, como mínimo, la mitad de la anchura en la distancia más corta a través de la abertura (64), a través 50 de la cual la muestra entra en el electrodo; y preferentemente el rebaje (54) tiene una profundidad, como mínimo, igual a su anchura en la distancia más corta a través de la abertura (64).

55 En la realización preferente de un detector de glucosa el catalizador en el reactivo (58) es preferentemente dióxido de manganeso, que reduce el potencial requerido para la oxidación del peróxido de hidrógeno en el electrodo de carbón. Otros materiales adecuados para este catalizador se pueden encontrar en el documento EP 0 603 154, que se incorpora a título de referencia. En otros detectores para medición *in vivo* se utilizan electrodos metálicos de platino o paladio para detectar H₂O₂. Con estos electrodos la diferencia de potencial requerida para una medición razonablemente exacta es aproximadamente de 600-800 mV en comparación con Ag/AgCl, mientras que con MnO₂ como catalizador el potencial requerido se reduce a 300-400 mV.

60 Los diseños de muchas realizaciones de la invención posibilitan la conversión eficaz de analito en todo el volumen del rebaje (54), que está conectado eléctricamente de manera eficaz al conductor (24'). En la realización a título de ejemplo que se ha descrito en lo anterior, la enzima, glucosa oxidasa, es atrapada en la matriz de aglomerante polímero y adsorbida sobre la superficie de las partículas de carbón. Esta adsorción en fase sólida aumenta la estabilidad de la enzima y permite almacenamiento en ambientes no secados, aumentando la comodidad de la fabricación y almacenamiento del detector. El ambiente hidrofóbico de la matriz de aglomerante polímero se cree también que incrementa la estabilidad de la enzima.

El reactivo para su utilización en una realización preferente de la presente invención es preparado mezclando el disolvente que contiene una sustancia aglomerante polímera con partículas de carbón como mezcla de tinta de impresión por serigrafía preformulada, con el catalizador y cualquier disolvente adicional requerido para conseguir una mezcla manipulable. Una vez se han combinado estos componentes, se incluyen en algunos casos otros aditivos, tales como uno o varios detergentes o polímeros hidrofílicos para mejorar las características de humectación, o bien uno o más polímeros fluorocarbonados para mejorar las características de transporte de oxígeno del reactivo. La enzima puede ser también incluida en el reactivo para producir un reactivo de una sola etapa. En otra variante se mezcla un catalizador con la formulación de tinta, y la enzima y otros aditivos se añaden al reactivo electrodo poroso curado más adelante, a partir de una solución acuosa.

Los contenedores pueden ser llenados con la mezcla de reactivos al dispensar la mezcla de reactivos mediante una jeringa con aguja o colocando una cantidad en exceso de reactivo sobre el rebaje y en el interior del mismo, y retirando luego el exceso con una cuchilla o rasqueta. De manera alternativa, el reactivo puede ser aplicado por serigrafía o depositado de otra forma directamente en los rebajes. En algunos casos en los que los rebajes son formados creando orificios a través del substrato, el reactivo puede ser aplicado desde el lado del detector con la abertura más grande hacia adentro de la cavidad (o desde cualquier lado si la cavidad tiene forma cilíndrica), siendo llenado el rebaje por acción capilar a través de la abertura (64) mostrada en la figura 3G. En todos los casos, el reactivo puede ser secado en una estufa o bajo la acción de vacío o a temperatura ambiente, dependiendo de las exigencias del aglomerante polímero presente en el reactivo.

En otras realizaciones, el propio reactivo puede ser recubierto con un material polímero para resistir la adsorción de proteínas y para impedir la pérdida de enzima a lo largo de la utilización del detector. Ejemplos de sustancias adecuadas para esta finalidad son MPC, PELLETHANE, y un recubrimiento glima producido por plasma. También son especialmente ventajosos los recubrimientos de poliuretano hidrofílicos tales como los que se describen en las patentes USA 5.322.063 y 6.509.148. Además, el material de recubrimiento puede ser diseñado o seleccionado para resistir interferencias de compuestos tales como ácido ascórbico, ácido úrico, y acetaminofeno. Recubrimientos cargados negativamente, tales como NAFION (comercializado por Du-Pont) y PVC-malonato, son especialmente adecuados para este objetivo. De manera alternativa, pueden ser utilizados recubrimientos cargados positivamente, tales como los que se explican en el documento EP 0 603 154. En el caso de la construcción del detector con orificios formados de manera pasante en el substrato, la cara posterior del rebaje, que normalmente no establecería contacto con la muestra objeto de prueba, puede estar dotada de un recubrimiento con un material impermeable o preferentemente con un material permeable para cualquier cofactor requerido por el reactivo pero no permeable al agua o al analito. Es adecuado para esta utilización cuando el reactivo comprende una oxidasa, un material tal como un polímero de silicona (por ejemplo, SILGARD 184 de la empresa Dow Corning Corporation).

De manera alternativa o adicionalmente, para mejorar la tolerancia al oxígeno del detector cuando el reactivo comprende una oxidasa, se puede incorporar en el propio reactivo un material para mejorar el transporte de oxígeno. Para este objetivo son adecuados polímeros fluorocarbonados, tales como NAFION.

El electrodo de referencia (28) en diferentes realizaciones de la presente invención puede ser cualquier referencia en estado sólido, tal como se comprenderá por los técnicos en la materia. Un material para electrodos de esta referencia es una tinta de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl) que se aplica a un área modelada de oro de manera similar al material del reactivo que se ha explicado anteriormente. El contraelectrodo (29) es preparado a partir de una pasta de carbón, una tinta de un metal noble, una superficie de metal desnudo u otro material, tal como sería evidente para un técnico en la materia.

Una vez construido, el detector es cortado del substrato mediante cualquiera de los diferentes métodos conocidos por los técnicos en la materia. Un método preferente es un procedimiento de ataque en húmedo que forma cortes alrededor de la periferia del detector y deja bordes redondeados y suaves. El perfil del detector es preferentemente creado antes del modelado de electrodos y depósito del reactivo. En otras realizaciones el perfil puede ser formado al mismo tiempo que se forman los rebajes para los electrodos. Preferentemente se dejan puentes para retener al detector en una posición fija con respecto al substrato laminar para hacer más fáciles las etapas de proceso subsiguientes. Después de la construcción, los puentes pueden ser cortados o troquelados, y el detector es retirado del elemento laminar. Los detectores pueden ser insertados a continuación en membranas de fibras huecas para conseguir biocompatibilidad adicional y aislamiento del detector con respecto a materiales celulares y proteínas grandes que frecuentemente se encuentran presentes en el medio subcutáneo.

En otras diferentes realizaciones, los rebajes para los reactivos son formados utilizando técnicas litográficas. Se pueden construir localizaciones de electrodos cilíndricos por laminación de un recubrimiento destinado a formar fotomáscaras, tales como PIRALUX o VACREL sobre el substrato modelado, exponiendo luego y rellenando el recubrimiento para formar un orificio (por ejemplo con un diámetro entre 100 μm y 1000 μm , y con un grosor aproximadamente de 10-125 μm). De manera alternativa, los rebajes pueden ser conseguidos por ataque químico en el substrato de poliimida mediante un proceso de ataque en húmedo o por perforación mediante rayos láser o creados por otros procesos mecánicos tales como impresión.

En otras realizaciones los rebajes son llenados con mezcla de reactivos colocando un exceso de reactivo sobre los rebajes y en el interior de los mismos, y retirando luego el exceso con una cuchilla o por rasqueta tal como se ha descrito en relación con las figuras 2A-2G y 3A-3G anteriormente. En otras realizaciones el reactivo es dispensado o

impreso por serigrafía dentro de los rebajes. En otras realizaciones en las que los rebajes son formados en un substrato de poliimida, el reactivo es aplicado desde el lado opuesto del substrato, llenando los rebajes por acción capilar.

La figura 4 muestra una configuración alternativa de una cavidad de acuerdo con otra realización de la presente invención. En esta realización a título de ejemplo, la cavidad tiene la forma de un cono truncado, cuya parte superior es un círculo más grande y la parte inferior es un círculo más pequeño. El reactivo llena como mínimo 80% de la cavidad. La muestra que contiene el analito entra en la cavidad a través del círculo más pequeño. En algunas variantes de esta realización el círculo más grande es adyacente a una capa permeable a cualesquier cofactores, tales como oxígeno, que pueden participar en la reacción de la cavidad. Las secciones transversales de la cavidad, tomadas paralelamente al círculo más pequeño, tienen un área de aumento monotónicamente al alejarse del círculo más pequeño. La geometría elemental indica que para un cono recto truncado circular (un “tronco de cono”) y para un radio de círculo más pequeño determinado r_0 , un radio de círculo mayor r_1 y una altura h , el área del círculo más pequeño es $A=\pi r_0^2$ y el volumen

total de la cavidad es $V = \frac{\pi h}{3} (r_0^2 + r_0 r_1 + r_1^2)$. La proporción del volumen de la cavidad con respecto al área de la

abertura de la muestra es, por lo tanto, $\frac{V}{A} = \frac{h}{3} \left(1 + \frac{r_1}{r_0} + \frac{r_1^2}{r_0^2}\right)$. Se observará que, si se define R como la proporción r_1/r_0 del radio mayor (fondo) con respecto al radio menor (superior), entonces $R > 1$ y la proporción de volumen al área

de entrada es de: $\frac{V}{A} = \frac{h}{3} (1 + R + R^2) > h$. En algunos realizaciones preferentes h es, como mínimo, de la misma longitud que el diámetro $2r_0$ del círculo más pequeño, de manera que en estas realizaciones la proporción V/A es como mínimo el doble del radio más pequeño (superior) r_0 . En otras realizaciones, h tiene una longitud que es, como mínimo, aproximadamente el doble del diámetro $2r_0$ del círculo más pequeño, de manera que en estas realizaciones esta proporción V/A es como mínimo 4 veces el radio más pequeño (superior) r_0 .

La figura 5 muestra una configuración alternativa de la cavidad de acuerdo con otra realización de la presente invención. En esta realización la cavidad tiene la forma de una pirámide truncada, cuyas partes superior e inferior son sustancialmente cuadradas. También en este caso la muestra entra en la cavidad por la abertura cuadrada más pequeña (parte superior). Esta cavidad está sustancialmente llena, por ejemplo, de matriz de reactivo conductor, que se ha explicado en las realizaciones mostradas anteriormente. También en este caso las secciones transversales de la cavidad, tomadas paralelamente al cuadrado más pequeño, tienen un área monotónicamente creciente al alejarse de la abertura del cuadrado más pequeño. Dada esta pirámide cuadrada, recta, truncada (un “tronco de pirámide”) con una longitud s_0 del lado de la abertura cuadrada pequeña, una longitud de lado s_1 de la abertura cuadrada grande y una

altura h , el área del cuadrado pequeño es $A=s_0^2$ y el volumen de la cavidad es $V = \frac{h}{3} (s_0^2 + s_0 s_1 + s_1^2)$. La proporción

del volumen de la cavidad al área de la abertura de la muestra es, por lo tanto, $\frac{V}{A} = \frac{h}{3} \left(1 + \frac{s_1}{s_0} + \frac{s_1^2}{s_0^2}\right)$. También en

este caso si R se define como la proporción de la longitud del lado de la abertura grande con respecto a la longitud del

lado de la abertura más pequeña (es decir, s_1/s_0), entonces se cumple también $\frac{V}{A} = \frac{h}{3} (1 + R + R^2) > h$. En algunas realizaciones preferentes esta proporción es, como mínimo, aproximadamente la misma que la longitud del lado s_0 de la abertura cuadrada más pequeña (superior).

La figura 6 muestra otra configuración alternativa de la cavidad de acuerdo con otra realización de la presente invención. En esta realización la cavidad es cilíndrica y llega como mínimo a 20% aproximadamente de matriz reactiva conductora. La sección transversal del cilindro es sustancialmente la misma desde un extremo de la cavidad al otro. Con una cavidad cilíndrica de radio r de acuerdo con esta realización, el área de la misma abertura es nuevamente $A=\pi r^2$, y el volumen total de la cavidad es $V = \pi r^2 h$. La proporción del volumen de la cavidad respecto al área de

la abertura de la muestra es, por lo tanto, $\frac{V}{A} = h$. En algunas realizaciones preferentes, la proporción es, como mínimo, $2r$ aproximadamente, o como mínimo, aproximadamente el diámetro de la abertura de la muestra.

Los detectores subcutáneos de tipo habitual utilizan membranas para cubrir la superficie activa del detector que se encuentra directamente en contacto con el fluido corporal. Estas membranas sirven para el objetivo de restringir la difusión de analito hacia la superficie activa del detector a efectos de mejorar el rango o linealidad de medición del detector. Estos también sirven para limitar el acceso a la superficie del detector de material o sustancias procedentes del fluido externo que puedan influir en el rendimiento del detector, por ejemplo, por ensuciamiento de la superficie

activa del detector. Estas membranas se ensucian de modo general con material biológico a lo largo del tiempo, y la difusión de analito a través de las mismas se reduce. En estas circunstancias, la sensibilidad del detector varía, y el detector debe ser recalibrado, o proporciona resultados inexactos.

5 Otros problemas pueden presentarse también con las membranas. Por ejemplo, las membranas se pueden hinchar por la absorción de fluido corporal, aumentando la permeabilidad con respecto al analito, o bien las membranas se pueden degradar por contacto con los fluidos corporales. Los componentes del cuerpo, tales como las enzimas o la actividad celular, tal como la de macrófagos, puede incrementar la permeabilidad con respecto al analito. Cualesquiera cambios en la permeabilidad de la membrana de dicho detector conduce a la inexactitud o a la necesidad de recalibrado.

10 Los detectores subcutáneos conocidos se hacen resistentes a los efectos del contacto con un medio ambiente *in vivo* al recubrirlos con una membrana que reduce la adherencia de proteína o de material celular. Estas membranas son formuladas asimismo frecuentemente para limitar la difusión del analito a través de la membrana. Esta limitación de la difusión puede ser necesaria para conseguir sensibilidad al dicho analito con respecto al rango de medición requerido.

15 Estas membranas cubren el área sensible del detector y se adhieren firmemente a la superficie para cumplir ambas funciones requeridas.

20 Por ejemplo, los detectores subcutáneos de glucosa incorporan de manera típica una membrana para proporcionar un interfaz con respecto a los tejidos en los que están implantados. Estas membranas permiten de manera típica la difusión de glucosa y otras moléculas de pequeñas dimensiones hacia la superficie del detector, pero impiden el paso de moléculas más grandes como proteínas y células intactas. Las membranas pueden combinar funciones múltiples, tales como proporcionar el interfaz biológico, aumentar la bascularización, reducir la difusión de glucosa hacia el detector, aumentar el suministro de oxígeno al detector, etc. No obstante, estas membranas estas sometidas al ensuciamiento, hinchamiento o degradación a lo largo de la vida útil del detector, alterando la proporción a la que se puede difundir la glucosa hacia el detector, provocando un cambio en la sensibilidad efectiva del detector y produciendo errores en los valores de medición o provocando la necesidad de recalibrado.

25 Los problemas anteriores han sido enfocados en múltiples formas. Se han desarrollado y aplicado membranas que reducen y resisten el ensuciamiento en mayor o menor medida. Se han desarrollado métodos de medición que son más independientes de la permeabilidad de la membrana. El enfoque alternativo que se ha seguido de manera mas amplia consiste en la utilización de microdiálisis o microperfusión para recoger una muestra de líquido en la que el analito se ha equilibrado con el tejido *in vivo* y para retirar la muestra hacia un sistema detector para su análisis. Estos métodos eliminan el detector del entorno subcutáneo. La microperfusión tiene las ventajas de la microdiálisis y reivindica una mejor resistencia al ensuciamiento de las membranas mediante la utilización de orificios grandes en el catéter que no se pueden bloquear por la adsorción de proteínas.

30 No obstante, el ensuciamiento de las membranas y la desviación de los detectores son todavía problemas significativos en los detectores subcutáneos de glucosa que tienen membranas y materiales mejorados. Los métodos de microdiálisis han aumentado notablemente la complejidad de los dispositivos de medición y adolecen de retardos de tiempo debido a la exigencia de desplazar líquido dentro del sistema. Esto proporciona también un tiempo de respuesta muy largo al sistema analítico, dado que el fluido debe ser bombeado hacia el detector alejado a poca velocidad para asegurar una recuperación persistente del analito del tejido.

40 Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un detector subcutáneo que no muestra cambios significativos en la sensibilidad, que conduce a resultados erróneos o que requiere recalibrado. La solución de la presente invención mantiene la ventaja de la solución de microdiálisis, evitando el incremento de complejidad.

45 Diferentes formas de la presente invención proporcionan un detector subcutáneo y sistema y métodos asociados que proporcionan ventajas claras con respecto a otros enfoques de la técnica anterior. En general, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un sistema detector que incluye un biodetector y una membrana de encapsulado que está separada con respecto al biodetector proporcionando un volumen interno de fluido en contacto con el biodetector. La membrana permite el deseado equilibrio entre el fluido corporal externo y el volumen interno de fluido y, por lo tanto, permite una lectura precisa del analito por el biodetector. En diferentes realizaciones la separación es fija (utilizando separadores entre el biodetector y la membrana) o variable (por ejemplo, en el caso en que el biodetector no está fijado de manera espacial rígida con la membrana). En algunas realizaciones, la distancia (h) entre la membrana y el área activa se puede definir como distancia entre los puntos más próximos; una distancia promedio de cada punto sobre la superficie activa tomada perpendicularmente a dicha superficie; o bien el punto de la membrana más próximo al área activa medida de forma perpendicular a la superficie del área activa. Las dimensiones del volumen interno son controladas preferentemente en relación con el área activa del detector. En realizaciones preferentes, dada un área activa del detector s , el volumen interno es, como mínimo, $s^{3/2}/10$, ó $10s^{3/2}$ aproximadamente.

50 El sistema detector se distingue de, como mínimo, una parte de la técnica conocida por el hecho de que se incluye una membrana separada alejada del biodetector en vez de estar situada directamente sobre el área activa del biodetector. Esto permite que el área de la superficie de la membrana sea mucho más grande en comparación con el área activa del biodetector. Esto proporciona además una reserva de fluido, es decir, el volumen interno de fluido que se encuentra en comunicación de fluido con el área activa del biodetector y a través de la membrana, el fluido corporal. Además, el volumen interior se caracteriza porque el coeficiente de difusión del analito en el volumen interior es aproximadamente el mismo o superior que el coeficiente de difusión del analito en la membrana.

Por lo tanto, estas formas de la invención proporcionan un sistema de detector en el que el área activa está desplazada de la membrana interfacial y tiene un área activa mucho más reducida que el área de la membrana interfacial que establece contacto con el tejido en el que está implantado el detector. Debido al área superficial grande de la membrana, el volumen interno de equilibrio mantiene una concentración de analito que es casi idéntica a la del tejido en el que está sumergido, incluso cuando la difusión del analito a través de la membrana se ve dificultada o reducida. El biodetector, por otra parte, consume pequeñas cantidades de analito debido al área de contacto relativamente pequeña con el volumen de equilibrio. Por lo tanto, la concentración de analito que mide el detector sigue siendo casi idéntica a la de los tejidos circundantes, incluso en presencia de una difusión difícil a través de la superficie de la membrana. Además, el área relativamente grande de la membrana interfacial significa que requerirá más tiempo para que tenga lugar el ensuciamiento en oposición a la situación en la que la membrana está dimensionada de forma comparable al área activa del biodetector. Esto proporciona una vida útil más larga del sistema detector.

Se apreciará que las ventajas de la presente invención se obtienen con una serie de configuraciones para un biodetector y membrana de encapsulado. Por ejemplo, en un sistema, el biodetector tiene una parte de su superficie que es el área activa, y la membrana de encapsulado se extiende solamente por encima y queda separada con respecto al área activa del biodetector. En otro sistema, la totalidad del biodetector, incluyendo una o más áreas inactivas, está rodeado por la membrana. En una realización especialmente preferente, el biodetector queda alojado dentro de una estructura de membrana que adopta la forma de un cilindro u otra forma conveniente. La membrana del detector, por ejemplo, puede ser plana, tal como se ha mostrado en la figura 7, cilíndrica, tal como se ha mostrado en la figura 9, o puede tener otra forma. La forma del volumen interior será determinada principalmente por la forma de la membrana del detector y el área de detección del biodetector. Esta variedad de configuraciones están destinadas en todos los casos a quedar comprendida dentro de la referencia de membrana de "encapsulado".

La presente invención es utilizable con una gran variedad de biodetectores. El concepto operativo que subyace en algunas realizaciones de la invención es un sistema detector que tiene una membrana de encapsulado relativamente grande en comparación con el área activa del biodetector, juntamente con un volumen interno dentro de la membrana que en general se encuentra en equilibrio con el fluido externo en el exterior de la membrana y en comunicación con el área detectora del biodetector. La naturaleza del biodetector no es crítica, por lo tanto, para el funcionamiento de la presente invención y cualquier tipo de biodetector que altere la concentración o cantidad de un analito al funcionar para detectar un analito en un fluido es útil para la invención. En realizaciones preferentes, el biodetector es un detector electroquímico y un ejemplo específico de un sistema detector es aquél en el que el biodetector es utilizable para detectar glucosa, tal como se ha descrito anteriormente o en el documento EP 0 603 154. Se apreciará, no obstante, que el ámbito de la presente invención no está limitado de este modo y que estos son solamente ejemplos representativos de muchos otros biodetectores y analitos con los que tiene utilidad la presente invención.

Se observará además que el biodetector puede incluir separadamente varias configuraciones para proporcionar comunicación con el volumen interno de fluido. Por ejemplo, el biodetector puede tener una superficie exterior que establece contacto directamente con el fluido interno, o puede comprender capas superficiales o membranas que influyen adicionalmente en la difusión del analito hacia el área detectora. Tal como se utiliza en esta descripción, el término "área detectora" está destinado a comprender una amplia variedad de configuraciones de biodetector. El área biodetectora es el área efectiva en la que tiene lugar una detección real, por ejemplo, reacción electroquímica.

La elección de la membrana de encapsulado puede variar asimismo de forma amplia. Formas de la presente invención son utilizables para una amplia variedad de analitos y las membranas pueden ser escogidas, de acuerdo con ello para correlacionarse con el tipo de analito y el tipo de biodetector utilizado. Las membranas pueden combinar múltiples funciones, tales como proporcionar interfaz biológico, incrementar la bascularización, reducir la difusión del analito hacia el detector, aumentar el suministro de oxígeno hacia el detector, etc. Estas membranas son bien conocidas en la técnica para su utilización directa en el área detectora de los biodetectores y, a título de ejemplo, estas mismas membranas pueden ser utilizadas en la presente invención como membrana de encapsulado. La selección de biodetectores apropiados y membranas asociadas para su utilización en la presente invención para la detección de diferentes analitos se encuentra, por lo tanto, dentro de los conocimientos habituales en esta técnica.

Se apreciará que las dimensiones del volumen interno influirán en la sensibilidad y en otras características operativas del sistema detector. Requerirá un tiempo más prolongado para que un volumen interno grande alcance el equilibrio cuando existe un cambio en el fluido corporal externo debido al tiempo de retraso para que se difunda el analito a través de la membrana. Por otra parte, un volumen interno relativamente grande ayuda en otros aspectos, tales como la reducción del efecto de ensuciamiento de la membrana a lo largo del tiempo.

La limitación práctica en las dimensiones relativas del volumen de equilibrio y el biodetector en el tiempo de respuesta del sistema a los cambios en la concentración del analito en el medio externo. Esto presenta la oportunidad de un compromiso entre el incremento de la resistencia de difusión y el incremento en el tiempo de respuesta. Por ejemplo, el tiempo de retraso puede ser "adaptado" a la aplicación deseada al seleccionar la forma y dimensiones del área activa del biodetector con respecto a las dimensiones, posición y forma de la membrana. La selección apropiada de dichos parámetros dará lugar a resultados más estables y a un sistema detector que puede ser calibrado con menor frecuencia y que tiene una vida útil más prolongada.

Las dimensiones de la membrana de encapsulado y, por lo tanto, del volumen interno se pueden seleccionar y optimizar para los sistemas detectores específicos. Ello dependerá de la naturaleza del biodetector, del analito, del

fluido corporal, de la membrana y de otros factores. La selección de parámetros para este sistema se encuentra dentro del ámbito técnico sin necesidad de experimentación indebida y, por lo tanto, es innecesaria su explicación adicional.

Haciendo referencia a las figuras 7-10, se han mostrado varias realizaciones alternativas de un sistema detector de la presente invención. El sistema de la figura 7 tiene un biodetector que comprende una Superficie Activa Detectora (71). Esta parte del biodetector es sensible al analito de interés y, por ejemplo, convierte el analito en una señal medible. Esta superficie puede ser, por ejemplo, un detector enzimático electroquímico. La Superficie Activa Detectora (71) se encuentra en contacto de fluido con el volumen interior del detector (72) y produce una señal que está relacionada con la cantidad o concentración de un analito en el Volumen Interior del Detector (71). El Volumen Interior del Detector (72) está separado del Volumen Externo (74) por la membrana detectora (73). La Membrana Detectora (73) separa el Volumen Interior del Detector (72) con respecto al Volumen Externo (74). El analito tiene capacidad de penetrar en la Membrana Detectora (73) para alcanzar el Volumen Interior del Detector (72). No obstante, algunos componentes del Volumen Externo (74) se ven dificultados o impedidos por la Membrana Detectora (73) de entrar en el Volumen Interior del Detector (72). La Membrana Detectora (73) puede ser, por ejemplo, una membrana de microdiálisis realizada en poliamida o polisulfona.

El área de la membrana de encapsulado (73) es significativamente mayor que el área de la Superficie Activa Detectora (71), por ejemplo, unas 2 veces, 4 veces, o 10 veces más grande, o hasta 100 veces más grande. Cuando la membrana (73) empieza a estar sucia por material procedente del Volumen Externo (74) disminuye la tasa máxima posible de difusión del analito a través de la membrana (73). La cantidad de analito que cruza la membrana (73) es el producto de la tasa neta por área unitaria y el área de la membrana (73). El pequeño detector consume analito a una tasa proporcional a su concentración en el Volumen Interior del Detector (72) y el área de la Superficie Activa del Detector (71). Por lo tanto, cuanto mayor es el área de la Membrana del Detector (73), con respecto a la superficie activa del detector (71), menos cambiará la señal del detector como respuesta a un cambio en la tasa máxima de difusión de analito a través de la membrana (73).

En los materiales anteriores se han descrito realizaciones de biodetectores adecuados para utilización *in vivo*. Se ha descubierto que otros sistemas adicionales pueden ser utilizados para aumentar la biocompatibilidad de dichos detectores, tanto para los diseños preferentes y también de manera más general. Como ejemplo de ello, a continuación se realizará la explicación de la utilización de un recubrimiento de fosfolípidos biocompatibles (MPC) o/y una membrana de fibras huecas semipermeable. A continuación se explica una realización que muestra la configuración de un dispositivo *in vivo* de este modo y se apreciará que se pueden conseguir fácilmente modificaciones en estas realizaciones y también en otros diseños de detectores *in vivo*, de acuerdo con los conceptos que se han explicado.

Una suficiente biocompatibilidad es un pre-requisito para la utilización de cualquier detector en humanos con respecto a la seguridad y eficacia. Para mejorar la biocompatibilidad del detector y para aumentar la vida útil *in vivo*, el detector está recubierto por un recubrimiento de fosfolípidos biocompatible (MPC) o/y con una membrana de fibras huecas semipermeable. Tanto el recubrimiento MPC como la membrana de fibras huecas excluyen proteínas y células grandes y deben evitar procesos de ensuciamiento del electrodo. Además, la difusión de componentes potenciales tóxicos en el espacio subcutáneo se debe hacer más lenta o incluso se debe evitar.

Después de la implantación de un biodetector, el organismo empieza un proceso de curación de la herida con diferentes fases. La curación de una herida es un proceso muy complejo y todavía poco claro en algunos aspectos detallados. Una de estas fases, la reacción fibrosa (FBR) se consigue con un incremento de tejidos más libremente o densamente fibrosos. Los fibroblastos empiezan a producir colágeno y después de varios días, incluso semanas, el material extraño (en este caso el biodetector) será encapsulado en una bolsa de colágeno o colagenosa. El grosor de dicha bolsa de colágeno depende de la biocompatibilidad del material extraño (por ejemplo, el biodetector). Como mínimo, el tiempo de difusión del analito a medir depende del grosor de esta cápsula.

Una de las razones para esta reacción de los tejidos (daños de los tejidos, inflamación, insuficiente curación de la herida, encapsulado con tejidos fibrosos, infiltración de diferentes células de inflamación, mediadores, citoquinas y otros) después de la implantación de un biodetector en el espacio subcutáneo es en el caso de detectores basados en reactivo (por ejemplo, glucosa oxidasa) provocada por la difusión de compuestos tóxicos (células) (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) dentro del tejido, especialmente alrededor del área activa (71) del detector.

Dado que un organismo puede servirse asimismo con muchos mecanismos de defensa naturales (por ejemplo sistemas redox, enzimas tales como catalasa (en el caso de peróxido de hidrógeno)) esta reacción local de los tejidos depende de la concentración local de los compuestos tóxicos.

Con la utilización del presente sistema de membrana, estos compuestos podrían reaccionar con otros agentes reactivos en el fluido de los tejidos dentro del compartimiento artificial entre la superficie (71) del detector y la membrana (73). Además, estas sustancias activas se podrían difundir a toda la superficie de la membrana de manera que la cantidad total se dispersa. Por lo tanto, no habrá más acumulación local de los compuestos tóxicos alrededor del área superficial detectora (71) del detector y estos compuestos se difundirán a todas las superficies de la membrana (73) de manera que la cantidad por área es un factor de menor consideración. Es decir, una tasa de utilización específica de acumulación por área unitaria afectará a la totalidad del dispositivo en menor medida en un sistema que utiliza una membrana con un área superficial más grande que en un sistema que utiliza solamente una membrana directamente adyacente al área activa del detector.

Otra realización para utilizar dicho sistema de membrana es la posibilidad de que el analito se difunda sobre toda la superficie de la membrana hacia el área activa en caso de cierre parcial de los poros de la membrana (por ejemplo, por adherencia de células o adsorción de proteínas). En este caso, el ensuciamiento de la membrana que resulta en el cierre parcial de los poros tiene menor impacto en el comportamiento del detector, puesto que se dispone de una mayor área superficial de la membrana para difusión del analito desde el volumen fluido externo hacia el volumen interno al área activa del detector.

Las figuras 8 y 9 muestran otro detector *in vivo*, según la presente invención. En la figura 8, el detector (80) comprende la membrana (83) alrededor de un área activa biodetectora. El Volumen Externo (84) de fluido que contiene uno o varios analitos de interés se encuentra en contacto con la membrana (83), con intermedio de la cual se desplaza el analito para alcanzar la propia área activa. El conductor (85) se extiende hacia fuera de la membrana (83) hacia un dispositivo de control (no mostrado) que hace funcionar el detector electroquímico y capta los datos de salida, tal como se comprenderá por cualquier técnico en la materia sin necesidad de experimentación indebida.

La figura 9 muestra una sección del detector (80), tal como se ha indicado en la figura 8. El analito en el volumen externo (84) se desplaza a través de la membrana (83) hacia el volumen interno (82). El área activa (81) del detector comprende un reactivo y conductores eléctricos para activar y controlar la reacción detectora electroquímica. En esta realización, la membrana (83) rodea el área del detector activa (81) y el sustrato sobre el que se encuentra el área activa (81). Esto proporciona una superficie muy grande para la membrana (83), con las ventajas resultantes que se explican.

Algunas realizaciones de la presente invención, incluyendo la realización mostrada en la figura 10, proporcionan un detector subcutáneo (90) para pruebas *in vivo* de la concentración o presencia de un analito comprendiendo un cabezal detector que puede ser implantado en el espacio subcutáneo (94) con un volumen activo detector (91) que es sensible para un analito y una membrana (98) que encapsula, como mínimo, una parte del volumen activo (91) del detector, de manera que la membrana (98) es separada de la superficie para proporcionar un volumen interno (o compartimiento interno) de fluido (92) entre el volumen activo (91) del detector y la membrana (98) cuando el detector (90) es implantado en el tejido subcutáneo. El detector subcutáneo (90) puede comprender además un reactivo químico en el volumen activo (91) y el volumen interno (92) puede ser llenado de una solución, por ejemplo, una solución “ringer” para evitar burbujas de aire.

La membrana detectora puede estar conectada al cabezal del detector por cualquier medio adecuado, tal como una cola biocompatible. El detector en una realización está dotado de un recubrimiento de un polímero biocompatible que es permeable para el analito, por ejemplo, MPC. Los recubrimientos hidrofílicos de poliuretano de los documentos US 5.322.063 ó US 6.509.148 pueden ser utilizados también de manera ventajosa. La realización mostrada en la figura 10 comprende una matriz conductora en un volumen activo (91) que incluye una pasta de carbón, MnO₂ y GOD. La capa de recubrimiento (96) protege el trazado conductor (95) contra interacción con el fluido del espacio interno (92) (y protege también el fluido con respecto al conductor) y comprende una membrana de silicona (93) sobre un extremo del volumen activo (91). De este modo, en este ejemplo detector de glucosa, la glucosa y el oxígeno entran en el volumen activo (91) a través del puerto (99) y el oxígeno entra a través de la membrana de silicona (93). La reacción de oxidación de la glucosa tiene lugar en el volumen activo (91) y genera una señal eléctrica en el conductor (95) que conecta eléctricamente los lados del volumen activo (91) al conductor o conductores de salida del detector. En otros detectores, diferentes membranas, estructuras de electrodos y formas de componentes pueden ser utilizados tal como será evidente para los técnicos ordinarios en la materia sin necesidad de experimentación indebida.

La membrana puede ser una fibra hueca semipermeable de diálisis o puede ser un material de poliamida u otro (por ejemplo, un polímero) con un corte apropiado (por ejemplo, en el caso de detectores de glucosa entre 10-20 kD).

Para realizaciones representativas se comprobó la citotoxicidad según ISO 10993-5 utilizando material y extractos según ISO 10993-12 y se evaluó la inhibición de crecimiento y daños celulares. La ausencia de efectos en el crecimiento celular y su morfología en condiciones de trabajo (U=370 mV) del detector indica fijación y captación apropiados de la química del electrodo. La citotoxicidad moderada en condiciones no funcionales puede ser provocada por H₂O₂ generada por oxidación de glucosa mediada por GOD.

La respuesta histomorfológica al electrodo de trabajo (WE) con y sin membranas fue investigada en ratas Sprague Dawley después de un periodo de implantación de 10 días. El material de prueba fue insertado de forma subcutánea. La lámina de base del detector fue utilizada como control. Se determinó la reacción a cuerpos extraños (FBR) y la bascularización.

Tuvo lugar FBR acusada al utilizar el detector sin ninguna membrana. Tanto las membranas de MPC como de poliamida redujeron FBR. El detector recubierto por membranas de MPC y de poliamida resultó en un FBR comparable a los controles. Los resultados indican la biocompatibilidad de los detectores comprobados incluso en las peores condiciones (por ejemplo, sin consumo de H₂O₂ en el caso de fallo de corriente).

Estas investigaciones demuestran que el recubrimiento de MPC y el recubrimiento mediante una membrana de fibras huecas son eficaces para evitar la citotoxicidad y para la mejora de la biocompatibilidad. La reducción de FBR y el aumento de la neobascularización proporcionan un buen comportamiento del detector *in vivo*.

ES 2 341 963 T3

Si bien la invención se ha mostrado y descrito en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, los mismos se considerarán como ilustrativos y no restrictivos, debiéndose comprender que solamente las realizaciones preferentes han sido mostradas y descritas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Detector electroquímico que comprende:

5 un sustrato;
 un electrodo de referencia; y
10 un electrodo de trabajo

en el que el electrodo de referencia es conectable eléctricamente al electrodo de trabajo con intermedio de una muestra líquida, **caracterizado** porque el electrodo de trabajo llena sustancialmente una cavidad que está definida, por lo menos parcialmente por el sustrato y el electrodo de trabajo comprende una matriz conductora porosa y una enzima.

15 2. Detector electroquímico, según la reivindicación 1, en el que la matriz conductora comprende partículas de carbón.

20 3. Detector electroquímico, según la reivindicación 1, en el que el electrodo de trabajo comprende además un catalizador.

4. Detector electroquímico, según la reivindicación 3, en el que el catalizador comprende dióxido de manganeso.

25 5. Detector electroquímico, según la reivindicación 1, en el que el electrodo de trabajo comprende además un agente aglomerante.

6. Detector electroquímico, según la reivindicación 1, en el que la cavidad tiene una superficie más pequeña y una superficie más grande que tiene un área superficial, como mínimo, igual de grande que la superficie más pequeña; y la superficie más pequeña está abierta suficientemente para permitir el paso del analito hacia adentro de la cavidad.

30 7. Detector electroquímico, según una o varias de las reivindicaciones anteriores, en el que queda dispuesta una membrana sobre la abertura de la cavidad que es permeable al analito, pero no a ciertos interferentes.

35 8. Detector subcutáneo para pruebas *in vivo* de la concentración o presencia de un analito, que comprende un cabezal del detector dotado de un detector, según las reivindicaciones 1 a 7, que puede ser implantado en un espacio subcutáneo, teniendo el cabezal detector:

una superficie activa del detector que es sensible al analito, y

40 una membrana que encapsula, como mínimo, una parte de la superficie activa, de manera que la membrana está separada de la superficie activa para proporcionar un volumen interno entre la superficie activa y la membrana cuando el detector es implantado en los tejidos subcutáneos.

45

50

55

60

65

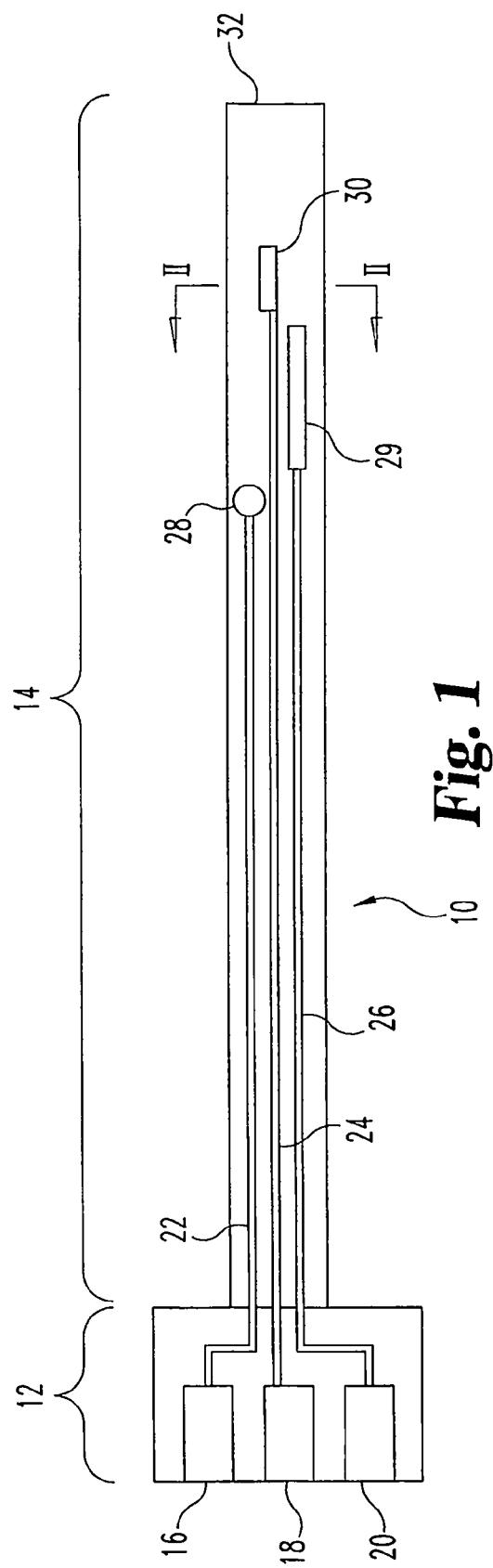


Fig. 2A

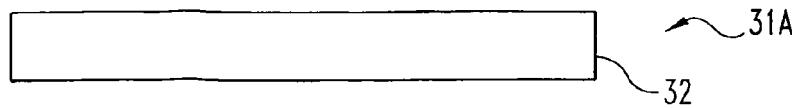


Fig. 2B

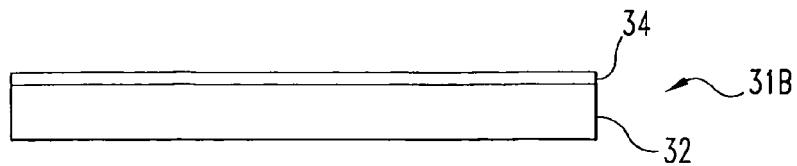


Fig. 2C

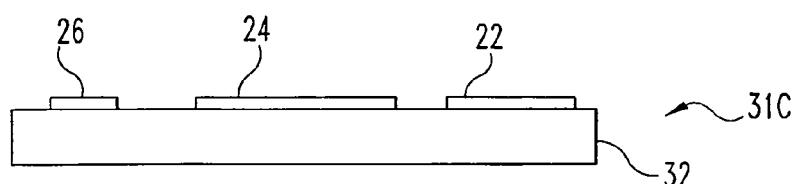


Fig. 2D

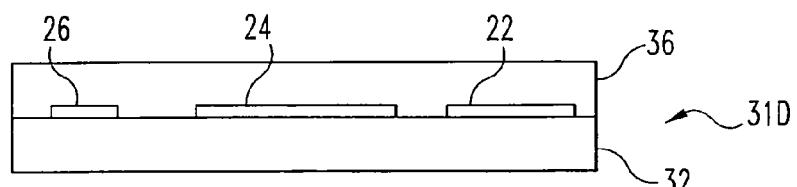


Fig. 2E

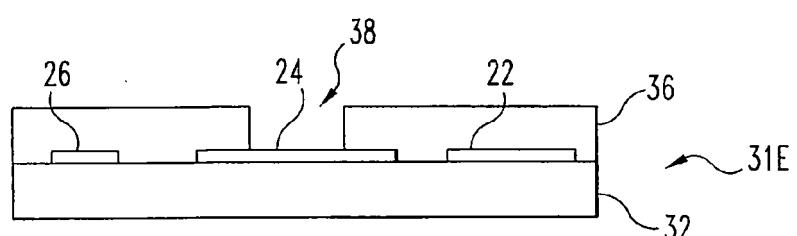


Fig. 2F

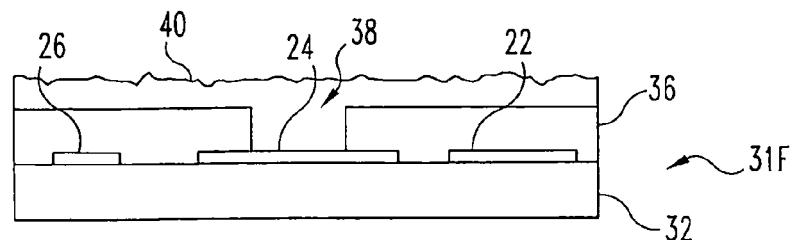


Fig. 2G

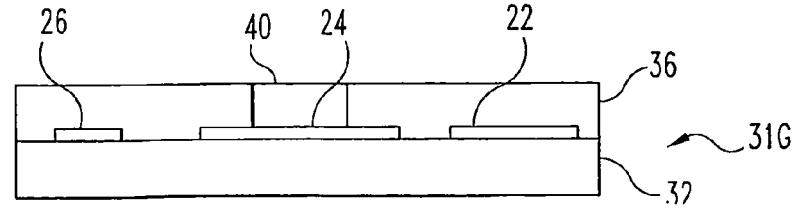
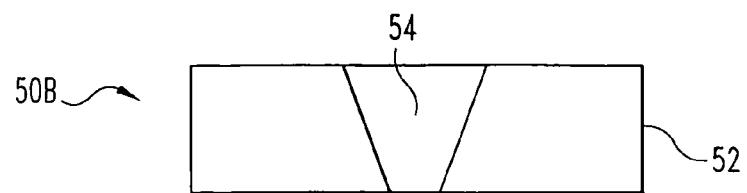
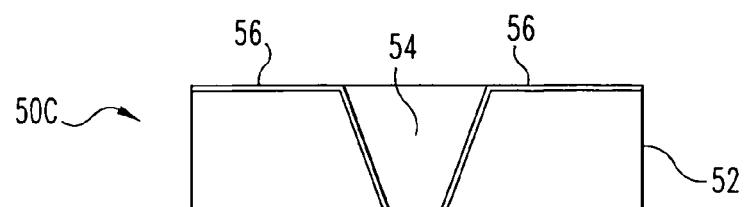
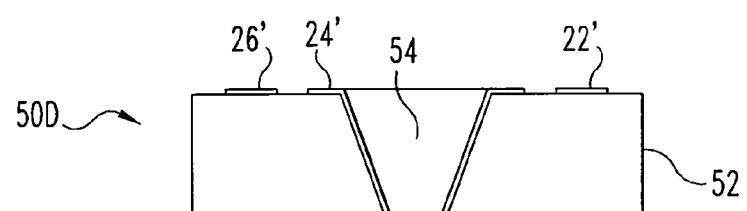
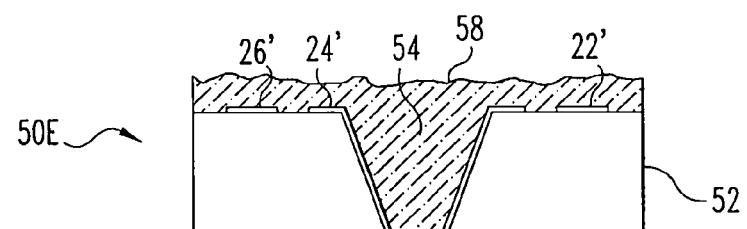
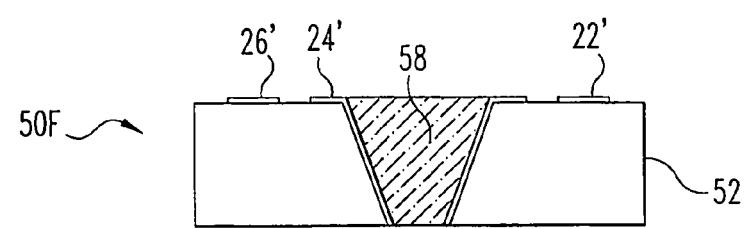
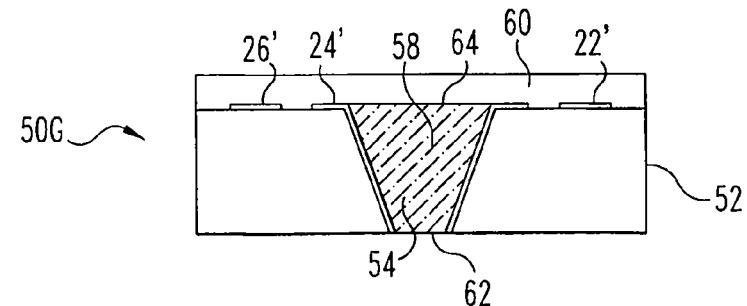


Fig. 3A**Fig. 3B****Fig. 3C****Fig. 3D****Fig. 3E****Fig. 3F****Fig. 3G**

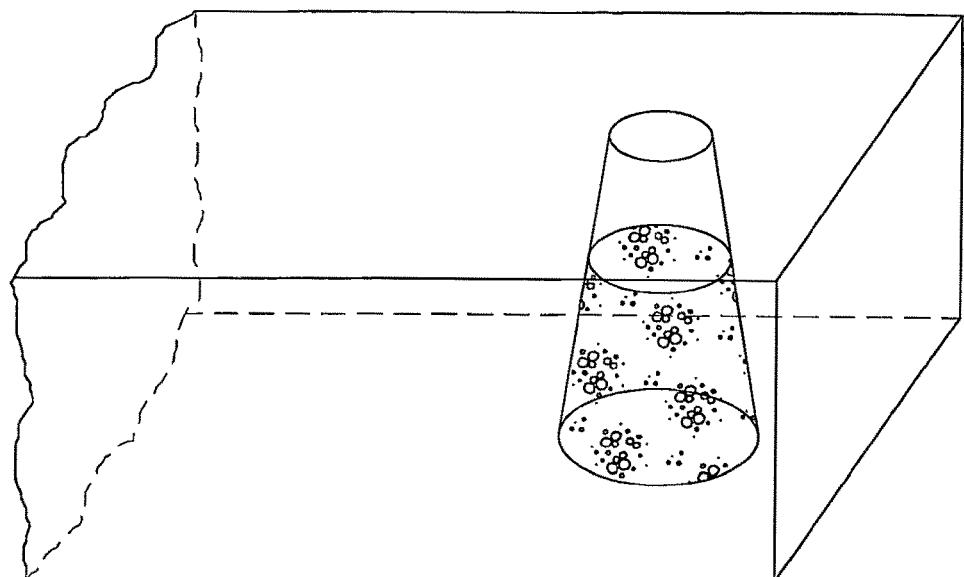


Fig. 4

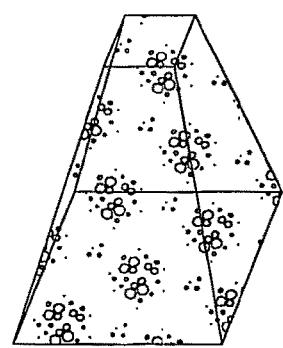


Fig. 5

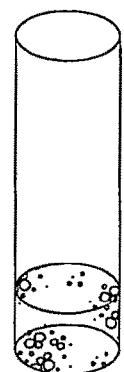


Fig. 6

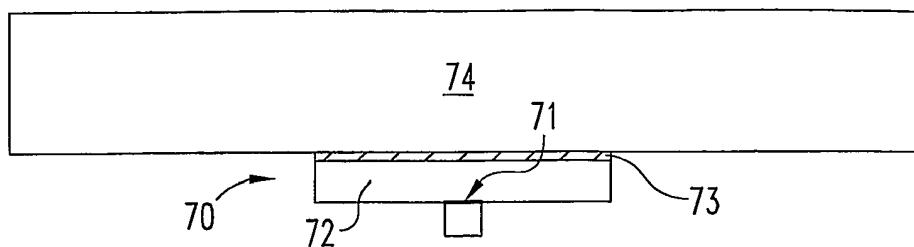


Fig. 7

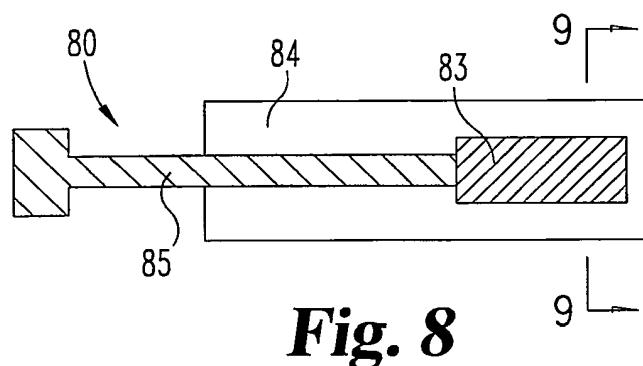


Fig. 8

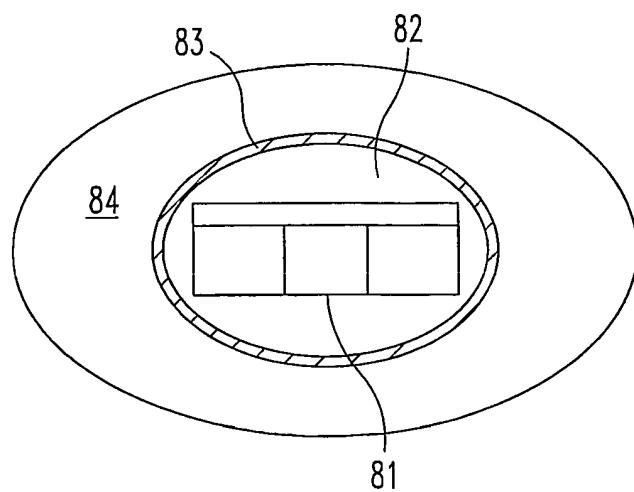


Fig. 9

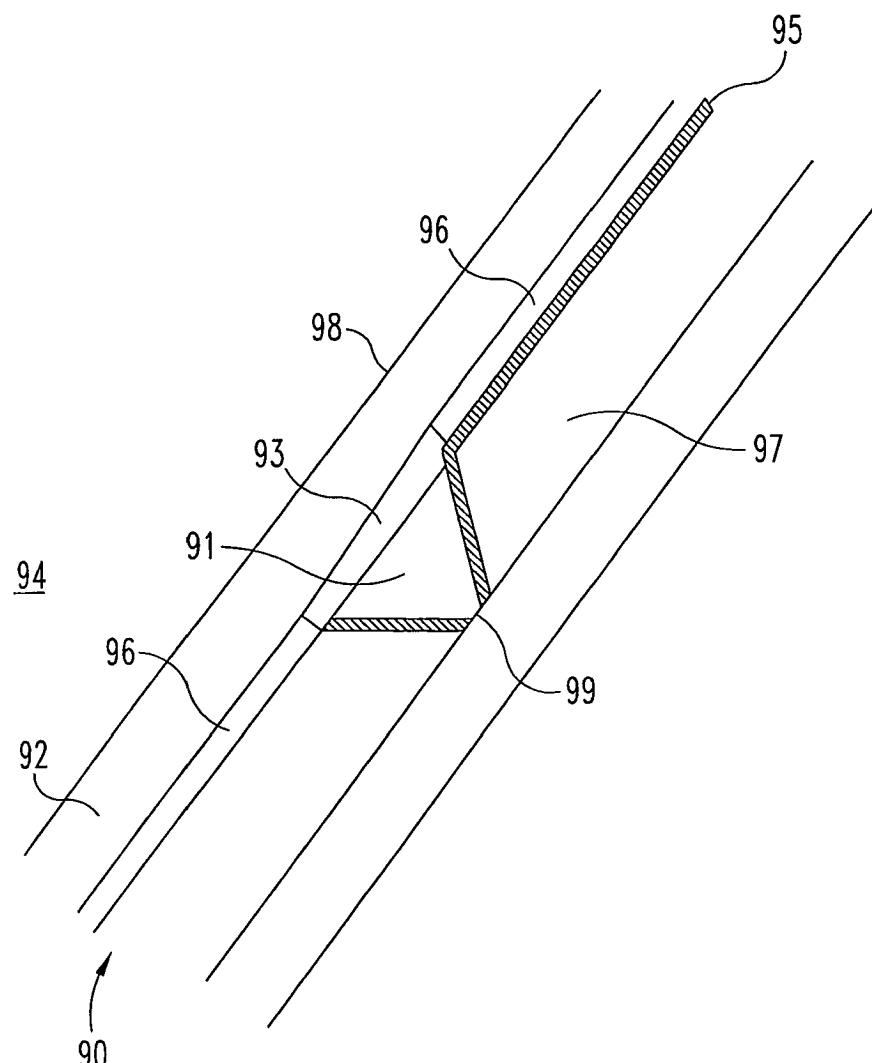


Fig. 10