



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 260 T2 2005.08.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 778 897 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 260.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/11137**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 931 676.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/006947**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.03.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.06.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.08.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/54**

**C12Q 1/00, C12Q 1/26, G01N 33/48,
G01N 33/20, G01N 25/18, G01N 27/00,
G01N 27/327**

(30) Unionspriorität:
299526 01.09.1994 US

(73) Patentinhaber:
Therasense, Inc., Alameda, Calif., US

(74) Vertreter:
Andrae Flach Haug, 81541 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI

(72) Erfinder:
**Heller, Adam, Austin, US; Pishko, Michael V.,
Austin, US**

(54) Bezeichnung: **SUBKUTANE GLUCOSE-ELEKTRODE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft In-vivo-Enzym-Biosensoren, genauer gesagt Miniatur-Glucosesensoren mit Einpunkt-Kalibrierung für die subkutane Glucosemessung.

HINTERGRUND

[0002] Vor dem Hintergrund der Notwendigkeit einer häufigen oder kontinuierlichen In-vivo-Überwachung der Glucose bei Diabetikern, insbesondere mit Brittle-Diabetes, wurden verschiedene mögliche In-vivo-Glucoseelektroden untersucht. Zu den erwünschten Eigenschaften dieser Elektroden gehören die Sicherheit, die klinische Messgenauigkeit und Zuverlässigkeit, die Möglichkeit einer Rekalibrierung in vivo, die Stabilität über wenigstens eine Krankenhausschicht von 8 Stunden, die geringe Größe, die Einfachheit der Einführung und Entfernung und die ausreichend schnelle Ansprechzeit, damit eine rechtzeitige Intervention möglich ist. Die Rekalibrierung in vivo sollte auf der Entnahme von nur einer Körperflüssigkeitsprobe, z.B. von Blut, und der Messung ihrer Glucosekonzentration beruhen. Das wird als „Einpunkt-Kalibrierung“ bezeichnet.

[0003] Schlüsselfaktoren bezüglich der Sicherheit sind das Fehlen auslaugbarer Komponenten, die Biokompatibilität und die Limitierung der potentiell gefährlichen Fremdschubstanz, die in den Körper eingebracht wird, auf eine Menge, die auch im schlimmsten denkbaren Fall keine Folgen hat. Die klinische Messgenauigkeit muss derart sein, dass auch, wenn die Messwerte am wenigsten korrekt sind, die klinischen Entscheidungen, die auf ihnen beruhen, immer noch richtig sind. Die Möglichkeit der schnellen Bestätigung der richtigen Funktion der Sensoren und der periodischen Rekalibrierung in vivo ist von essentieller Wichtigkeit, wenn ein Arzt es zulassen soll, dass die Behandlung eines Patienten von den Messungen des Sensors abhängt. Diese Einpunkt-Kalibrierung, die darauf beruht, dass das Signal bei einer Glucosekonzentration von Null gleich Null ist, und bei der die Konzentration der Blutglucose nur zu einem Zeitpunkt gleichzeitig mit dem Signal gemessen wird, ist von essentieller Bedeutung, war aber bis jetzt nicht erreichbar. Die Empfindlichkeit muss genügend stabil sein, damit die erforderliche Rekalibrierung in vivo nicht zu häufig erfolgen muss. Der Sensor muss so klein sein, dass er ohne größere Beschwerden für den Patienten eingeführt und entfernt werden kann, und dass es dabei nur zu minimalen Gewebeschäden kommt. Es wird bevorzugt, dass der Sensor subkutan liegt, und dass er vom Patienten oder von den Helfern in einer Arztpraxis eingeführt und entfernt wird. Schließlich muss seine Ansprechzeit schnell genug sein, so dass korrigierende Maßnahmen, wenn sie erforderlich sind, rechtzeitig erfolgen können.

[0004] Als Reaktion auf einige dieser Erfordernisse wurden Sensoren vom Nadeltyp sowie andere subkutane, amperometrische Sensoren in Betracht gezogen. Die Mehrzahl von diesen setzte Platin-Iridium oder Platinschwarz ein, um das H_2O_2 , das bei der von der Glucoseoxidase (GOX) katalysierten Reaktion von Glucose mit Sauerstoff erzeugt wird, elektrisch zu oxidieren. Bei diesen Sensoren lag die GOX üblicherweise in großem Überschuss und immobilisiert vor, häufig über eine Vernetzung mit Albumin und Glutaraldehyd. Um elektrisch oxidierbare Störsubstanzen auszuschließen wurden Membranen aus Celluloseacetat und sulfonierten Polymeren, einschließlich von NafionTM, eingesetzt (siehe z.B. Sensors and Actuators B1 (1990), 561-564). Besondere Aufmerksamkeit wurde auf den Ausschluss der am weitesten verbreiteten elektrisch oxidierbaren Störstoffe gerichtet: Ascorbat, Urat und Acetaminophen. Um die Störstoffe in den Griff zu bekommen wurden auch differentielle Messungen mit zwei Elektroden durchgeführt, wobei die eine Elektrode für Glucose und elektrisch oxidierbare Störstoffe empfindlich war und die andere lediglich für die Störstoffe. Eine Strategie für die Überwindung des Problems der Störstoffe, die auch auf die vorliegende Erfindung anwendbar ist, beinhaltet ihre Voroxidation. Eine weitere Strategie beinhaltet das Verschieben des Redoxpotentials des Polymers in der Sensorschicht in Richtung stärker reduzierender Potentiale über chemische Veränderungen. Wenn das Redoxpotential des Polymers im Bereich zwischen ungefähr $-0,15$ V und $+0,15$ V gegenüber der Standard-Kalomel-Elektrode (SKE) liegt und sich die Elektroden bei ihrem Betrieb in vivo zwischen ungefähr $-0,10$ und $+0,25$ V im Gleichgewicht befinden, dann ist die Geschwindigkeit der elektrischen Oxidation von Störstoffen wie Ascorbat, Urat und Acetaminophen im Vergleich zu derjenigen von Glucose über deren gesamten physiologischen Konzentrationsbereich sehr langsam. Somit sind auch die Ströme aus der elektrischen Oxidation von Störstoffen im Vergleich zu denjenigen der Glucose klein.

[0005] Um die Elektroden biokompatibler zu machen wurden hydrophile Membranen aus Polyurethanen, Poly(vinylalkohol) und Poly-HEMA verwendet.

[0006] Verschiedene Forscher testeten Glucosesensoren auf GOX-Basis in vivo und erzielten akzeptable Er-

gebnisse bei Ratten, Kaninchen, Hunden, Schweinen, Schafen und beim Menschen. Diese Studien validierten das subkutane Gewebe als einen akzeptablen Ort für eine Glucosemessung. Es wurde eine gute Korrelation zwischen den intravaskulären und den subkutanen Glucosekonzentrationen beobachtet. Sie zeigten auch die Notwendigkeit einer Sensorkalibrierung in vivo. Ein anderer Ansatz zur Glucoseüberwachung in vivo basierte auf der Kopplung einer subkutanen Mikrodialyse mit einem elektrochemischen Nachweis. Um den linearen Ansprechbereich zu kontrollieren und zu justieren wurden Elektroden diffusionslimitiert bezüglich der Glucose gemacht, üblicherweise durch Membranen, die den Glucosetransport beschränken.

[0007] Diffusionsmediatoren, durch die die Abhängigkeit der Signale vom O_2 -Partialdruck vermindert wird, werden aus den Sensoren ausgelaugt. Durch dieses Auslaugen gelangt eine unerwünschte Chemikalie in den Körper, und es kommt auch zu einer Abnahme der Empfindlichkeit, insbesondere bei kleinen Sensoren. Bei Mikrosensoren, bei denen die nach außen gerichtete Diffusion des Mediators radial erfolgt, nimmt die Empfindlichkeit schnell ab. Dieses Problem wurde bei „verdrahteten“ Enzymelektroden überwunden, d.h. Elektroden, die durch das Verbinden von Enzymen mit Elektroden über vernetzte elektronenleitende Redox-Hydrogele („Drähte“) hergestellt werden. Die Glucoseoxidase ist mit Polyelektrolyten „verdrahtet“ worden, die ihrem Rückgrat elektronenübertragende $[Os(bpy)_2Cl]^{+/2+}$ -Redoxzentren enthalten.

[0008] Die Hydrogele wurden beim Vernetzen des Enzyms und seiner Verdrahtung auf Elektroden gebildet. Diese Elektroden hatten hohe Stromdichten und wurden bei einem Potential von 0,3V gegenüber der SKE betrieben. Die elektrisch oxidierbaren Störstoffe werden über eine Peroxidase-katalysierte Voroxidation in einer zweiten, nicht verdrahteten, Wasserstoffperoxid-erzeugenden Schicht auf der „verdrahteten“ Enzymelektrode eliminiert.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Es ist eine kleine (z.B. 0,29 mm), mit einer Aussparung versehene, aus einem nicht korrodierenden Metall (z.B. Gold, Platin, Palladium) oder aus Kohlenstoff bestehende Drahtelektrode für die subkutane In-vivo-Überwachung der Glucose hergestellt worden, wobei die Elektrode, was ihre Leistungsfähigkeit angeht, alle oben genannten Anforderungen erfüllt, einschließlich einer Einpunkt-Kalibrierung in vivo. Die Elektrode wurde durch das Aufbringen von aktiven Polymerschichten in eine Aussparung erzeugt, die durch das Wegätzen von Gold aus einem isolierten Golddraht gebildet wurde.

[0010] Die aktiven Polymerschichten, zu denen eine Sensorschicht, eine den Glucosefluss begrenzende Schicht, eine biokompatible Schicht und gegebenenfalls eine Schicht, die mit Hilfe von Peroxidase Störstoffe eliminiert, gehören, wurden in der Aussparung vor einer mechanischen Schädigung geschützt. (Die Schicht, die mittels der Peroxidase Störstoffe eliminiert, ist nicht erforderlich, wenn ein Polymer mit einem niedrigeren Redoxpotential eingesetzt wird, wie oben beschrieben wurde.) Die Aussparung und ihre Polymerschichten verminderten auch den Transport von Glucose zu der mit der Drahtelektrode in Kontakt stehenden Sensorschicht.

[0011] Durch die Begrenzung des Glucoseflusses wurde der gewünschte lineare Ansprechbereich, der den klinisch relevanten Konzentrationsbereich der Glucose abdeckt, erhalten. Die erfindungsgemäßen Biosensoren sind imstande, z.B. ungefähr 2 – 30 mμ Glucose und ungefähr 0,5 – 10 mμ Lactat in vivo genau zu messen. Der Sensor enthält keine auslaugbaren Komponenten, und seine vier vernetzten Polymerschichten enthalten nur ungefähr 5 μg an immobilisiertem Material und nur wenige Nanogramm an Polymer-gebundenem Osmium. Die Voroxidation der Störstoffe in einer der vier Schichten macht eine Einpunkt-Kalibrierung des Sensors in vivo möglich.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0012] [Fig. 1](#) ist eine schematische Zeichnung einer erfindungsgemäßen Elektrode.

[0013] [Fig. 2](#) ist eine graphische Darstellung von Daten, die beim Vergleich der Stromdichten bei der elektrischen Oxidation von Glucose an Elektroden, die mit PVI_5 -Os (offene Dreiecke) hergestellt wurden, und an Elektroden, die mit PVI_3 -Os (ausgefüllte Dreiecke) hergestellt wurden, erhalten wurden.

[0014] [Fig. 3](#) ist eine graphische Darstellung von Daten, die beim Vergleich der Abhängigkeit des Stromes, der in der Tiefe der Aussparung erzeugt wurde, erhalten wurden.

[0015] [Fig. 4](#) ist eine graphische Darstellung von Daten, die beim Vergleich der Abhängigkeit des Verhältnisses des erzeugten Stromes und der Ladung, die für die elektrische Reduktion oder Oxidation der Redoxzentren

des Polymers in der Sensorschicht benötigt wurden, von der Dicke der Sensorschicht erhalten wurden.

[0016] [Fig. 5](#) ist eine graphische Darstellung von Daten, die beim Vergleich der Variation des Stromes, der durch Elektroden mit Sensorschichten unterschiedlicher Dicke und mit diffusionsbegrenzenden Schichten unterschiedlicher Zusammensetzungen und Dicken erzeugt wurde, erhalten wurden. Ausgefüllte Kreise: 7,5 µm dicke Sensorschicht aus PVI₅-Os (52 %), rGOX (35 %), PEGDGE (13 %), beschichtet mit 4 µm PAL/PAZ (Verhältnis 1 : 1); offene Kreise: 5,0 µm Sensorschicht; ausgefüllte Dreiecke: 12,5 µm Sensorschicht und 7 µm PAL/PAZ (Verhältnis 1 : 2); offene Dreiecke: 7,5 µm Sensorschicht und 4,5 µm PAL/PAZ (Verhältnis 1 : 2).

[0017] [Fig. 6](#) ist eine graphische Darstellung von Daten, die beim Vergleich der Abhängigkeit des Stromes, der in Gegenwart von Ascorbat und in Abwesenheit und Anwesenheit von Lactat und Glucose erzeugt wurde, erhalten wurden. Die Konzentrationen von Ascorbat (A), Lactat (L) und Glucose (G) sind angegeben. Ascorbat ist ein elektrisch oxidierbarer Störstoff. Bei der Zugabe von Lactat wird der Strom seiner elektrischen Oxidation unterdrückt, während derjenige von Glucose nicht unterdrückt wird.

[0018] [Fig. 7](#) ist eine graphische Darstellung von Daten, die die Stromdichte und die entsprechende subkutane Glucosekonzentration zeigen, die mit den erfindungsgemäßen subkutan implantierten Elektroden in einem Ratten-Tiermodell gemessen wurden. Die großen ausgefüllten Kreise zeigen die Blutglucose-Konzentrationen, die in Proben von abgenommenem Blut mittels eines YSI-Analysators gemessen wurden.

[0019] [Fig. 8](#) ist ein klinisches Error-Grid nach Clarke, mit Hilfe dessen die klinische Relevanz der Messungen der Blutglucose aus [Fig. 7](#) analysiert wurde.

[0020] [Fig. 9](#) ist ein klinisches Error-Grid nach Clarke mit allen möglichen Korrelationen, die erhalten wurden, wenn alle der 24 Glucose-Analysen aus der [Fig. 7](#) für eine Einpunkt-Kalibrierung der einzelnen implantierten Elektroden verwendet wurden.

[0021] [Fig. 10](#) ist ein klinisches Error-Grid nach Clarke, mit Hilfe dessen die Verbesserung der Einpunkt-Kalibrierung durch redundante Elektroden getestet wurde, deren Messwerte innerhalb der Standardabweichungen lagen, die für alle Unterschiede zwischen den simultan ermittelten Messwerten eines Paares implantierter Elektroden berechnet wurden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0022] Die vorliegende Erfindung umfasst einen kleinen (Außendurchmesser z.B. 290 µm) subkutanen Glucosesensor auf der Basis eines isolierten Drahtes aus einem nicht korrodierenden, leitfähigen Metall (z.B. Gold, Platin, Palladium) oder aus Kohlenstoff, wobei der Sensor eine Einpunkt-Kalibrierung in vivo ermöglicht. Wie in der [Fig. 1](#) gezeigt ist, beinhaltet seine Konstruktion das Beschichten eines kleinen (Durchmesser z.B. 250 µm) Drahtes **2** aus einem nicht korrodierenden Metall oder aus Kohlenstoff mit einem elektrisch isolierenden Material **4**, z.B. einem Polyimid, und das Aufbringen der folgenden aktiven Polymerschichten in einer Aussparung **6**, die durch das Ätzen oder Entfernen eines Teils des Metalls oder Kohlenstoffs gebildet wurde: einer immobilisierten „verdrahteten“ Glucoseoxidase-Schicht **8**; einer elektrisch isolierenden und die Glucosediffusion limitierenden Schicht **10**, die zum Beispiel durch das Vernetzen eines Polylallylamins (PAL) mit einem Polyaziridin (PAZ) gebildet wird; gegebenenfalls einer Störstoffe-eliminierenden Schicht **12**, z.B. aus vernetzter Meerrettichperoxidase und Lactatoxidase; und eines biokompatiblen Films **14**, z. B. aus Poly(ethylenoxid) (PEO), das so derivatisiert ist, dass seine Photovernetzung ermöglicht wird. Der Außendurchmesser a des Drahtes **2** liegt vorzugsweise bei ungefähr 0,25 mm oder darunter, und der Außendurchmesser b des isolierten Drahtes liegt vorzugsweise bei ungefähr 0,3 mm oder darunter. Die Aussparung **6** in der isolierten Elektrode erstreckt sich von der Spitze **16** der Elektrode, die offen gegenüber der Umgebung ist, bis zur Oberseite **18** des Drahtes **2** in der isolierenden Hülle, und zwar üblicherweise über eine Länge c von weniger als ungefähr 0,150 mm, und vorzugsweise von ungefähr 0,125 mm.

[0023] Die Elektroden enthalten keine auslaugbaren Komponenten. Die Gesamtmenge an Polymeren und Enzymen liegt vorzugsweise bei ungefähr 5 µg. Das Ansprechen auf Glucose über den physiologisch relevanten Konzentrationsbereich von 2–20 mM ist angenähert linear. Die Elektroden sprechen wenigstens ungefähr 26 Stunden lang nicht auf Ascorbat, Urat oder Acetaminophenol an. Ihre 10–90 %-Ansprechzeit liegt bei 2 mM Glucose bei ungefähr 90 Sekunden und bei 20 mM Glucose bei ungefähr 30 Sekunden. Ihre Empfindlichkeit ist nach einer 30-minütigen Äquilibration bei 37°C in 10 mM Glucose ungefähr 72 Stunden lang stabil, wobei der Strom um weniger als ± 5 % vom Mittelwert abweicht. Die Elektroden haben im wesentlichen kein Ausgangssignal, z.B. Strom, Ladung oder Potential, wenn die Konzentration des Analyten, der gemessen werden

soll, Null beträgt.

[0024] Zwei Elektroden, die einer Ratte subkutan implantiert wurden, verfolgten die Blutglucosespiegel, und ihre absolute, nicht korrigierte Stromabgabe war der Blutglucose-Konzentration proportional. Die Analyse der Korrelation zwischen den Blutglucosespiegeln in der Schwanzvene und der Stromabgabe der Sensoren im subkutanen Bereich des Thorax und zwischen den Schulterblättern derselben Ratte zeigte, dass sogar dann, wenn sich die untersuchten Orte und Organe extrem unterschieden, die Einpunkt-Kalibrierung in vivo valide war. Die Analyse zeigte auch den Wert einer Implantation redundanter Sensoren. Wenn klinische Entscheidungen auf der Basis der Messwerte von einzelnen Sensoren erfolgt wären, die an einem Punkt kalibriert wurden, dann wären 94 % klinisch korrekt gewesen. Durch die Verwendung redundanter Sensoren und die Akzeptierung nur solcher Ablesepaare, die innerhalb einer Standardabweichung lagen, wurde der Prozentsatz der klinisch korrekten Entscheidungen auf 99 % erhöht.

[0025] Es versteht sich, dass ein Fachmann auf diesem Gebiet verschiedene Komponenten des oben beschriebenen Biosensors durch bekannte Materialien ersetzen kann, um unter Einsatz der hier umrissenen Prinzipien einen modifizierten Biosensor zu erhalten. Zum Beispiel kann man sich die folgenden Ersetzungen vorstellen:

[0026] Basiselektrode: Die Basiselektrode des erfindungsgemäßen Sensors kann aus einem Draht aus einem nicht korrodierenden Metall oder aus Kohlenstoff, zum Beispiel aus glasartigem Kohlenstoff, Graphit, Platin, Palladium oder Gold hergestellt werden. Gold wird bevorzugt, und es wird in den folgenden veranschaulichenden Beispielen der Erfindung verwendet.

[0027] Isolator: Der leitfähige Draht aus Metall oder Kohlenstoff wird mit einem elektrisch isolierenden Material beschichtet, das auch eine Wand um die Aussparung bildet, die die aktiven polymeren Komponenten enthält. Das isolierende Material kann z.B. Polyurethan, Teflon (fluorierte Polymere), Polyethylenterephthalat (PET, Dacron) oder Polyimid sein. Das isolierende Material ist vorzugsweise ein biokompatibles Polymer, das weniger als ungefähr 5 % Wasser enthält, wenn es sich im Gleichgewicht mit physiologischen Körperflüssigkeiten, z.B. subkutanem Gewebe, befindet.

[0028] Aussparung: Im Allgemeinen hat die Aussparung an der Spitze der Elektrode eine Länge von ungefähr 20 bis 150 µm, und vorzugsweise von ungefähr 50 bis 125 µm.

[0029] Ätzverfahren: Das hier beschriebene Verfahren zur Ätzung des Metalls aus der Spitze der Elektrode kann Chlorid, Bromid oder Iodid im Bad anstelle von Cyanid, wie es beschrieben wird, einsetzen. Bromid wird bevorzugt, da es weniger toxisch ist, und AuBr_4^- ist, wie $\text{Au}(\text{CN})_2^-$, ein wasserlösliches Anion. Somit kann in wässriger HBr das Metall, z.B. Gold, durch das Anlegen eines ausreichend oxidierenden Potentials geätzt werden, durch das das Gold elektrolytisch aufgelöst wird:



[0030] Verdrahtete Enzymschicht: In der das Enzym enthaltenden Sensorschicht kann die Glucoseoxidase für die Messung anderer relevanter klinischer Verbindungen durch andere Redoxenzyme ersetzt werden. Zum Beispiel kann die Lactatoxidase für den In-vivo-Nachweis von Lactat verwendet werden, was wichtig für die Bestimmung ist, ob ein Organ in ausreichendem Maße durch das Blut mit Sauerstoff versorgt wird.

[0031] Nützliche Redox-Polymere und Verfahren zur Herstellung der Sensorschicht werden zum Beispiel in den US-Patenten Nr. 5 264 104, 5 264 105, 5 262 035, 5 320 725 und 5 356 786 (veröffentlicht am 18.10.1994) beschrieben. Zu weiteren Redox-Polymeren gehören z.B. Poly(1-vinylimidazol), Poly(4-vinylpyridin) oder Copolymere von 1-Vinylimidazol, wie Poly(acrylamid-co-1-vinylimidazol), wobei das Imidazol oder Pyridin einen Komplex mit $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{+/2+}$, $[\text{Os}(4,4'\text{-Dimethylbipyridin})_2\text{Cl}]^{+/2+}$, $[\text{Os}(4,4'\text{-Dimethylphenanthrolin})_2\text{Cl}]^{+/2+}$, $[\text{Os}(4,4'\text{-Dimethoxyphenanthrolin})_2\text{Cl}]^{+/2+}$ und $(\text{Os}(4,4'\text{-Dimethoxybipyridin})_2\text{Cl})^{+/2+}$ über Imidazol-Ringe bildet. Die Imidazolring-Verbindungen werden bevorzugt, da ihre Komplexe stärker reduzierende Redoxpotentiale aufweisen, d.h. solche, die näher am Potential der SKE liegen. Bei diesen stärker reduzierenden Potentialen sind die Geschwindigkeit der elektrischen Oxidation von Störstoffen und der dadurch erzeugten Strom.

[0032] Sperrschicht: Die polymere Sperrschicht ist elektrisch isolierend und begrenzt die Diffusion von Glucose durch die Sensorschicht. Sie kann z.B. durch das Vernetzen eines Polyallylamins (PAL) mit einem Polyaziridin (PAZ) gebildet werden. Alternativ kann PAL vollständig oder teilweise durch ein zwitterionisches Polymer, das durch das Quaternieren von Poly(vinylpyridin) mit Bromacetat und das Dialysieren gegen 0,15 M

NaCl erhalten wird, oder durch ein Polyanion, wie eine Polysulfonsäure, ersetzt werden.

[0033] Die Sperrschicht kann ein polyanionisches Polymer enthalten, in dem die Geschwindigkeit des Durchtritts anionischer Störstoffe, wie Ascorbat und Urat, verlangsamt ist. Diese Schicht kann auch ein Polykation enthalten, das die Retention des Polyanions über elektrostatische Bindungen erhöht und die Benetzung der biokompatiblen Schicht verbessert.

[0034] Störstoffe eliminierende Schicht: Wie oben beschrieben wurde, ist diese Schicht insofern optional, als sie nicht erforderlich ist, wenn ein Redox-Polymer mit einem stärker reduzierenden Potential verwendet wird, wie PVI₁₅-dmeOs (Ohara et al., Analytical Chemistry, 1994, 64: 2451-2457). Bei Arbeitspotentialen von ungefähr -0,10 bis +0,25 für den Glucose-Biosensor ist die Geschwindigkeit der elektrischen Oxidation von Störstoffen, wie Ascorbat, Urat und Acetaminophen, im Vergleich zu derjenigen von Glucose über ihren physiologischen Konzentrationsbereich sehr langsam.

[0035] Wenn eine separate Störstoffe eliminierende Schicht verwendet wird, dann enthält sie vorzugsweise ein Peroxidase-Enzym, das voraktiviert sein kann, es aber nicht sein muss. Derartige Störstoffe eliminierende Schichten werden zum Beispiel im US-Patent Nr. 5 356 786 (veröffentlicht am 18.10.1994) offenbart, das die Struktur und Funktion Störstoffe eliminierender Biosensoren offenbart. Am. Chem. 1994, 66, 3131-3138, veröffentlicht am 1.10.1994, beschreibt einen Sensor gemäß der vorliegenden Erfindung. Der Glucose-Biosensor enthält vorzugsweise Lactatoxidase (LOX) in Kombination mit Peroxidase in der Störstoffe eliminierenden Schicht. Jedoch würde bei Biosensoren, die für den Nachweis von Lactat verwendet werden, Glucoseoxidase mit der Peroxidase eingesetzt. Auf ähnliche Weise kann die Enzymzusammensetzung der Störstoffe eliminierenden Schicht für eine spezifische Funktion verändert werden.

[0036] Biokompatible Schicht: Im Allgemeinen umfasst die biokompatible Schicht Hydrogele, z.B. polymere Zusammensetzungen, die mehr als ungefähr 20 Gew.-% Wasser enthalten, wenn sie sich im Gleichgewicht mit einer physiologischen Umgebung, wie lebendem Gewebe oder Blut, befinden. Ein Beispiel ist vernetztes Poly(ethylenoxid), z.B. Poly(ethylenoxid)tetraacrylat. Die polymeren Zusammensetzungen müssen untoxisch und mit lebenden Systemen kompatibel sein.

[0037] Verfahren zur Herstellung mehrschichtiger, mit einer Aussparung versehener Biosensoren: Isolierte Drähte aus einem nicht korrodierenden Metall oder aus Kohlenstoff, die wie oben beschrieben so geätzt wurden, dass sie an der Spitze eine Aussparung enthalten, werden in einen Block gegeben, der als ein XY-Positionierer dient. Die Drähte gehen vertikal durch den Block und werden z.B. durch Druck an Ort und Stelle gehalten. Die Blöcke mit den Drähten können aus Elementen gebildet werden, wobei jedes Element mehrere Kerben von halbzyklindrischer Form, die vertikal verlaufen, enthält. Die Drähte werden in diesen Kerben angeordnet, und die Elemente werden mittels Schrauben zum Block zusammengebaut. Zum Beispiel kann der Block aus Aluminium mit gleichmäßig angeordneten Löchern (900 für einen 30 × 30-Array von Drähten) bestehen, wobei jedes Loch einen Draht enthält. Der Block wird unter einer fest angeordneten Mikrodüse angeordnet, die eine Flüssigkeit in die Aussparung des isolierten Drahtes abgibt.

[0038] Um die Abhängigkeit von einer genauen Anordnung des Blockes und der Mikrodüse zu reduzieren, ist die Düse elektrisch geladen, wobei der Draht die entgegengesetzte Ladung hat, oder der Draht ist geerdet oder hat wenigstens ein solches Potential, dass eine Potentialdifferenz zwischen der Düse und dem Draht besteht. Da die Düse geladen ist, sind die Mikrotröpfchen, die sie ausstößt, ebenfalls mit dem gleichen Ladungstyp (positiv oder negativ) wie die Düse geladen. Je höher das Potential der Düse ist (z.B. gegenüber dem Erdpotential), desto höher ist die Ladung auf den ausgestoßenen Mikrotröpfchen. Wenn sich die Spitze des Drahtes, der beschichtet werden soll, beim Erdpotential befindet oder eine Ladung des entgegengesetzten Typs trägt, dann werden die geladenen Mikrotröpfchen in die Aussparung geleitet und lagern sich auf der Elektrode ab, sogar wenn der Strom der Mikrotröpfchen nicht vertikal verläuft, d.h., sogar wenn die Mikrodüse nicht genau oberhalb der Spitze des Drahtes angeordnet ist.

[0039] Je höher das elektrische Potential der Düse (relativ zur Erde) ist, desto größer ist weiterhin die Ladung der ausgestoßenen Mikrotröpfchen. Wenn die Ladung hoch genug ist, zerbricht das Tröpfchen aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Ladungen auf dem Tröpfchen in zwei oder mehrere kleinere Tröpfchen. Somit „treiben“ (treiben bedeutet dabei einen durch ein elektrisches Feld unterstützten Transport) die sehr kleinen Tröpfchen alle zu der mit der Aussparung versehenen Elektrodenoberfläche und werden auf ihr gesammelt, sogar wenn sie aus einer Düse kommen, die nicht exakt bezüglich der Elektrode ausgerichtet ist.

[0040] Dieses Beschichtungsverfahren ist für die Herstellung eines beliebigen kleinen Biosensors nützlich,

nicht nur derjenigen in Zonen mit Aussparungen.

Klinischer Einsatz der Biosensoren mit der Aussparung:

[0041] Die erfindungsgemäßen Biosensoren mit der Aussparung haben eine ausreichende Empfindlichkeit und Stabilität, um als sehr kleine subkutane Biosensoren für die Messung klinisch relevanter Verbindungen, wie Glucose und Lactat, eingesetzt werden zu können. Die Elektroden messen akkurat Glucose im Bereich von ungefähr 2 – 30 μM und Lactat im Bereich von ungefähr 0,5 – 10 mM. Eine Funktion des implantierten Biosensors besteht darin, einen Alarmton auszulösen, wenn z.B. die Glucosekonzentration bei einem Patienten zu niedrig oder zu hoch ist. Wenn Paare implantierter Elektroden verwendet werden, gibt es drei Situationen, in denen ein Alarm ausgelöst wird: eine niedrige Glucosekonzentration, eine hohe Glucosekonzentration und eine Fehlfunktion des Sensors, die anhand einer Diskrepanz innerhalb der Messwertpaare der beiden Sensoren festgestellt wird. Eine Diskrepanz, die für die Auslösung des Alarms ausreicht, kann z.B. bei einem Wert vom über 2- oder 3-fachen der Standardabweichung liegen, der über einen definierten Zeitraum, z.B. nicht weniger als 10 Minuten, besteht. Ein derartiges System kann für schlafende Patienten nützlich sein und auch für Notfall- und Intensivstationen in Krankenhäusern, wo lebenswichtige Funktionen kontinuierlich verfolgt werden.

[0042] Eine weitere Funktion der erfindungsgemäßen Biosensoren besteht darin, Diabetikern dabei zu helfen, ihre Blutglucosespiegel ungefähr im Normalbereich zu halten. Viele Diabetiker halten derzeit ihre Blutglucosespiegel auf einem höheren Wert als dem Normalwert, und zwar aus Angst vor einem Koma und dem Tod in schwerer Hypoglykämie. Das Aufrechterhalten von Blutglucosespiegeln, die wesentlich, zum Beispiel um ungefähr 40 % oder mehr, über dem Normalwert liegen, führt jedoch zur Retinopathie und Blindheit sowie zum Nierenversagen. Der Einsatz subkutaner Biosensoren für eine häufige, wenn nicht kontinuierliche Verfolgung von Glucosekonzentrationen ist erstrebenswert, damit die Glucosekonzentrationen näher beim optimalen Spiegel gehalten werden können.

[0043] Die subkutanen Biosensoren können dazu verwendet werden, die Geschwindigkeit des Ansteigens und des Abfallens der Glucosekonzentrationen nach einem Essen oder nach der Verabreichung von Glucose (z.B. bei einem Glucose-Toleranztest) zu messen. Die Sensoren sind auch in Rückkopplungsschleifen für eine automatische oder manuell gesteuerte Aufrechterhaltung von Glucosekonzentrationen in einem definierten Bereich nützlich. Wenn sie z.B. zusammen mit einer Insulinpumpe verwendet werden, wird eine bestimmte Menge Insulin durch die Pumpe abgegeben, wenn der Messwert des Glucosesensors über einem eingestellten Wert liegt.

[0044] Bei all diesen Anwendungen ist die Fähigkeit einer schnellen Bestätigung, dass der Messwert des implantierten Sensors richtig ist, essentiell. Eine schnelle Bestätigung und eine schnelle Rekalibrierung sind nur möglich, wenn eine Einpunkt-Kalibrierung valide ist. Im Allgemeinen erfordert eine Kalibrierung, auch wenn der Sensor über den relevanten Konzentrationsbereich linear anspricht, wenigstens zwei Blut- oder Flüssigkeitsproben, die dem Patienten zu Zeitpunkten, an denen sich die Glucosekonzentrationen unterscheiden, abgenommen werden. Es dauert üblicherweise mehrere Stunden, bis sich die Glucosekonzentration ausreichend ändert, so dass die richtige Funktion über eine Zweipunkt-Kalibrierung validiert werden kann. Die Fähigkeit zur Bestätigung und Rekalibrierung unter Einsatz nur eines Punktes ist somit ein äußerst erwünschtes Merkmal der vorliegenden Erfindung.

[0045] Es werden redundante Sensoren (z.B. wenigstens zwei) für die klinische Anwendung der subkutanen Biosensoren bevorzugt. Eine derartige Redundanz ermöglicht das Signalisieren eines Versagens von einem der Sensoren, indem ein Anstieg der Diskrepanz zwischen den Messwerten der Sensoren zu einem Zeitpunkt erkannt wird, z.B. wenn sie um mehr als zwei Standardabweichungen auseinander liegen. Die redundanten Sensoren können nahe zusammenliegend oder an entfernten Stellen implantiert werden.

[0046] Es wird bevorzugt, dass die Biosensoren im subkutanen Gewebe implantiert werden, um den Sensor relativ unauffällig zu machen, und an einer Stelle, an der sie nicht leicht verschoben werden können, z.B. beim Drehen oder beim Bewegen. Es wird auch bevorzugt, dass die Sensoren, wenn die Messungen nicht bezüglich der Temperatur korrigiert werden (was sie normalerweise werden), dort implantiert werden, wo sie sich wahrscheinlich bei Körpertemperatur befinden, z.B. in der Gegend um 37°C, und wo sie vorzugsweise von der Kleidung bedeckt sind. Zu passenden Stellen gehören der Unterleib, die Innenseite des Schenkels und der Arm.

[0047] Wir beschreiben hier zwar kontinuierliche Strommessungen zur Bestimmung der Glucose, aber die elektrische Messung, über die die Glucosekonzentration verfolgt wird, kann sowohl kontinuierlich als auch dis-

kontinuierlich erfolgen. Es kann eine Strommessung, eine Potentialmessung oder eine Ladungsmessung sein. Es kann sich um eine Steady-State-Messung handeln, bei der ein Strom oder Potential, der bzw. das sich während der Messung nicht wesentlich ändert, verfolgt wird, oder es kann sich um eine dynamische Messung handeln, z.B. eine, bei der die Geschwindigkeit der Veränderung des Stromes oder Potentials innerhalb eines bestimmten Zeitraums verfolgt wird. Diese Messungen erfordern wenigstens eine Elektrode zusätzlich zur Sensorelektrode. Diese zweite Elektrode kann auf der Haut angebracht sein, oder sie kann implantiert sein, z.B. subkutan. Wenn ein Strom gemessen wird, ist es nützlich, einen Potentiostaten im Schaltkreis zu haben, der die implantierte Sensorelektrode und die zweite Elektrode, die eine Referenzelektrode sein kann, beispielsweise eine Ag/AgCl-Elektrode, verbindet. Wenn ein Strom gemessen wird, kann die Referenzelektrode auch als die Gegenelektrode dienen. Die Gegenelektrode kann auch eine separate, dritte Elektrode sein, beispielsweise eine Platin-, Kohlenstoff-, Palladium- oder Gold-Elektrode.

[0048] Zusätzlich zur Implantierung der Sendeelektrode in den Körper kann auch Flüssigkeit aus dem Körper, insbesondere Flüssigkeit aus dem subkutanen Bereich, zu einem externen Sensor geleitet werden. Es wird in diesem Falle bevorzugt, eine Mikrofiltrationseinheit in den subkutanen Bereich zu implantieren und Flüssigkeit in einen evakuierten Behälter zu ziehen, wobei die Flüssigkeit durch eine Zelle tritt, die die Sensorelektrode enthält. Vorzugsweise enthält diese Zelle auch eine zweite Elektrode, z.B. eine Referenzelektrode, die auch als eine Gegenelektrode dienen kann. Alternativ können die Referenz- und Gegenelektroden getrennte Elektroden sein. Bei coulometrischen Messungen werden nur zwei Elektroden, die Sensorelektrode und die Gegenelektrode, benötigt. Der Fluss der Körperflüssigkeit kann diskontinuierlich oder kontinuierlich sein. Es kann nicht nur eine implantierte Mikrofiltrationsfaser verwendet werden, sondern auch eine Mikrodialysefaser, und zwar vorzugsweise zusammen mit einer Pumpe.

Erhöhte Stabilität der Biosensoren:

[0049] Für die Erhöhung der Stabilität und der nützlichen Lebensdauer des erfindungsgemäßen Biosensors ist es vorteilhaft, immanent stabilere Enzyme und Redox-Polymere zu verwenden. Jedoch ist es auch möglich, sogar wenn das Enzym und das Redox-Polymer beim Prozess der elektrischen Oxidation der Glucose, durch den das Signal (der Strom) erzeugt wird, abgebaut werden, die nützliche Lebensdauer der implantierten Elektroden stark zu verlängern und die Häufigkeit der benötigten Rekalibrierung nach der Implantation zu reduzieren.

[0050] Eine einfache Maßnahme, durch die die Lebensdauer der implantierten Elektroden verlängert und die Häufigkeit der benötigten Rekalibrierungen vermindert werden kann, umfasst das Einschalten der Elektroden über das Anlegen einer Vorspannung, d.h. eines Potentials, nur während der Messdauer und das anschließende Abschalten oder Reduzieren des Vorspannungspotentials, so dass ein geringerer Strom fließt. Es ist im Allgemeinen ausreichend, lediglich eine Messung alle 5 oder sogar 10 Minuten oder in noch größeren Abständen durchzuführen, da sich die Glucosekonzentrationen nicht plötzlich verändern.

[0051] Eine weitere Maßnahme besteht darin, den Glucosefluss zur Sensorschicht soweit wie möglich zu verringern, solange eine ausreichende Empfindlichkeit und Nachweisgrenze beibehalten werden. Die Verringerung des Glucoseflusses zur Sensorschicht verringert den Strom. Deshalb darf, auch wenn dieses die Elektroden stabilisiert, d.h. die Abnahme der Empfindlichkeit verlangsamt, der flussabhängige Strom nicht zu stark verringert werden. Im Allgemeinen ist ein Strom von 3 – 5 nA bei einer Glucosekonzentration von 2 mM angemessen. Wenn der Glucosefluss durch den Einsatz einer oder mehrerer Polymerschicht(en), die den Glucosefluss vermindert bzw. vermindern, z.B. der PAL/PAZ-Schicht erniedrigt wird, wird die Lebensdauer des Sensors erhöht.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

Elektrodenherstellung

[0052] Es wurden Elektroden aus einem mit Polyamid isolierten Golddraht mit einem Durchmesser von 250 µm, der einen Außendurchmesser (AD) von 290 µm hatte (California Fine Wire Co., Grover City, Kalifornien), hergestellt. Es wurden eine wärmeschrumpfbare Kapillare (RNF 100 3/64" BK und 1/16" BK, Thermofit®, Raychem, Menlo Park, Kalifornien) und ein Zweikomponenten-Silberepoxy (Epo-tek H₂O_E; Epoxy Tech Inc., Billerica, Massachusetts) für die Herstellung der Elektrode verwendet.

[0053] Die Glucosesensorschicht wurde durch das Vernetzen einer gentechnologisch erzeugten Glucoseoxidase (rGOX) (35 % rein, Chiron Corp., Emeryville, Kalifornien) mit einem Polymer hergestellt, das von Poly(vinylimidazol) (PVI) abstammte und durch das Komplexieren eines Teils der Imidazole mit $[\text{Os}(\text{byp})_2\text{Cl}]^{+2+}$ hergestellt wurde. Das resultierende Redox-Polymer, das als PVI-Os bezeichnet wird, wurde nach einem früher veröffentlichten Protokoll synthetisiert (Ohara et al., 1993, Anal. Chem., 65:24). Es wurde Poly(ethylenglykol)diglycidylether 400 (PEDGE, Polysciences, Warrington, Pennsylvania) als Vernetzungsmittel eingesetzt.

[0054] Die Sperrschicht zwischen der Sensorschicht und der die Störungen eliminierenden Schichten wurde aus Polyallylamin (PAL, Polysciences), das mit einem polyfunktionellen Aziridin (PAZ) vernetzt war (XAMA-7, Virginia Chemicals, Portsmouth, Virginia), hergestellt.

[0055] Die die Störungen eliminierende Schicht wurde durch das Co-Immobilisieren von Meerrettichperoxidase (HRP) vom Typ VI (Kat. Nr. P-8375, 310 U/mg, hier als HRP-VI bezeichnet, Sigma, St. Louis, Missouri) und von HRP für immunologische Tests (Nr. 814407, mindestens 100 U/mg, bezeichnet als HRP-BM, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, Indiana) mit Lactatoxidase aus *Pediococcus* sp. (Kat. Nr. 1361, 40 U/mg, bezeichnet als LOX, Genzyme, Cambridge, Massachusetts) und aus einer rekombinanten mikrobiellen Quelle (Kat. Nr. 1381, bezeichnet als rLOX, Genzyme) hergestellt. Die Co-Immobilisierung erfolgte über die Verwendung von Natriumperodat (Kat. Nr. S-1147, Sigma) gemäß den von Maidan und Heller, 1992, Anal. Chem. 64: 2889–2896 beschriebenen Verfahren.

[0056] Die biokompatible Schicht wurde aus 10%igem wässrigem Poly(ethylenoxid)tetraacrylat (PEO-TA) hergestellt. Zur Bildung des mittels Licht vernetzbaren Polymers wurde PEO durch die Umsetzung mit Acryloylchlorid acryliert. Das PEO (18 500/mol, Polysciences) ist aufgrund von zwei Hydroxy-Gruppen auf einem Bisphenol-A-bisepoxid, des zwei α,ω -Hydroxy-terminierte PEO-Einheiten von 9 000 g/mol verknüpft, eine tetrahydroxylierte Verbindung. Es wurde Acryloylchlorid (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) in einem 2-fachen bis 5-fachen molaren Überschuss zur Acylierung des Polymers (10 % Gew./Vol. PEO in Benzol) eingesetzt. Triethylamin (Mallinkrodt, Paris, Kentucky) wurde als Protonenakzeptor in äquimolarem Verhältnis mit dem Acryloylchlorid eingesetzt.

[0057] Bei den anderen verwendeten Chemikalien handelte es sich um Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V (Kat.-Nr. A-2153), BSA, Ascorbinsäure, Harnsäure, 4-Acetaminophenol, L(+)-Milchsäure und 30%iges Wasserstoffperoxid, alle von Sigma. Alle Chemikalien wurden so verwendet, wie sie erhalten wurden. Die Lösungen wurden (wenn nichts anderes angegeben ist) mit destilliertem, entionisiertem Wasser hergestellt. Die Glucosemessung erfolgte bei 37°C in Puffer, in Rinderserum (Sigma, Kat.-Nr. S-6648), das eine Lösung von Antibiotika und Antimykotika (Sigma, Kat.-Nr. A-8909) enthielt, sowie in Ratten.

Instrumentelle Ausrüstung

[0058] Bei der Herstellung der Goldelektroden mit der Aussparung wurden ein Potentiostat/Galvanostat (PAR-Modell 173, Princeton Applied Research, Princeton, New Jersey), der in einem galvanostatischen Modus betrieben wurde, und ein Sonikator (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania) eingesetzt. Cyclische Voltamogramme wurden mit einem Potentiostaten (PAR-Modell 273A) und einer herkömmlichen elektrochemischen Zelle mit einem Pt-Draht-Zähler und einer SKE-Referenzelektrode aufgezeichnet, und sie wurden mit einer PAR-270-Software ausgewertet. Die Glucosesignale wurden mit einem Bipotentiostaten (Biometra EP 30) und einem Zweikanal-Strip-Chart-Recorder aufgezeichnet. Die Elektroden mit der Aussparung wurden unter einem Mikroskop (Bausch & Lomb) unter Verwendung eines Mikromanipulators (Narishige, Seacliff, New York) beschichtet. Die Mikropipetten wurden mit einem Mikropipettenzieher (Narishige) gezogen. Die Temperatur wurde mit einem isothermischen Zirkulator (Fisher Scientific) gesteuert.

Elektrodenherstellung:

[0059] Ein mit Polyamid isolierter Golddraht wurde mit einer scharfen Rasierklinge in Stücke von 5 cm Länge geschnitten. An einem Ende wurde mittels Silberepoxy ein elektrischer Kontakt mit einem isolierten Draht aus rostfreiem Stahl hergestellt, und die Verbindungsstelle wurde mit einer isolierenden wärmeschrumpfenden Kapillare bedeckt. Der die Aussparung erzeugende elektrochemische Ätzprozess wurde in 10 ml 3 M Kaliumcyanid durchgeführt, wobei der Golddraht als Arbeitselektrode und ein Platin- oder Golddraht als Gegenelektrode diente. Die Drähte wurden in Kontakt mit dem Boden des Bechers gebracht, wobei alle Elektroden die gleiche Entfernung von der Gegenelektrode hatten. Der Becher wurde während der Ätzprozedur mit Ultraschall behandelt. Die Enden der Golddrähte wurden nach oben gebogen, so dass die Durchmischung mit dem Sonikator dazu führte, dass die Sauerstoffblasen, die sich während des Ätzprozesses bildeten, aufstiegen und aus der

Lösung austraten. Die Elektroden wurden dann gründlich gewaschen und 30 Minuten in Wasser eingetaucht.

[0060] Eine Aussparung 6, d.h. ein Kanal in einem Polyamid-isolierten Golddraht 2, wird durch das elektrochemische Ätzen des Goldes unter galvanostatischer Steuerung erzeugt. Über die Steuerung der Ladung wird die Gesamtmenge des Goldes, die elektrisch oxidiert und als $\text{Au}(\text{CN})_2$ gelöst wird, definiert. Wenn die Bedingungen so gewählt werden, dass der CN^- -Transport in den Kanal und der $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ -Transport aus diesem heraus nicht geschwindigkeitsbestimmend sind (z.B. ultraschallbehandeltes Bad und hohe Konzentration an Kaliumcyanid, wenigstens ungefähr 0,2 M und vorzugsweise 3 M), wird an der Unterseite von Kanälen mit Abmessungen im Verhältnis von 0,5 bis 2,0 eine flache Golddrahtoberfläche erzeugt. Somit sind, wenn die CN^- -Konzentration hoch genug ist und die Drähte mit Ultraschall in Vibration gehalten werden, die Spitzen der Golddrähte flach. Das Durchleiten von 1,5 Coulomb pro Elektrode bei einem Strom von 8 mA erzeugte ungefähr 125 μm tiefe Hohlräume oder Kanäle. Bei der theoretischen Ausbeute für eine Einelektronen-Oxidation wären 3,08 mg Gold geätzt worden. Die Menge des Goldes, die tatsächlich geätzt wurde, betrug nur 0,076 mg, was eine nennenswerte CN^- - oder Wasseroxidation anzeigte. Trotzdem ist der Prozess reproduzierbar, genau und schnell, und es können 20 Elektroden in jedem Batch in weniger als 5 Minuten verarbeitet werden. Die die Aussparung erzeugende Prozedur war äußerst reproduzierbar, und es wurde für einen Batch von 30 Elektroden mit der Aussparung eine Abweichung von $\pm 10 \mu\text{m}$ gefunden (mittels eines Objektivmikrometers). Vor der Beschichtung wurden die Elektroden unter einem Mikroskop bezüglich der Flachheit der Goldoberfläche und der richtige Tiefe überprüft.

[0061] Die [Fig. 1](#) zeigt eine schematische seitliche Querschnittsansicht einer erfindungsgemäßen Elektrode, die den Golddraht 2, die isolierende Beschichtung 4 und die Aussparung oder den Kanal 6 zeigt. Die Goldoberflächen mit den Aussparungen wurden durch das Füllen der Hohlräume oder Kanäle 6 mit wässrigen Lösungen, die die vernetzbaren Komponenten der verschiedenen Schichten und ihre Vernetzungsmittel enthielten, beschichtet. Die Lösungen wurden unter einem Mikroskop mit einer Mikropipette (über eine Polyethylenkapillare und eine Schrumpfkapillare mit einer Mikrospritze verbunden) unter Verwendung eines Mikromanipulators eingeführt. Nach dem Auftragen jeder einzelnen der verschiedenen Schichten wurden die Elektroden über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft gehärtet.

Elektrodenstruktur:

[0062] Die Elektroden wurden hergestellt, indem nacheinander vier Schichten in der Aussparung oder dem Kanal 6 aufgebracht wurden. Diese Schichten waren die Sensorschicht 8, die isolierende Schicht 10, die die Störungen eliminierende Schicht 12 und die biokompatible Schicht 14. Die Sensorschicht, die das „verdrahtete“ Redoxenzym enthält, wird angrenzend an den und in Kontakt mit dem Golddraht 2 angeordnet. Die isolierende Schicht 10 ist zwischen der Sensorschicht 8 und der die Störstoffe eliminierenden Schicht 12 auf Peroxidase-Basis angeordnet. Die biokompatible Schicht 14 füllt den verbleibenden Raum in der Aussparung 6 aus und befindet sich in Kontakt mit der Umgebung außerhalb der Elektrode. Die dünnen Polymerschichten sind dadurch, dass sie in der Polyamidhülle 4 enthalten sind, gut geschützt.

[0063] Die Sensorschicht 8 wurde durch das „Verdrahten“ von rGOX mit der Goldelektrode über ein Redox-Hydrogel, an das das Enzym kovalent gebunden war, hergestellt. Die Elektroden wurden wie folgt präpariert: Lösungen von 10 mg/ml wurden hergestellt aus

1. dem PVI-Os-Redox-Polymer in Wasser,
2. dem Vernetzungsmittel PEGDGE in Wasser und
3. dem Enzym rGOX in einer 10 mM HEPES-Lösung, die auf einen pH von 8,15 eingestellt war.

[0064] Es wurde ein Redox-Hydrogel hergestellt, indem die drei Lösungen so gemischt wurden, dass die Endzusammensetzung (in Gewichtseinheiten) 52 % Redox-Polymer, 35 % Enzym und 13 % Vernetzungsmittel umfasste.

[0065] Die isolierende Schicht 10 verhinderte einen elektrischen Kontakt zwischen dem Redox-Hydrogel und den die Störstoffe eliminierenden Enzymen (HRP und LOX). PAL:PAZ wurde als das isolierende Material verwendet. Der Film wurde aus einer Lösung abgeschieden, die durch das Mischen einer PAL-Lösung (4,5 mg in 100 mM HEPES-Puffer von pH 7,0) und einer frisch hergestellten PAZ-Lösung (30 mg/ml) in Volumenverhältnissen von 1:1, 1:2 oder 1:3 erhalten wurde. Die PAZ-Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten nach ihrer Herstellung verwendet.

[0066] Die die Störstoffe eliminierende Schicht 12 wurde gemäß einem früher veröffentlichten Protokoll hergestellt (Maidan und Heller, 1992, Anal. Chem. 64: 2889–2896). 50 μl einer frisch hergestellten Natriumperio-

dat-Lösung von 12 mg/ml wurden zu 100 µl einer Lösung gegeben, die 20 mg/ml HRP (HRP-VI oder HRP-BM) und 100 mg/ml LOX (LOX oder rLOX) in 0,1 M Natriumbicarbonat enthält, und die Mischung wurde 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Alternativ könnte die HRP-Oxidation vor der Zugabe der LOX und der Vernetzung durchgeführt werden.

[0067] Die Filme der biokompatiblen Schicht 14 wurden durch eine einminütige Exposition gegen UV-Licht (UVP Inc., San Gabriel, Kalifornien; Blak-Ray; spektraler Peak bei 360 nm, UV-Bestrahlung der Probe mit 200 mW/cm²) vernetzt. Bei dem verwendeten Initiator handelte es sich um 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (Aldrich). Es wurde eine Lösung des Initiators von 300 mg/ml in 1-Vinyl-2-pyrrolidinon (Aldrich) zu den Präpolymeregemischungen gegeben. Ungefähr 30 µl der Initiatorlösung wurden pro ml der 10%igen (Gew./Gew.) wässrigen Lösung des tetraacrylierten PEO zugegeben. Die Präpolymere wurden in situ im Inneren der Aussparung der Elektrode vernetzt. Die Filme wurden durch das zweimalige Füllen der Aussparung mit der Präpolymerlösung und das Exponieren der Elektrode gegen die UV-Lichtquelle nach jeder Füllung des Hohlraumes hergestellt.

In-vitro-Testung der Elektroden:

[0068] Es wurden In-vitro-Experimente im Batch-Verfahren bei 25°C und 37°C durchgeführt, wobei eine herkömmliche elektrochemische Zelle mit drei Elektroden, dem Enzym-modifizierten Golddraht als der Arbeitselektrode, einem Platindraht als der Gegenelektrode und einer Referenzelektrode mit gesättigtem Kalomel (SKE), verwendet wurde. Der Elektrolyt war eine 20 mM Phosphat-gepufferte Salinelösung von pH 7,15, die 0,15 M NaCl enthält. Experimente in Serum wurden bei 37°C durchgeführt, wobei 100 µl einer Lösung von Antibiotika und Antimykotika zu 10 ml Serum gegeben wurden. Die Phosphat-gepufferte Saline und das Serum wurden während der Experimente gerührt. Das Arbeitspotential lag für die Experimente mit den PVI-Os-Polymeren bei +0,3 V gegenüber der SKE.

[0069] Struktur und Leistungsfähigkeit: Die Tiefe c des Kanals 6 und die Dicke der Polymerschichten darin steuern den Massentransport, d.h. den Fluss von Glucose, zur Sensorschicht. Durch das Steuern dieser Parameter wird die apparente Michaelis-Konstante (K_m) auf ungefähr 20 – 30 mM Glucose eingestellt. Die Polymerwand 4 des Kanals 6 schützt auch die vier Polymer- und Polymer/Enzymschichten 8, 10, 12 und 14 vor einer mechanischen Schädigung und vermindert die Gefahr, dass sie im Körper verloren gehen. Da der Strom durch die elektrische Oxidation von Glucose durch den Massentransport der Glucose durch die Aussparung 16 und ihre Polymerfilme 8, 10, 12 und 14 limitiert wird, und nicht durch den Massentransport zu der dem Gewebe ausgesetzten Spitze 16, ist der Strom praktisch unempfindlich gegenüber Bewegungen. Offensichtlich ist die Geschwindigkeit der elektrischen Oxidation der Glucose in der vertieft liegenden Sensorschicht 8 geringer als die Geschwindigkeit der Glucosediffusion zu der äußeren Grenzfläche des Kanals, die mit der Flüssigkeit in Kontakt steht.

[0070] PVI₅-Os wird als „Draht“ für die Sensorschicht bevorzugt, wenn eine Störstoffe eliminierende Schicht mit HRP und LOX verwendet wird, aber nicht bei Abwesenheit dieser Schicht, d.h. wenn Redox-Polymere mit stärker reduzierendem Redoxpotential bevorzugt werden. Das Subskript (5) wird verwendet um anzugeben, dass im Durchschnitt jede fünfte Vinylimidazol-Einheit ein elektronenübertragendes Osmiumzentrum enthält. Die Verwendung von Elektroden, die mit PVI₅-Os und PVI₃-Os (jede dritte 1-Vinylimidazol-Einheit trägt ein Osmiumzentrum) hergestellt wurden, wird in der [Fig. 2](#) verglichen, und es zeigt sich, dass bei der elektrischen Oxidation von Glucose mit Elektroden, die mit PVI₅-Os (offene Dreiecke) hergestellt wurden, eine größere Stromdichte erhalten wird als mit denjenigen, die mit PVI₃-Os (ausgefüllte Dreiecke) hergestellt wurden.

[0071] Tiefe der Aussparung und Sensorschicht: Es wurden Kanäle von 125, 250 und 500 µm Tiefe getestet, um die Abhängigkeit des Stromes von der Tiefe der Aussparung zu untersuchen ([Fig. 3](#)), wobei die Gesamtmenge an PVI₅-Os und rGOX konstant gehalten wurde. Ein großer Teil des Stromverlustes in den tieferen Hohlräumen resultierte nicht aus einem verminderten Massentransport der Glucose, sondern aus einer adsorptiven Zurückhaltung eines Teils des Enzyms und des Polymers auf der Polyamidwand, wenn beim Prozess der Elektrodenherstellung Mikrotröpfchen der Lösungen der Komponenten in die Aussparung eingebracht wurden. Durch das wiederholte Waschen mit Wasser wurde ein Teil des adsorbierten Polymers und des Enzyms an den Wänden auf die Elektrodenoberfläche gewaschen, was den Strom erhöhte. Die höchsten Ströme wurde nach 5 Waschungen gesehen. Wenn die Dicke der Sensorschicht durch die Erhöhung der Zahl der Beschichtungen erhöht wurde ([Fig. 4](#)), erreichte das Verhältnis von Strom zu Ladung, das benötigt wurde, um das Redox-Polymer in der Sensorschicht elektrisch zu reduzieren oder elektrisch zu oxidieren, ein Maximum, und dann nahm es ab. Für die bevorzugte Aussparung von 125 µm lieferten 10 Beschichtungen, die eine ungefähr 13 µm dicke Sensorschicht mit verdrahteter rGOX erzeugen, Sensoren, die für eine Anwendung in

vivo gewünschten Eigenschaften hatten.

[0072] Die isolierende Schicht: Diese Schicht isoliert die Redoxenzyme in der die Störstoffe eliminierenden Schicht (HRP und LOX) elektrisch von der „verdrahteten“ rGOX-Schicht und begrenzt den Glucosefluss zur Sensorschicht, wodurch die nützliche Lebenszeit der Elektrode verlängert wird. Es wird mit PAZ vernetztes PAL, das bei einem pH von 7,09 ein polykationisches Netzwerk bildet, bevorzugt. Die besten Ergebnisse, d.h. die beste Stabilität der Stromabgabe, wurden bei Verwendung von 1:2 PAL:PAZ ([Fig. 5](#)) erhalten, wobei drei Beschichtungen unter Bildung eines ungefähr 7 µm dicken vernetzten Films aufgetragen wurden.

[0073] Die die Störstoffe eliminierende Schicht: Störstoffe, insbesondere Ascorbat, Urat und Acetaminophenol, werden in der dritten Schicht, die LOX und HRP enthält, oxidiert. In dieser Schicht reagiert Lactat, dessen Konzentration im Blut typischerweise bei 1 mM liegt, mit O₂ unter Bildung von H₂O₂ und Pyruvat. H₂O₂ oxidiert, in Gegenwart von HRP, Ascorbat, Urat und Acetaminophenol, wobei es zu Wasser reduziert wird. Der bevorzugte Prozess der Co-Immobilisierung beinhaltete zwei getrennte Schritte: die Periodat-Oxidation von Oligosaccharid-Gruppen der HRP zu Aldehyden, gefolgt vom Mischen mit LOX und der Bildung multipler Schiffischer Basen zwischen HRP-Aldehyden und LOX-Aminen (z.B. Lysin) und zwischen HRP-Aldehyden und -Aminen. Die Dicke der die Störstoffe eliminierenden Schicht beträgt ungefähr 85 µm, und die Schicht wird durch das Auftragen von aufeinanderfolgenden Beschichtungen, z.B. von ungefähr 6 Beschichtungen, hergestellt. Die [Fig. 6](#) zeigt, dass elektrisch oxidierbare Störstoffe in Gegenwart von Lactat in physiologischen Konzentrationen eliminiert wurden. Die LOX verlor langsam ihre Aktivität in der vernetzten HRP-LOX-Schicht. Das führte zur Abnahme der Fähigkeit der Schicht zur Eliminierung von Störstoffen. Nach 36-stündigem Betrieb bei 37°C wurde eine messbare Stromzunahme festgestellt, wenn so viel Ascorbat zugesetzt wurde, dass eine Konzentration von 0,1 mM erhalten wurde.

[0074] Die biokompatible Schicht: Eine bevorzugte biokompatible Schicht besteht beispielsweise aus lichtvernetztem tetraacryliertem Poly(ethylenoxid) von 18 500 Dalton (Pathak et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 114: 8311–8312). Die Dicke dieser Schicht, die durch das aufeinanderfolgende Vernetzen von zwei Beschichtungen durch Licht hergestellt wurde, beträgt ungefähr 20 µm. Eine einminütige Exposition gegen UV-Licht, die für den Prozess der Lichtvernetzung benötigt wurde, verminderte die Empfindlichkeit um 16 ± 2 %.

Beispiel 2: Einsatz des Sensors in vivo

[0075] Das Ziel dieses Experiments bestand darin, die Validität der Einpunkt-Kalibrierung in vivo zu bestätigen. Es wurden zwei Sensoren gleichzeitig einer Ratte subkutan implantiert, einer auf dem Brustkorb, der andere zwischen den Schulterblättern. Um den Unterschied zwischen dem gesammelten Blut und der mit den Sensoren gemessenen subkutanen Flüssigkeit so extrem wie möglich zu machen, d.h. um zu testen, ob die Einpunkt-Kalibrierung auch funktioniert, wenn die betreffenden Organe verschieden sind und die Orte der Probenahme entfernt voneinander liegen, wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Blutglucosespiegel wurden in regelmäßigen Abständen in den entnommenen Proben gemessen, wobei die absolute, nicht korrigierte Stromabgabe des Sensors kontinuierlich verfolgt wurde.

[0076] Es wurden In-vivo-Experimente (6–10 Stunden) mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten von 300 g durchgeführt. Man ließ die Ratten über Nacht hungern, und vor dem Experiment wurden sie durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Natriumpentobarbital (65 mg/kg Ratte) anästhesiert. Es wurde dann eine i.p.-Injektion von Atropinsulfat (166 mg/kg Ratte) verabreicht, um eine Atemdepression zu unterdrücken. Sobald die Ratte anästhesiert war, wurde ein Teil des Unterleibs der Ratte rasiert, mit einem leitfähigen Gel beschichtet, und es wurde eine Ag/AgCl-Oberflächenreferenzelektrode auf der Haut befestigt. Diese Elektrode diente auch als die Gegenelektrode. Es wurden dann Sensoren subkutan mittels eines Per-Q-Cath-Introducers von 22 Gauge (Gesco International, San Antonio, Texas) auf dem Brustkorb der Ratte oder subkutan im Bereich zwischen den Schulterblättern über einen kleinen chirurgischen Einschnitt implantiert. Die Sensoren wurden mit Klebebändern auf der Haut befestigt, um eine Bewegung des Sensors zu verhindern. Die Sensoren wurden zusammen mit der Referenzelektrode mit einem im Eigenbau hergestellten Bipotentiostaten verbunden. Das Arbeitspotential der Sensoren lag bei 0,3 V gegenüber Ag/AgCl, wobei die Ag/AgCl-Elektrode sowohl als Referenz als auch als Gegenelektrode diente. Die Messwerte des Sensors wurden mittels eines Messwertsammlers (Rustrak Ranger, East Greenwich, Rhode Island) gesammelt, und am Ende des Experiments wurden sie in einen Computer eingespeist. Während des Experiments wurde die Körpertemperatur der Ratte durch eine homöostatische Decke bei 37°C gehalten. Man ließ die Sensoren wenigstens eine Stunde lang einen Ausgangswert erreichen, ehe mit der Blutentnahme begonnen wurde. Die Blutproben wurden aus der Schwanzvene erhalten, und alle Blutproben wurden mittels eines Glucoseanalysators (YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, Modell 23A) analysiert.

[0077] Ungefähr 30 Minuten nach dem Beginn der Blutentnahme wurde mit einer i.p.-Infusion von Glucose mittels einer Spritzenpumpe begonnen (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts), und zwar mit einer Geschwindigkeit von 120 mg Glucose/min-kg Ratte. Die Glucoseinfusion wurde ungefähr eine Stunde lang aufrechterhalten.

[0078] Wie man in der [Fig. 7](#) sieht, fiel nach 410 Minuten der Strom plötzlich ab. Ein derartiger Abfall wurde bei anderen Messungen mit subkutan implantierten Elektroden zwischen 400 und 600 min beobachtet, aber er wurde nie für Elektroden beobachtet, die in Puffer bei 37°C betrieben wurden. Wenn die Elektroden, die versagt hatten, entnommen und erneut in Puffer getestet wurden, zeigte sich, dass der größte Teil ihrer ursprünglichen Empfindlichkeit noch vorhanden war. Die Ursache für diese scheinbare Inaktivierung war ein Versagen der Gegen-/Referenz-Ag/AgCl-Elektrode auf der Haut der Ratte bezüglich der Aufrechterhaltung eines guten elektrolytischen Kontakts, und sie beruhte nicht auf irgendeinem Versagen des implantierten Sensors. Unter Verwendung eines willkürlich gewählten Punktes zur Berechnung einer Kalibrierungskurve für jede Elektrode, d.h. einer Bestimmung des Blutglucosespiegels und einer Strommessung zur Definition der Skalen, wurden alle Daten aus der [Fig. 7](#) in ein klinisches Error-Grid nach Clarke (Clarke et al., 1987, Diabetes Care, 5: 622–627) eingetragen ([Fig. 8](#)), und zwar ohne irgendeine weitere Korrektur. Bei dieser Analyse werden Punkte, die in den Bereich A des Grids fallen, als klinisch akkurat angesehen, während diejenigen in der Region B als klinisch korrekt angesehen werden. Punkte, die in den Bereich C fallen, sind nicht korrekt, aber sie würden nicht zu einer falschen Behandlung führen. Punkte in den Bereichen D und E sind inkorrekt, und wenn sich eine Behandlung auf diese stützen würde, wäre sie falsch.

[0079] Alle Punkte, von beiden Elektroden, lagen in den Bereichen A und B, wobei 43 der 48 Punkte im Bereich A lagen. Die drei Punkte im Bereich B in der Nähe von 100 mg/dl Glucose für die Elektrode, die zwischen den Schulterblättern implantiert worden war, waren die letzten drei Punkte des Experiments, zum Zeitpunkt von ungefähr 410 min. Ungeachtet des Modus des Versagens nach 400 bis 600 min aufgrund eines schlechten elektrolytischen Kontaktes der Gegen-/Referenzelektrode mit der Haut und dem Versagen nach 36 Stunden aufgrund einer Inaktivierung der Lactatoxidase, die zu einem Verlust der Eliminierung von Störstoffen führte, zeigt sich hier, dass eine Einpunkt-Kalibrierung durchführbar ist. Nach einer derartigen Kalibrierung stellen die Messwerte der subkutanen Sensoren, ohne irgendeine Korrektur, klinisch nützliche Werte der Blutglucosespiegel bereit.

[0080] Die [Fig. 9](#) zeigt die Verteilung von allen der möglichen Korrelationen, die erhalten wurden, wenn jede der 24 Glucoseanalysen für eine Einpunkt-Kalibrierung der beiden implantierten Elektroden herangezogen wurde. Es gibt $2 \times 24 \times 24 = 1152$ Punkte in der Verteilung. Von diesen befinden sich 78 % im Bereich A, 15 % im Bereich B, 1 % im Bereich C, 6 % sind im Bereich D, und keine Punkte sind im Bereich E.

[0081] In der [Fig. 10](#) testeten wir die Verbesserung der Einpunkt-Kalibrierung durch die Verwendung redundanter Elektroden. Zuerst wurden die Messwerte der Elektrode A bezüglich denjenigen der Elektrode B durch das Multiplizieren eines jeden Messwertes mit dem durchschnittlichen Messwert der Elektrode B, geteilt durch den durchschnittlichen Messwert der Elektrode A, normalisiert. Als nächstes wurde die Standardabweichung für die Unterschiede zwischen den 24 Gruppen von Messwerten der implantierten Elektrode B und den korrigierten Messwerten der implantierten Elektrode A berechnet. Dann wurden alle diejenigen Gruppen von Messwerten, die sich um mehr als eine Standardabweichung unterschieden, ausgeschlossen. Die Zahl der Gruppen wurde dadurch von 24 auf 11 reduziert; 82 % der Punkte lagen im Bereich A, 17 % im Bereich B, 1 % im Bereich D und keine Punkte in den Bereichen C und E. Die Verteilung demonstriert, dass die Sensoren über eine einzige unabhängige Messung der Glucosekonzentration in einer entnommenen Blutprobe kalibriert werden können. Sie demonstrieren auch die Verbesserung der klinischen Genauigkeit, die aus der Verwendung redundanter subkutaner Sensoren resultiert. Die Auswahl derjenigen Datenpunkte, die um weniger als die Standardabweichung der gesamten Gruppe differierten, führte zu einer sechsfachen Verminderung der Wahrscheinlichkeit eines klinischen Irrtums bei einer Entscheidung, die auf den Messwerten der implantierten Sensoren basierte.

Stabilität und andere Charakteristika:

[0082] Zur Verbesserung der Stabilität wird die thermostabilere rekombinante GOX (rGOX; Heller, 1992, J. Phys. Chem. 96: 3579–3587) anstelle von GOX im Sensor verwendet, und der Glucosetransport wird verringert, um den Sensorstrom durch die Diffusion limitiert und nicht durch den Enzym-Turnover limitiert zu machen. Der Glucosefluss wird durch die drei äußeren Schichten, und nicht durch die Sensorschicht selbst, abgeschwächt. Da die Sensorschicht einen großen Überschuss an Glucoseoxidase enthält, übertrifft ihre Aktivität diejenige, die für die elektrische Oxidation des abgeschwächten Glucoseflusses benötigt wird, bei weitem, und die Stabilität des Sensors wird verbessert.

[0083] Die Stabilität kann mittels bekannter Verfahren getestet werden, z.B. in Gegenwart von 0,1 mM Ascorbat in 10 mM Glucose bei 37°C. Die Stromabgabe einer typischen optimierten Elektrode lag bei ungefähr 35 nA, und der apparente K_m -Wert, der aus einem Eadie-Hofstee-Plot abgeleitet wurde, betrug ungefähr 20 mM (Tabelle 1). Die 10–90 %-Ansprechzeit lag bei ungefähr 1 Minute.

[0084] Wie erwartet wurde, und wie aus der [Fig. 5](#) hervorgeht, war bei dünneren Filmen der Massentransport der Glucose erhöht, d.h. der Strom war höher, während bei dickeren Filmen die Stabilität verbessert war. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von Elektroden mit dünnen (ungefähr 1 μm) Sensorfolien (weniger als $10^{-2} \text{ A cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$) konnte eine Abnahme der Empfindlichkeit um eine Größenordnung zugunsten der Stabilität in Kauf genommen werden, wobei die Ströme gleichzeitig hoch genug blieben, um leicht gemessen werden zu können.

[0085] Wie aus der [Fig. 5](#) hervorgeht, verändert sich die Empfindlichkeit der stabilisierten Sensoren während einer Betriebsdauer von 72 Stunden bei 37°C um nicht mehr als $\pm 5 \%$.

[0086] Nach einer kleinen anfänglichen Abnahme der Empfindlichkeit stieg diese nach 40 Stunden auf einen Maximalwert an, und die Empfindlichkeit während der letzten 72 Stunden war fast mit der anfänglichen identisch.

[0087] Die Charakteristika der erfindungsgemäßen Elektroden sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Jeder Eintrag stellt einen Mittelwert für fünf getestete Elektroden dar. Die Ausgangsströme liegen typischerweise unter 0,5 nA, und das Rauschen ist kleiner als 10 pA. Die Ströme, die über den gesamten Bereich der physiologischen Glucosekonzentrationen (2–20 mM) beobachtet wurden, übertreffen den dem Rauschen äquivalenten Strom um wenigstens einen Faktor von 100. Der apparente K_m -Wert liegt bei 20 mM, und die 10 % – 90 %-Ansprechzeit liegt für gealterte Elektroden bei ungefähr 90 Sekunden für die niedrigste physiologisch relevante Glucosekonzentration (2 mM) und bei 20 Sekunden für die höchste (20 mM).

[0088] Die Basislinie von Null bei 0 mM Glucose ist in Gegenwart von 0,1 mM Ascorbat 36 Stunden lang stabil. Die beobachtete Stabilität und das Vorliegen eines validen Nullpunktes in Gegenwart der Störstoffe legt nahe, dass der Sensor in vivo 72 Stunden verwendet werden kann, und dass er in vivo über eine Einpunkt-Kalibrierung getestet/rekalibriert werden kann, z.B. durch die Entnahme nur einer einzigen Blutprobe für eine unabhängige Analyse.

TABELLE 1

SENSOREIGENSCHAFTEN					
i (nA)	j ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	K_M^{app} (mM)	K_M^{app} (mM)	t_r (s)	Stromvarianz (%)
		EH	LB		
33,9	69,1	18,5	33,4	30-90	5,0

wobei:

- i der Strom ist, der bei 37°C und bei einer Glucosekonzentration von 10 mM gemessen wird.
- j die Stromdichte ist, die bei 37°C und einer Glucosekonzentration von 10 mM gemessen wird.
- K_M^{app} der apparente Michaelis-Menten-Koeffizient ist, der aus einem elektrochemischen Eadie-Hofstee-Plot (EH) oder einem Lineweaver-Burk-Plot (LB) bestimmt wurde.
- t_x die 10–90 %-Anstiegszeit ist, 90 s für eine Glucosekonzentration von 2 mM und 30 s von 20 mM.
- Stromvarianz die maximale Abweichung vom Mittelwert ist, gemessen während des 72-stündigen Tests, durchgeführt in 10 mM Glucose in Gegenwart von Störstoffen. Der Strom wurde kontinuierlich bei 37°C gemessen.

[0089] Die obigen Beispiele wurden so ausgelegt, dass sie bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung veranschaulichen. Es war nicht vorgesehen, dass die Beispiele alle Merkmale und alle Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die hier beschrieben und beansprucht werden, vollständig abdecken.

Patentansprüche

1. Eine Elektrode, die aufweist:
 nicht-korrodierenden leitenden Draht (2), der mit einem isolierenden Polymer (4) überzogen ist;
 eine Aussparung (6) an einem Ende des überzogenen Drahts, die einen Kanal in dem Überzug (4) aus dem isolierenden Polymer bildet, der frei von Draht ist und an einem Ende durch den Draht (2) begrenzt ist und am anderen Ende durch die Umgebung, die an den überzogenen Draht angrenzt;
 eine mehrschichtige Polymerzusammensetzung innerhalb dieses Kanals, wobei die Zusammensetzung umfaßt:
 eine Redoxschicht (8) angrenzend an den und im Kontakt mit dem Draht (2), wobei die Redoxschicht ein Redoxenzym umfaßt, das mit einem Redoxpolymer vernetzt ist;
 eine biokompatible Polymerschicht (14) angrenzend an die Umgebung außerhalb des überzogenen Drahts;
 und
 eine die Diffusion des Analyten begrenzende Sperrschicht (10), die zwischen der Redoxschicht (8) und der biokompatiblen Schicht (14) angeordnet ist.
2. Elektrode nach Anspruch 1, wobei das isolierende Polymer (4) weniger als 5 % Wasser enthält, wenn es im Gleichgewicht mit physiologischen Körperflüssigkeiten steht.
3. Elektrode nach Anspruch 1, wobei die biokompatible Schicht (14) von einem biokompatiblen Polymer gebildet wird, das nicht weniger als 20 Gew.-% Wasser enthält, wenn es im Gleichgewicht mit physiologischen Körperflüssigkeiten steht.
4. Elektrode nach Anspruch 1, wobei der Kanal (6) in Form einer Aussparung eine Länge von der Spitze der Elektrode bis zu dem abgesenkten Draht von zwischen etwa 20 µm und 1 mm aufweist.
5. Elektrode nach Anspruch 1, wobei das Redoxpolymer sich von Poly(1-Vinylimidazol) oder einem Copolymer von (1-Vinylimidazol) ableitet, das an ein Metallion gebunden ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus $\text{Os}^{3+/2+}$, $\text{Ru}^{3+/2+}$ und $\text{Fe}^{3+/2+}$.
6. Elektrode nach Anspruch 1, wobei das Redoxpotential des Redoxpolymers gegenüber der Standard-Kalomelektrode in einer wäßrigen Lösung bei etwa pH 7,4 nicht stärker reduzierend ist als etwa -0,15 V und nicht stärker oxidierend ist als etwa +0,15 V.
7. Elektrode nach Anspruch 1, die außerdem eine Störungen eliminierende Schicht (12) aufweist, die ein Peroxidaseenzym umfaßt.
8. Elektrode nach Anspruch 1, wobei das Redoxenzym die Oxidation von Glucose katalysiert.
9. Elektrode nach Anspruch 8, wobei das Redoxenzym Glucoseoxidase ist.
10. Elektrode nach Anspruch 9, wobei das Redoxenzym rekombinante Glucoseoxidase ist.
11. Elektrode nach Anspruch 1, wobei das Redoxenzym die Oxidation von Lactat katalysiert.
12. Elektrode nach Anspruch 7, wobei die die Störungen eliminierende Schicht (12) außerdem ein Enzym umfaßt, das eine Wasserstoffperoxid liefernde Reaktion katalysiert.
13. Elektrode nach Anspruch 1, wobei das isolierende Polymer aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Polyimid, Polyester, Polyurethan und einem perfluorierten Polymer.
14. Elektrode nach Anspruch 1, wobei die die Diffusion des Analyten begrenzende Sperrschicht (10) eine den Glucosefluß limitierende Schicht ist, die ein polyanionisches, polykationisches oder zwitterionisches Polymer umfaßt.
15. Elektrode nach Anspruch 1, wobei der Außendurchmesser des isolierten Drahts kleiner ist als etwa 0,3 mm.
16. Verfahren zur Herstellung einer Elektrode nach den Ansprüchen 1, 2 und 9, das die Schritte umfaßt:
 Überziehen eines nicht-korrodierenden Metall- oder Kohlenstoffdrahts mit einem biokompatiblen isolierenden

Polymer, das weniger als 5 % Wasser enthält, wenn es im Gleichgewicht mit physiologischen Körperflüssigkeiten steht, um einen überzogenen Draht zu bilden;
Ätzen des überzogenen Drahts, um an einem Ende des überzogenen Drahts eine Aussparung zu bilden, wobei die Aussparung frei von Metall oder Kohlenstoff ist;
Immobilisieren einer Redoxzusammensetzung, die Glucoseoxidase und ein Redoxpolymer umfaßt, innerhalb der Aussparung angrenzend an den Draht;
Überziehen des Inhalts der Aussparung mit einem biokompatiblen Polymer;
wobei der genannte geätzte Draht und die polymerüberzogene Aussparung mit Inhalt zusammen eine Elektrode bilden, die nützlich ist als in vivo Glucose-Biosensor mit im Wesentlichen keinerlei Stromabgabe bei einer Glucosekonzentration von Null, selbst in Gegenwart von störenden elektroreaktiven Spezies.

17. Verfahren nach Anspruch 16, das beinhaltet, daß die Überzugsstufe die Schritte umfaßt:
elektrisches Aufladen von Tröpfchen eines wäßrigen Polymers;
Anlegen eines Potentials an einen nichtkorrodierenden leitenden Draht, so daß die elektrisch aufgeladenen Tröpfchen von dem Draht angezogen werden; und
Aufbringen der geladenen Polymertröpfchen auf die Elektrode, um eine Elektrode zu bilden, die mit einem isolierenden Polymer überzogen ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die elektrisch aufgeladenen Tröpfchen auf eine nicht-isolierte Spitze des elektrisch isolierten Drahts aufgebracht werden.

19. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der genannte Ätzschritt den Schritt der Bildung eines Aussparungskanals durch elektrolytisches Auflösen eines Teils des elektrisch leitenden Drahts umfaßt, wobei ein oxidierendes elektrisches Potential von nicht weniger als 0,3 V gegenüber der Standard-Kalomelektrode beim Auflösen des Drahts eingehalten wird, wobei der Draht in eine wäßrige Lösung eingetaucht ist, die wenigstens ein Anion enthält, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus CN^- , Cl^- , Br^- und I^- in einer Konzentration von wenigstens etwa 0,1 M.

20. Verfahren zur In-vitro-Messung der Konzentration einer Biochemikalie in einer Probe einer Körperflüssigkeit eines Tiers, das umfaßt:
Inkontaktbringen der Probe einer Körperflüssigkeit eines Tiers mit der Elektrode von Anspruch 1; und
Bestimmen der Konzentration der Biochemikalie in der Körperflüssigkeit anhand des elektrischen Signals, das von der Elektrode erzeugt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Körperflüssigkeit Blut ist.

22. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Biochemikalie Glucose ist.

23. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Biochemikalie Lactat ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

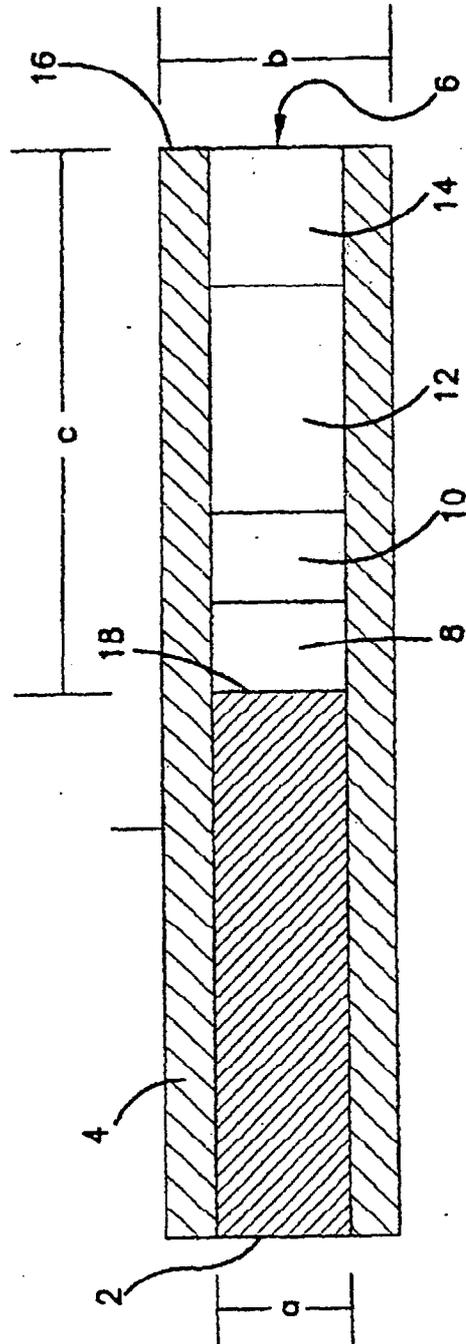


FIG. 1

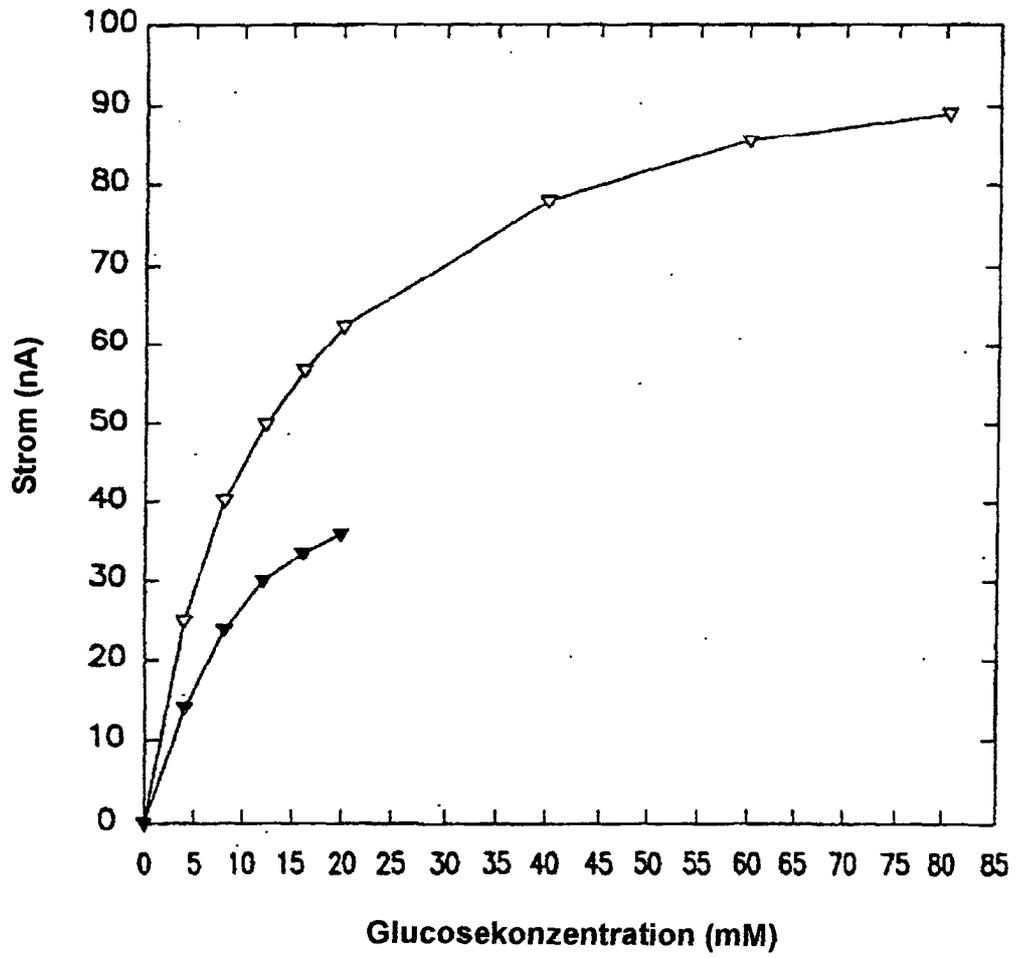


FIG. 2

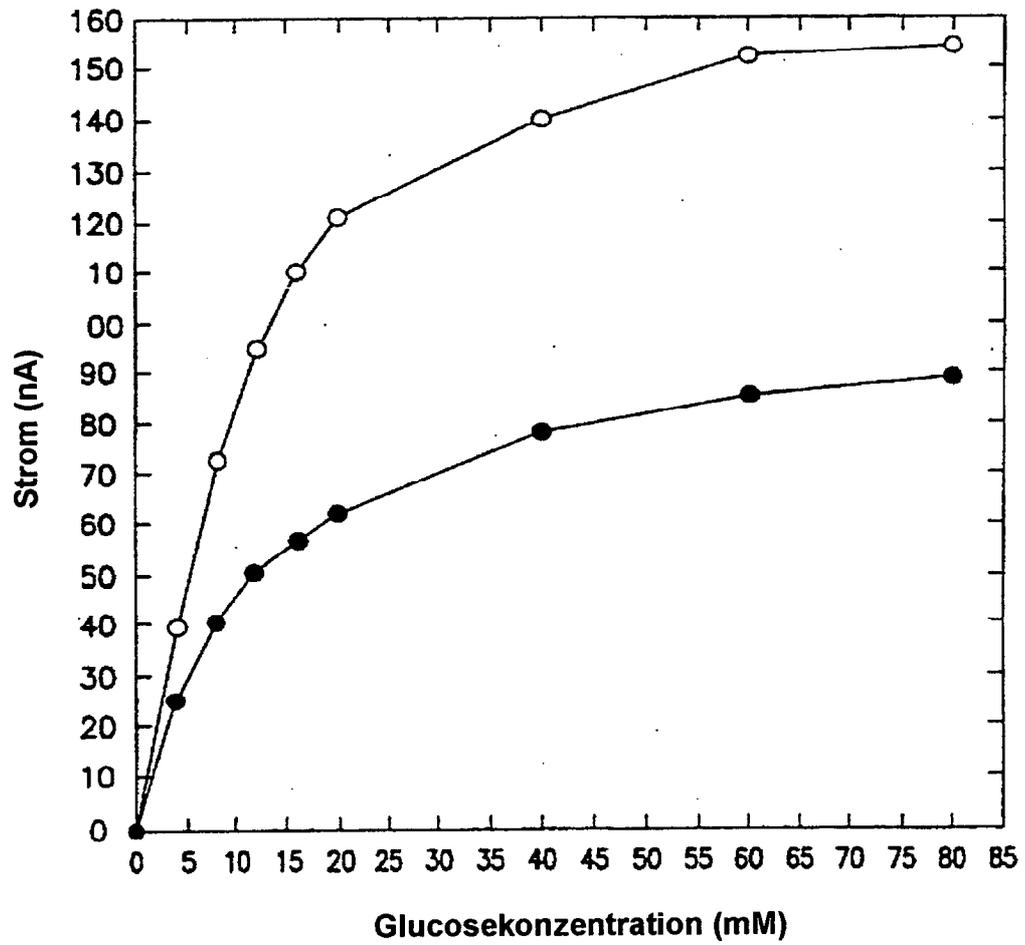


FIG. 3

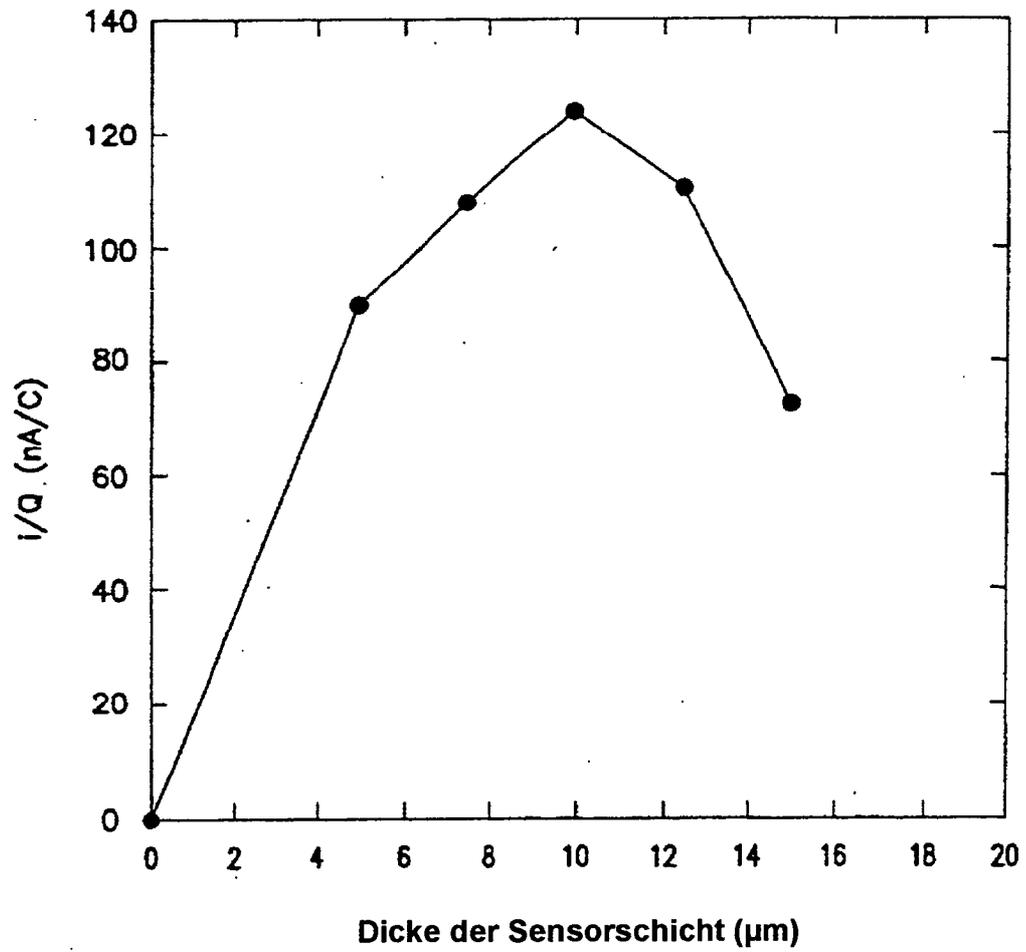


FIG. 4

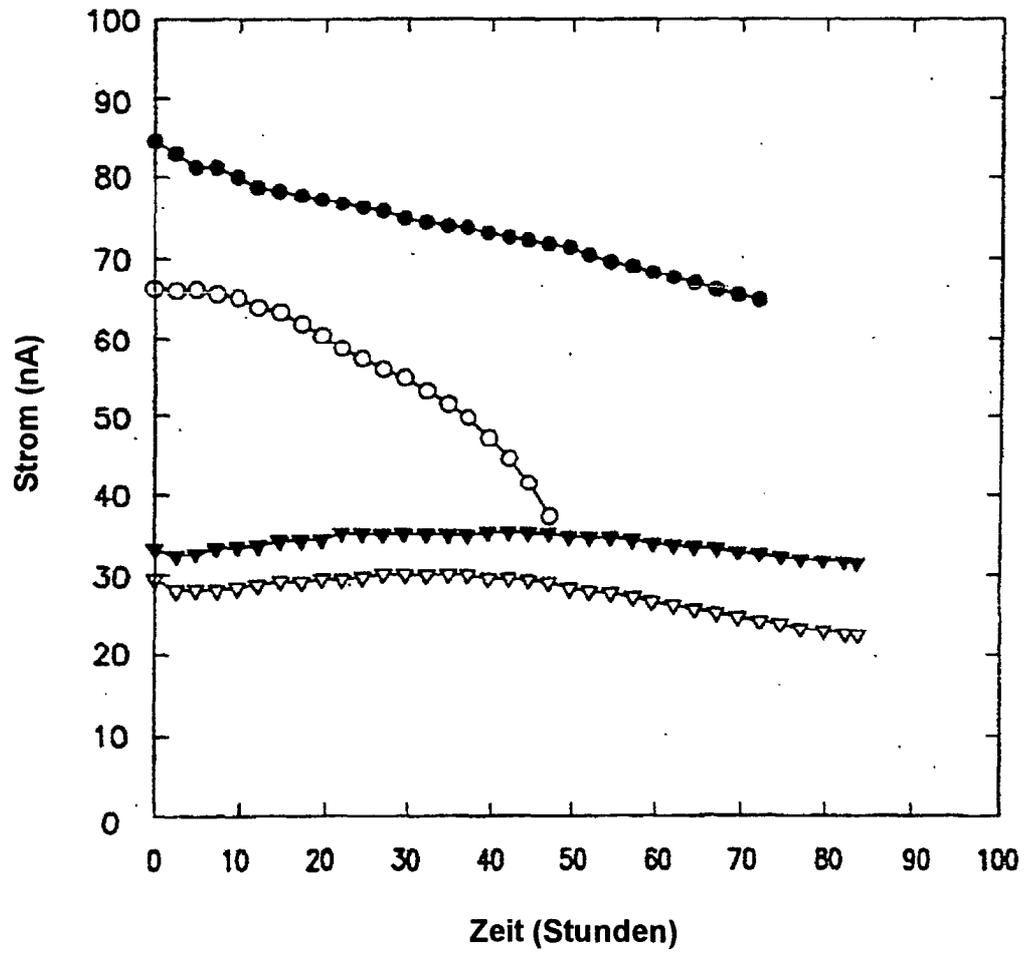


FIG. 5

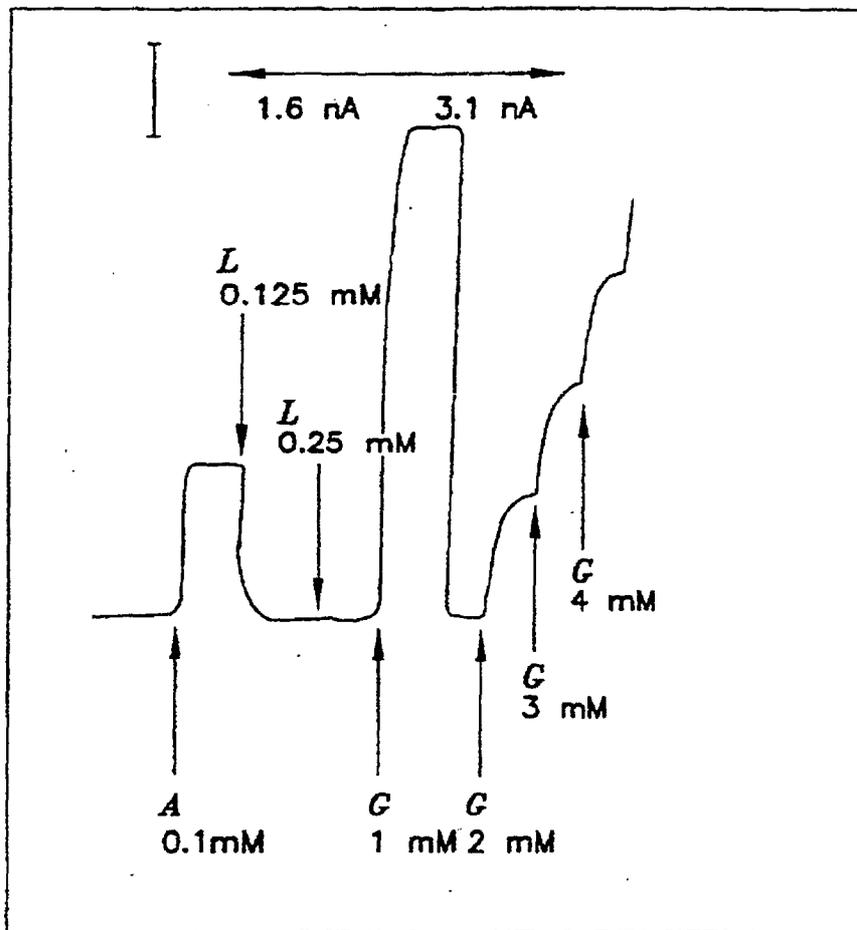


FIG. 6

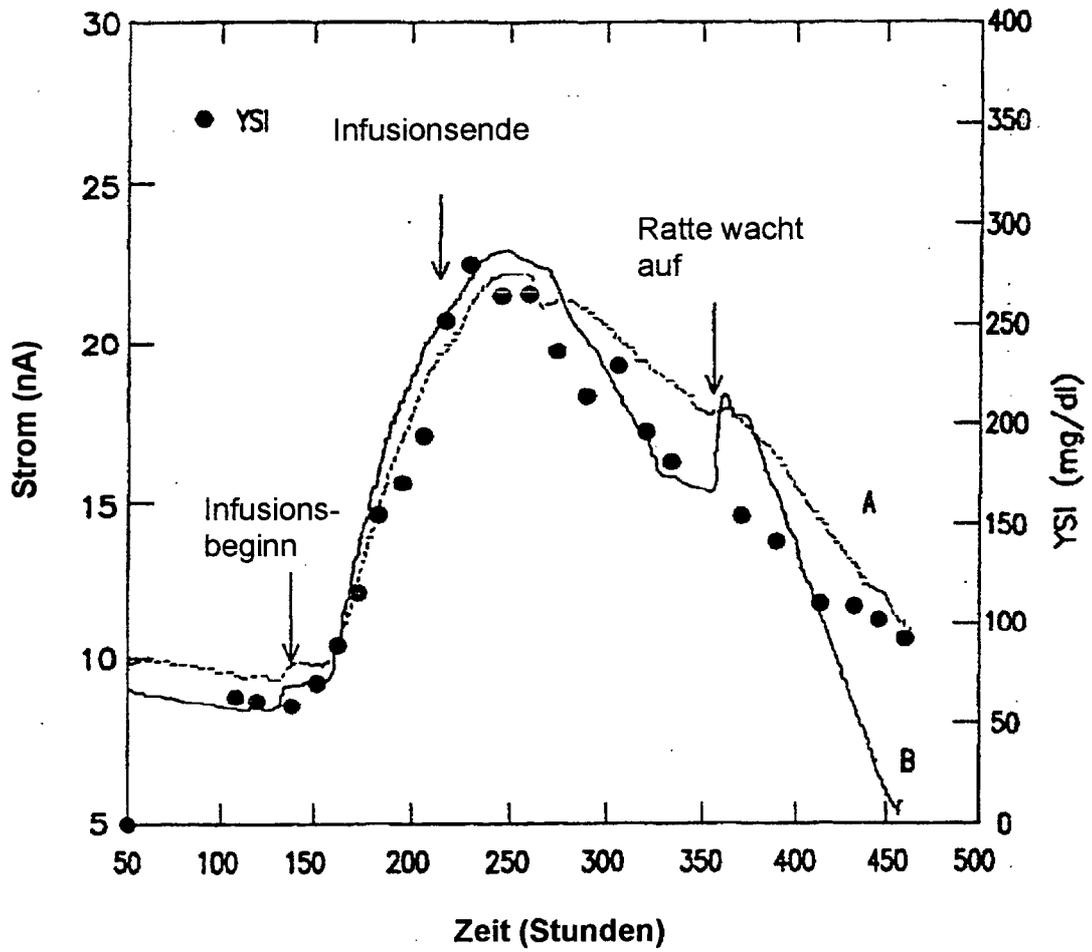


FIG. 7

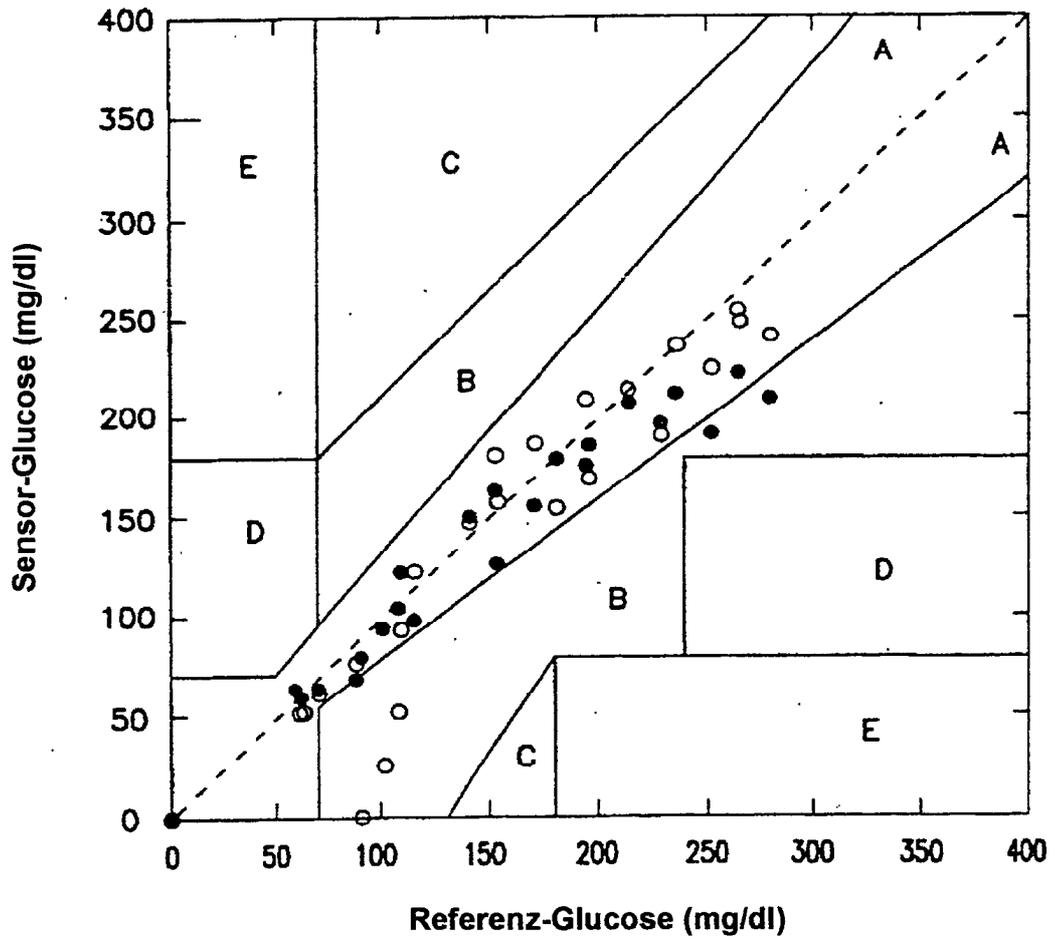


FIG. 8

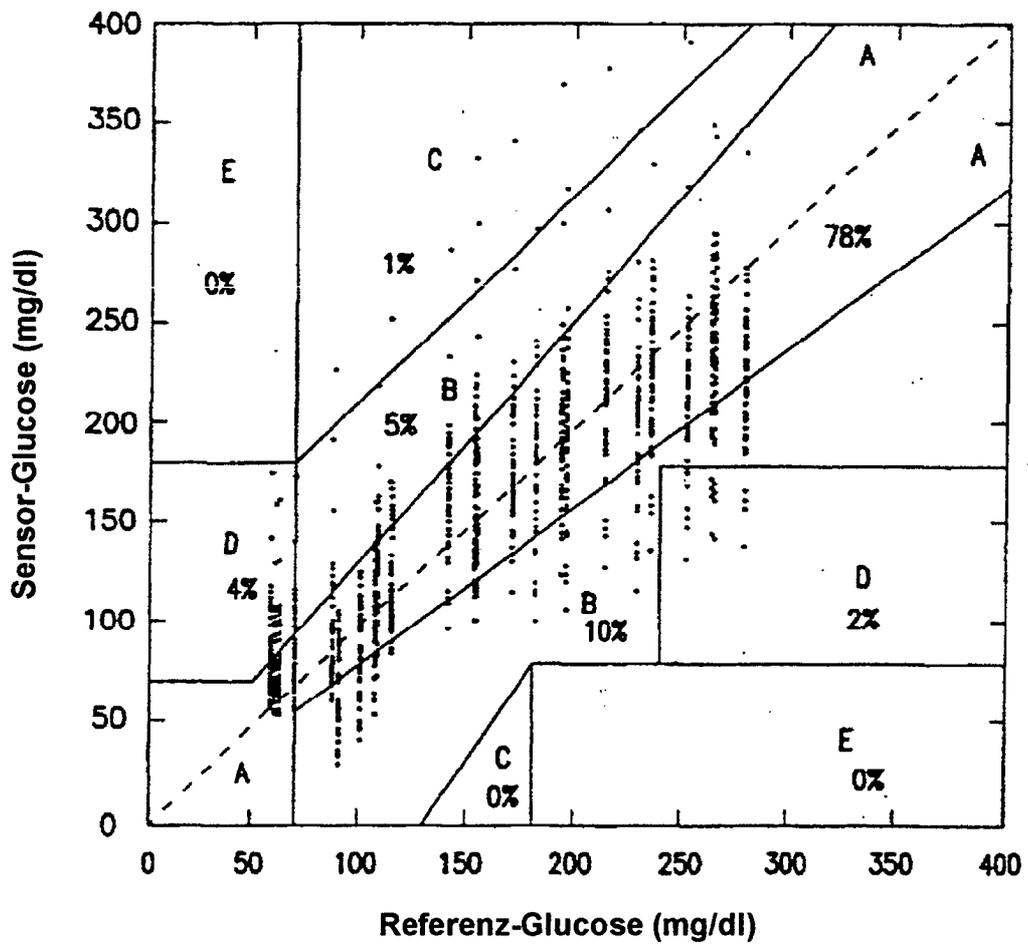


FIG. 9

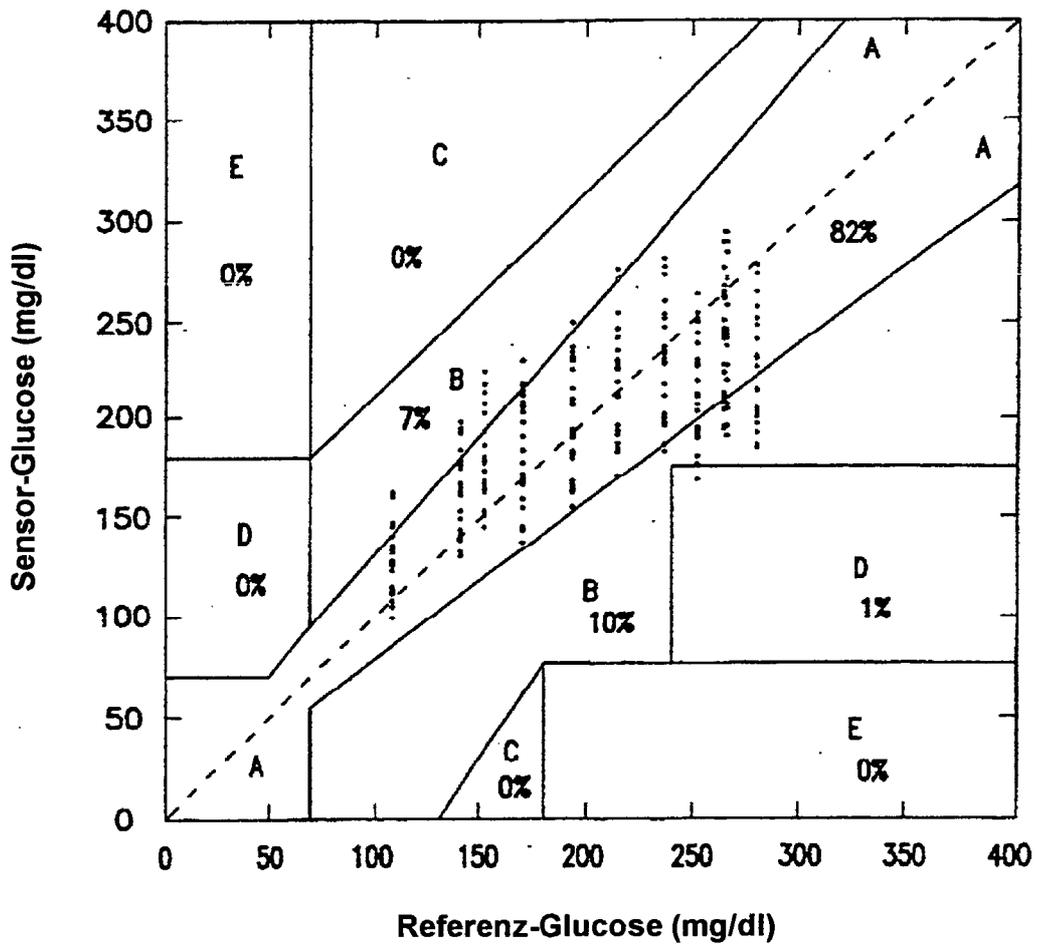


FIG. 10