



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 831**

51 Int. Cl.:

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99904203 .9**

96 Fecha de presentación : **21.01.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1057010**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2000**

54 Título: **Sensor basado en aberturas microfabricadas.**

30 Prioridad: **23.01.1998 US 12579**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2010

73 Titular/es: **Abbott Point of Care Inc.**
400 College Road East
Princeton, New Jersey 08540, US

72 Inventor/es: **Davis, Graham;**
Lin, Chao;
Lauks, Imants, R. y
Pierce, Raymond, J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 333 831 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

Sensor basado en aberturas microfabricadas.

5 **Campo técnico**

La presente invención versa acerca de la detección de moléculas (analitos) presentes en fluidos como sangre. Más en particular, la invención versa acerca de la detección de moléculas orgánicas *in vitro* utilizando un sensor amperométrico basado en uno catalítico. En realizaciones específicas de la invención, se pueden utilizar sensores formados mediante procedimientos de microfabricación y que tienen diseños novedosos de los dispositivos para llevar a cabo análisis de diversas moléculas, incluyendo la glucosa, el lactato, el colesterol, el piruvato, la sarcosina, la bilirrubina y la creatinina, presentes en la sangre y en otros fluidos corporales.

Antecedentes de la invención

El análisis de fluidos corporales como la sangre para la detección de niveles de diversas moléculas orgánicas es útil en el tratamiento de estados enfermos. Por ejemplo, diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por una mala regulación de los niveles de glucemia. Los tratamientos tradicionales para formas leves de esta enfermedad, incluyendo el inicio de la diabetes en edad adulta, han incluido dieta y ejercicio. Sin embargo, las formas más severas requieren la administración de insulina. Uno de los inconvenientes de la administración de insulina es la posibilidad de shock insulínico, provocado por una disminución rápida de los niveles de glucemia (desequilibrio de la glucosa) debida a una sobremedicación no intencional. Sin embargo, el shock insulínico es solo la manifestación más severa del desequilibrio de la glucosa. Las consecuencias del desequilibrio crónico de la glucosa (tanto por una sobremedicación como por una medicación insuficiente) están bien documentadas e incluyen daño a los vasos sanguíneos y diversos órganos corporales. La ceguera es común, al igual que lo es la pérdida de circulación en las extremidades.

La medición precisa de los niveles de glucemia permitiría al paciente modular la dosis de insulina y evitar los efectos de un desequilibrio crónico de la glucosa. Un ejemplo de un intento de la técnica anterior de la medición de glucosa es un sensor de glucosa como se da a conocer en la patente U.S. nº 3.542.662. En este dispositivo, hay dispuesta una membrana que contiene una enzima entre un fluido que está siendo analizado y un primer electrodo sensor de oxígeno. Hay dispuesta una membrana similar que no contiene una enzima entre el fluido y un segundo electrodo sensor de oxígeno de referencia. Se consume una cierta porción del oxígeno que se difunde a través de la membrana que contiene una enzima por medio de una reacción equimolar con glucosa catalizada por la enzima y por lo tanto no se encuentra disponible para ser detectado por medio del primer electrodo sensor de oxígeno. El segundo electrodo sensor de oxígeno de referencia en el que la membrana no incluye una enzima, determina la concentración de oxígeno que habría sido detectada si no se hubiese producido la reacción promovida por la enzima. La diferencia en el oxígeno detectado por los dos electrodos es indicativa de la concentración de glucosa.

Un problema con este dispositivo es que los niveles de oxígeno y de glucosa en la sangre no llegan a ser estequiométricos. En particular, la cantidad de oxígeno es menor que la necesaria para convertir toda la glucosa. Por lo tanto, el sensor puede llegar a tener una limitación de oxígeno y no responder de forma precisa a concentraciones elevadas de glucosa.

Para llevar los niveles de glucosa y de oxígeno a un equilibrio estequiométrico y crear de esta manera un dispositivo que da resultados precisos en el intervalo completo de las concentraciones de glucosa encontradas en la sangre, se ha propuesto diseñar sensores que reducen la cantidad de glucosa que alcanza la capa enzimática con respecto al oxígeno. Esto se podría conseguir en teoría al proporcionar una capa de membrana que sea significativamente más permeable al oxígeno que a la glucosa. La patente U.S. nº 4.650.547, descrita más completamente a continuación en el presente documento, proporciona una descripción general de este concepto.

Hasta este momento, la implementación de este enfoque ha sido difícil; sin embargo, debido a la incapacidad de la técnica anterior de controlar de forma precisa y reproducible la permeabilidad de la membrana. Sin tal control preciso, el flujo de glucosa que alcanza la capa enzimática puede no ser atenuado lo suficiente. También surgen problemas debidos a la presencia de moléculas interferentes, por ejemplo, ascorbato y urato. La determinación de los niveles de creatinina, que se utilizan para medir la función renal, es un ejemplo de un analito que requiere la eliminación de estos interferentes.

La patente U.S. nº 4.933.048 versa acerca de membranas permeables al agua e impermeables a los iones microfabricadas sobre una capa de hidrogel dejando una abertura para el intercambio de iones. La Figura 2 de la patente 4.933.048 ilustra una estructura en la que la abertura está formada al hacer que la capa de hidrogel se extienda más allá de la capa impermeable a los iones. De manera alternativa, la capa impermeable a los iones puede cubrir la capa completa de hidrogel con agujeros formados más allá del perímetro del electrodo subyacente (columna 7, línea 1). Se pueden formar agujeros por medio de una perforación con láser u otros procedimientos. La abertura se forma a una distancia desde el electrodo y la función de la pequeña abertura es proporcionar una unión de baja impedancia electrolítica.

Son conocidos sensores de glucosa que utilizan electrodos no microfabricados o “macro”. Véanse, por ejemplo, Fischer, U. y Abel, P., Transactions of the American Society of Artificial Internal Organs 1982, 28, 245-248 (Fischer

et al.); Rehwald, W., Pflugers Archiv 1984, 400, 348-402; las patentes U.S. n° 4.484.987; n° 4.515.584; y n° 4.679.562; y la solicitud de patente UK 2.194.843. Sin embargo, en estos documentos no se describe ningún aspecto del tratamiento de la película delgada.

- 5 Fischer *et al.* dan a conocer un sensor no microfabricado de glucosa con una membrana de Teflon® que está perforado de forma mecánica. La glucosa solo puede entrar a través de la perforación mientras que el oxígeno puede pasar a través del Teflon®, ajustando de esta manera la estequiometría en la capa enzimática y linealizando la respuesta. No existe enseñanza sobre la optimización o el control las dimensiones de la perforación. El documento de Fischer *et al.* tampoco se pronuncia acerca del uso de la microfabricación. Parece que la patente de la Alemania Oriental DD
10 282527 se corresponde a esta publicación pero no nombra a Fischer como el inventor.

- La patente U.S. n° 4.484.987 versa acerca de un sensor linealizado de glucosa basado en el concepto de proporcionar una capa con regiones hidrófobas en una matriz hidrófila en las que la glucosa puede permear ésta pero no aquella, y el oxígeno puede permear ambas regiones (véase la descripción de la Fig. 1 de la misma). En una realización alterna-
15 tiva, mostrada en la Fig. 4, una capa hidrófoba incluye pequeñas aberturas separadas a través de las cuales pueden pasar moléculas de glucosa. Sin embargo, la patente 4.484.987 no proporciona una enseñanza de cómo se controlan las dimensiones o la ubicación de las aberturas y no se pronuncia acerca de la microfabricación.

- La patente U.S. n° 4.650.547 da a conocer un sensor de glucosa en el que se coloca una membrana hidrófoba permeable al gas sobre una capa hidrófila que contiene una enzima, en la que solo se expone el perímetro o la superficie
20 del grosor del borde periférico de la capa hidrófila a la muestra (Fig. 5). La glucosa solo puede entrar en la capa hidrófila por el perímetro y se difunde en paralelo al plano de la capa, mientras que se puede suministrar oxígeno a través de la superficie completa de la capa hidrófoba (columna 6, línea 3).

- Anal Chem 57, 2351, 1985, enseña a fabricar un dispositivo cilíndrico relacionado en el que el espacio entre un electrodo de hilo de platino y un revestimiento cilíndrico permeable al gas está relleno de gel enzimático. Sin embargo, no enseña acerca de la microfabricación. La patente U.S. n° 4.890.620 versa acerca de una estructura similar y un procedimiento basado en una medición diferencial con un par de sensores. En la patente U.S. n° 4.703.756 se da a conocer una versión implantable.
30

- En cuanto al lactato y la creatinina, hay comparativamente poca bibliografía de sensores. En Clin. Chem. 29, 51, 1983, se propone un sensor amperométrico de creatinina que utiliza tres enzimas acopladas a la producción de peróxido de hidrógeno. Este documento también incluye una medición diferencial en la que un sensor mide la creatina y el otro mide la creatina más creatinina. Los sensores están fabricados utilizando un procedimiento de acetato de celulosa - glutaraldehído. Anal Chem 67, 2776, 1995 enseña la electropolimerización para inmovilizar las enzimas de la creatinina en un electrodo. En Anal Chim Acta 325, 161, 1996 se utiliza un hidrogel de sulfonato de poli (carbamoilo). Ninguno de los anteriores documentos enseña el uso de la microfabricación. Sin embargo, en Anal Chim Acta 319, 335, 1996 se da a conocer la microdistribución para establecer capas de gel enzimático en electrodos fabricados por medio de microfabricación.
40

- A pesar de los avances recientes y significativos en los sensores de analitos ejemplificados por las patentes U.S. n° 5.200.052 y n° 5.096.669, sigue existiendo una necesidad en la técnica de técnicas mejoradas de microfabricación y un mayor control del flujo de analito. Existe adicionalmente una necesidad en la técnica para reducir o eliminar el efecto de moléculas interferentes en la medición de los sensores.
45

- La medición de glucosa con un sensor microfabricado, descrito en la patente U.S. n° 5.200.051, transferida a i-STAT Corporation, utiliza una capa delgada contigua de atenuación de analitos (AA) fabricada de un copolímero de silicona para cubrir una capa enzimática. Proporciona una membrana que es libremente permeable al oxígeno pero que es deficientemente permeable a la glucosa. Esto permite una respuesta lineal en el intervalo completo de
50 concentraciones de glucosa encontradas en la sangre. Como deja claro la patente 5.200.051, se requiere oxígeno en cantidades estequiométricas para sostener la reacción enzimática, a pesar de los bajos niveles presentes generalmente en la sangre. El uso de esta membrana consigue este objetivo. La patente 5.200.051 incluye una presentación de las propiedades generales de una capa microfabricada de atenuación de analitos en la columna 12, comenzando en la línea 57, con una descripción detallada que comienza en la columna 38, línea 19. El procedimiento de decapamiento para la capa de AA se presenta a partir de la columna 58, línea 5. En las Figuras 7A y 8A de la patente 5.200.051 se ilustran estructuras con perímetros abiertos para medir glucosa, sin embargo, el transporte de glucosa se produce a través de una capa copolimérica de polisiloxano.
55

- Los sensores microfabricados por completo, es decir, sensores que están producidos en serie de manera uniforme por medio de técnicas de película delgada y procedimientos de microfabricación, no habían demostrado su utilidad en un entorno clínico antes de la patente 5.200.051. La patente 5.200.051 mostró que el grado de complejidad implicado en la producción en serie de biosensores factibles comercialmente era mucho más formidable de lo que las personas con un grado normal de dominio de la técnica habían percibido en su momento. Una preocupación importante era la compatibilidad de procedimientos físicos y químicos inherentemente rigurosos asociados con los procedimientos
60 existentes entonces de producción comercial de microfabricación.

Un artículo de Eleccion (Eleccion, M. Electronics 1986, 2 de junio, 26-30) describe el entonces estado actual de la técnica con respecto a microsensores y hace breves referencias a áreas activas de investigación incluyendo la detección

de iones, gases y materiales biológicos específicos. Se hace notar el progreso en el ámbito de los transistores de efecto de campo (FET) y se tratan los problemas y las limitaciones de los procedimientos actuales de fabricación.

También es importante hacer notar que en entornos clínicos actuales los profesionales médicos solicitan normalmente un análisis de uno o más componentes de un fluido biológico complejo como sangre completa. En la actualidad, dichos análisis requieren una cierta cantidad de tratamiento de la sangre completa, como filtración y centrifugado, para evitar la contaminación de los instrumentos o para simplificar mediciones subsiguientes. Con frecuencia, las muestras de sangre se envían a un laboratorio central remoto donde se llevan a cabo los análisis. Por lo tanto, los pacientes y los médicos están privados de información valiosa, que, en la mayoría de casos, no está disponible durante horas, a veces días. Evidentemente, se podrían imaginar ventajas sustanciales si se pudiesen llevar a cabo análisis sobre muestras sin diluir y si estuviesen disponibles instrumentos o sensores para llevar a cabo mediciones en tiempo real. Esto se puede conseguir ahora utilizando el sistema de análisis de sangre en el punto de atención descrito en el documento US 5.096.669 (transferido a i-STAT Corporation).

A pesar de los avances recientes y significativos en la tecnología de los sensores químicos como se ejemplifica en las patentes U.S. nº 5.200.051 y nº 5.096.669, sigue existiendo una necesidad en la técnica de técnicas mejoradas de microfabricación y un mayor control del flujo de analitos. Existe una necesidad adicional en la técnica para la reducción y la eliminación del efecto de moléculas interferentes en la medición del sensor.

Revelación de la invención

En consecuencia, es un aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que es capaz de controlar de manera precisa las tasas o los flujos de difusión de analitos.

Es otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que tiene una capa con una o más aberturas para el control de la tasa de flujo de difusión y para controlar la relación estequiométrica de reaccionante conjunto y del analito que entra en una capa enzimática.

Es otro aspecto de la invención proporcionar un sensor en el que las características de salida del mismo no estén limitadas por la concentración de reaccionante conjunto en una muestra, y en el que la respuesta del sensor sea esencialmente lineal en el intervalo completo de las concentraciones de analitos encontradas comúnmente en la muestra.

Es otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que es de un solo uso y que se puede almacenar en un estado seco, pero que experimenta una humectación rápida al entrar en contacto con un fluido calibrador.

Es aún otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que puede ser fabricado con un grado elevado de consistencia de dispositivo a dispositivo en términos tanto de dimensiones físicas como de características de salida.

Es aún otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que tiene una capa o barrera microfabricada de difusión de una geometría y carácter controlados, que es permeable a la molécula de un analito seleccionado, y que está interpuesta entre una abertura microfabricada y una capa que contiene un catalizador (opcionalmente una enzima) que puede interactuar con la molécula del analito.

Es aún otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico con una capa que filtra específicamente especies interferentes antes de que alcancen la capa enzimática.

Es otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que es de un solo uso y que puede estar incorporado en un cartucho desechable para probar muestras de sangre en ubicaciones de cabecera de cama y remotas.

Es aún otro aspecto de la invención proporcionar un sensor químico que incorpora técnicas ópticas electroquímicas y otras tecnologías de detección que son susceptibles a una fabricación sustancialmente plana, por ejemplo, un sensor de ondas acústicas.

Es aún otro aspecto de la invención proporcionar procedimientos para fabricar el sensor químico descrito anteriormente.

Estos aspectos, y otros expuestos con más detalle a continuación en el presente documento, se consiguen por medio de un dispositivo microfabricado para detectar una molécula de un analito en una muestra líquida que también contiene un reaccionante conjunto, por ejemplo oxígeno, que comprende: un elemento transductor; una primera capa que tiene un primer lado en contacto con la superficie de dicho elemento transductor, comprendiendo la primera capa una matriz de soporte que contiene al menos una enzima capaz de catalizar la conversión de dicho analito y del reaccionante conjunto en un producto de reacción detectable por el elemento transductor; una segunda capa en contacto con la primera capa, permitiendo la segunda capa el transporte de la molécula del analito y del reaccionante conjunto; y una tercera capa que cubre las capas primera y segunda, siendo permeable la tercera capa al reaccionante conjunto pero sustancialmente impermeable a la molécula del analito y que contiene al menos una abertura microfabricada que se extiende a través de la misma, que permite el transporte controlado del analito hasta la primera capa.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión completa de la invención, se debería leer la siguiente descripción detallada en conjunto con los dibujos, en los que:

La Figura 1 es un esquema de una realización de la invención, que ilustra una estructura en la que el sustrato (molécula del analito) solo puede entrar a la capa enzimática al pasar a través de una capa de difusión de borde plano, mientras que el oxígeno (reaccionante conjunto) pasa a través de una capa permeable al gas.

La Figura 2 es un esquema que ilustra otra realización en la que el sustrato solo puede entrar en la capa enzimática al pasar a través de una capa de eliminación de interferentes de borde plano, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas.

La Figura 3 es un esquema que ilustra otra realización en la que el sustrato solo puede entrar en la capa enzimática al pasar a través de las capas de eliminación de interferentes y de difusión de bordes planos, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas.

La Figura 4 es un esquema que ilustra una realización de la invención en la que el sustrato solo puede entrar a la capa enzimática al pasar a través de las capas de eliminación de interferentes y de difusión de bordes planos, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas. En esta realización la capa de eliminación de interferentes se extiende más allá de la capa permeable al gas.

La Figura 5 es un esquema que ilustra otra realización en la que el sustrato solo puede entrar en la capa enzimática al pasar a través de una abertura con forma de orificio o de ranura en la capa permeable al gas y en la capa de eliminación de interferentes, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas.

La Figura 6 es un esquema que ilustra otra realización en la que el sustrato solo puede entrar en la capa enzimática al pasar a través de una abertura con forma de orificio o de ranura en la capa permeable al gas y en la capa de eliminación de interferentes, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas.

La Figura 7 es un esquema que ilustra otra realización en la que el sustrato solo puede entrar en la capa enzimática al pasar a través de una abertura con forma de orificio o de ranura en la capa permeable al gas, en la capa de eliminación de interferentes y en la capa de difusión, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas.

La Figura 8 es un esquema que ilustra otra realización en la que el sustrato solo puede entrar en la capa enzimática al pasar a través de una abertura con forma de orificio o de ranura en la capa permeable al gas y en la capa de difusión, mientras que el oxígeno pasa a través de la capa permeable al gas.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la respuesta tanto a la creatina como a la creatinina de la realización de la Figura 3, en la que la capa de filtrado de interferentes está diseñada para eliminar creatina. La respuesta a concentraciones equimolares de creatinina y de creatina en el intervalo fisiológico es esencialmente lineal y muestra que se filtra aproximadamente el 90% de la creatina. Nótese que el aumento de la longitud y de la carga enzimática en la capa filtrante puede mejorar adicionalmente tras el filtrado de la creatina, aumentando de esta manera la especificidad del dispositivo a la creatinina.

La Figura 10 es un gráfico que muestra una comparación entre la realización de la Figura 3 y una prueba de creatinina disponible comercialmente no microfabricada en muestras reales de sangre tomadas de pacientes. Estos datos muestran que el nuevo dispositivo da resultados equivalentes y que, por lo tanto, puede ser utilizado clínicamente. Los datos se obtuvieron conforme a la enseñanza de la patente U.S. nº 5.112.455.

La Figura 11 es un gráfico que muestra la respuesta de un sensor de lactato de la invención.

La Figura 12 es un gráfico de la correlación del sensor de lactato con un análisis de lactato en muestras de sangre completa.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente invención versa acerca de sensores químicos completamente microfabricados útiles para medir constituyentes (analitos) en diversos fluidos. Aunque la mayor parte de la siguiente descripción detallada versa acerca del uso de sensores químicos para medir analitos encontrados en fluidos biológicos como la sangre, se debe comprender que la invención también abarca el uso de los sensores en aplicaciones no biológicas. Asimismo, se debe interpretar el término “analito” en términos generales, en el sentido de que abarca tanto especies o moléculas iónicas y no iónicas contenidas o disueltas en un fluido, incluyendo dispersiones. Los términos “sensores químicos” y “biosensores” se utilizan más adelante de manera intercambiable.

Los procedimientos de microfabricación de la invención establecen una pluralidad de películas delgadas y de estructuras relacionadas sobre una oblea plana de forma que permite la reproductibilidad y el control sobre las características dimensionales de las estructuras superpuestas. En la presente invención, dichos reproductibilidad y control

dimensional se han realizado a nivel de la oblea para la producción en serie de los sensores químicos, sensores que incorporan macromoléculas biológicamente activas y otros reactivos necesarios para la conversión de moléculas de analitos seleccionados en especies más fácilmente detectables.

La presente invención también versa acerca de procedimientos novedosos de análisis electroquímico y acerca de biosensores completamente microfabricados novedosos útiles para determinar la presencia y/o la concentración de especies biológicas (analitos) de interés. La invención también versa acerca de un sustrato o de un analito que no experimenta una oxidación o una reducción directa electroquímica detectable pero que experimenta una reacción con un convertidor de sustrato, generalmente una enzima, que produce cambios en la concentración de especies electroactivas o detectables de forma óptica. Se miden estos cambios y se relacionan proporcionalmente a la concentración del analito de interés. Además, la invención versa acerca de procedimientos para fabricar el sensor.

El sensor químico completamente microfabricado de la presente invención comprende múltiples elementos. Lo que sigue es una descripción general del procedimiento para formar el sensor químico de la invención.

El elemento transductor está formado en una superficie sustancialmente plana, generalmente una oblea de sílice o de un material ópticamente transparente. Para los biosensores basados en la detección óptica, el elemento transductor puede ser la superficie ópticamente transparente sobre la que se añaden las otras capas. Son bien conocidos en la técnica los medios para suministrar longitudes de onda de excitación y para adaptar detectores ópticos a dichas superficies. Para los biosensores basados en la detección electroquímica, por ejemplo amperométrica, potenciométrica y conductimétrica, se dan a conocer los medios para la microfabricación de estos sensores base o elementos transductores sobre una superficie plana en la patente U.S. nº 5.200.051. Entonces, se establecen las estructuras adicionales sobre el elemento transductor resultante, estructuras adicionales que pueden incluir una película sólida semipermeable o una capa permselectiva capaz de actuar como una barrera contra especies químicas interferentes mientras que permite el transporte de restos químicos detectables de interés menor. Normalmente, estos restos químicos detectables son moléculas electroactivas y pueden incluir especies fónicas de bajo peso molecular, oxígeno, peróxido de hidrógeno y pequeñas moléculas mediator de redox conocidas en la técnica. De manera alternativa, los restos químicos detectables pueden ser tintes u otras especies ópticamente detectables utilizadas generalmente en ensayos enzimáticos y que son bien conocidas en la técnica.

La película sólida semipermeable puede comprender adicionalmente materiales, compuestos o moléculas que pueden servir para sensibilizar el sensor base a una especie iónica preseleccionada (por ejemplo, ión de amonio). Lo más sobresaliente son las matrices de soporte descritas en la presente invención, matrices que poseen las características físicas y químicas necesarias para soportar las diversas moléculas bioactivas que constituyen los medios principales para convertir los analitos particulares en una muestra analítica dada en especies detectables y/o que pueden ser medidas cuantitativamente en el elemento transductor. Se dan a conocer las técnicas para localizar o modelar dichas matrices en ciertas áreas deseadas del biosensor completamente microfabricado que permiten el control óptimo de las características dimensionales de las biocapas al igual que la versatilidad para acomodar un amplio abanico de moléculas bioactivas.

Además, la presente invención también da a conocer materiales que sirven, en realizaciones particulares del presente biosensor, de estructuras superpuestas que funcionan como una barrera para el transporte de especies de analitos seleccionados, que se encuentran presentes en concentraciones elevadas en la muestra. Dichas capas de la barrera de analitos (AB) permiten una respuesta lineal del sensor en un amplio intervalo de concentraciones de analitos por medio de la presencia de aberturas de dimensiones definidas y colocadas en ubicaciones específicas, que permiten un flujo de difusión controlado de analito. Además, la capa AB superpuesta, que está derivada preferentemente de un copolímero de siloxano-no siloxano, es capaz de excluir moléculas muy grandes u otros constituyentes contaminantes de la muestra cuyo contacto directo con las estructuras subyacentes tendría como resultado la interferencia o el ensuciamiento y una reducción consiguiente en la fiabilidad del biosensor. Los materiales adecuados para formar la capa de AB se describen en la patente U.S. nº 5.200.051, incluyendo los diversos copolímeros de siloxano-no siloxano expuestos en la misma. Además de estos copolímeros, se pueden utilizar diversos poliuretanos, acetato de celulosa, polímeros de tetrafluoretileno, fotorresistente negativo orgánico, fotorresistente positivo orgánico, poliimidas y poliimidas fotoformables.

Si la capa de AB tiene la estructura y la composición apropiadas, también puede funcionar como una membrana permeable al gas. En ciertas realizaciones de la presente invención, tal membrana permeable al gas tiene la ventaja práctica de permitir que solo pasen a través de la misma moléculas muy pequeñas. Estas moléculas pueden actuar como reaccionantes conjuntos en reacciones en las que se convierten las moléculas de analitos en especies detectables en el elemento transductor.

La capa de AB de la presente invención está establecida en la oblea del sustrato o en cualquier estructura intermedia con el tipo de control dimensional, localizado y geométrico que es compatible con otros pasos en el procedimiento global de microfabricación de la presente invención y con la idea de una producción en serie automatizada a nivel de oblea de los biosensores.

Bastante separada de la capa de AB mencionada anteriormente, entre las capas que se pueden establecer por medio de los procedimientos de la presente invención hay una película sólida que es capaz de funcionar como una película transmisiva sensible al peso molecular. Dependiendo de la composición y del grosor final de esta película sólida

semipermeable, también denominada una capa permselectiva, las moléculas que tienen pesos moleculares superiores a un umbral dado pueden ser excluidas de forma efectiva de entrar y difundirse a través de dicha película. Como ilustración general de la función y de la utilidad de esta capa permselectiva, las moléculas que tienen un peso molecular de aproximadamente 120 o más son bloqueadas de manera efectiva por medio de una película sólida que tiene un grosor de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 nm. Se pueden obtener distintos grados de control sobre el tamaño de las moléculas excluidas y de las tasas de transporte de moléculas más pequeñas que son capaces de difundir a través de la película sólida por medio de películas sólidas que tienen un grosor en el intervalo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 nm. Con ciertos tipos de materiales, estas capas permselectivas pueden ser tan delgadas como 1 nm o pueden ser tan gruesas como 100 nm.

En una realización preferente de un biosensor amperométrico de glucosa, se pulveriza iónicamente una capa de iridio sobre una oblea de sílice y entonces se modela utilizando procedimientos establecidos de microfabricación para formar un electrodo (con un diámetro de 200 μm) como el elemento transductor. Entonces, se modela una capa permselectiva que permite el transporte de peróxido de hidrógeno sobre el electrodo de iridio conforme a la patente U.S. n° 5.212.050. Entonces, se reviste por centrifugado una mezcla de gelatina dicromada fotoformable y de enzima glucosa oxidasa sobre la oblea y se modela para formar una capa de un grosor de aproximadamente 1,0 μm directamente sobre el electrodo, conforme a la enseñanza de la patente U.S. n° 5.200.051. Esto se sigue de la modelación de un segundo canal de difusión de gelatina (o capa con un grosor de aproximadamente 1,0 μm) que cubre parcialmente la capa enzimática y se extiende 50 μ más allá del perímetro de la capa enzimática. Entonces, se reviste por centrifugado una capa gruesa de AB formada de un copolímero de siloxano-no siloxano sobre la oblea y se modela conforme al procedimiento dado a conocer en la patente U.S. n° 5.200.051 para establecer una capa que encierra las dos primeras capas.

Sin embargo, a diferencia de las realizaciones descritas en la patente 5.200.051, el grosor de la capa de AB (por ejemplo, aproximadamente 1,0 μm) es suficiente como para eliminar la permeación de glucosa detectable directamente a través de esta capa. Sin embargo, la capa de AB sigue siendo libremente permeable al oxígeno. Entonces, se establece una capa de recubrimiento fabricada de gelatina dicromada de la misma forma como se describe en la patente 5.200.051, excepto que se utiliza un diseño novedoso de máscara para proporcionar las aberturas que van a ser formadas en ubicaciones específicas en la capa de AB. Cuando se decapó la capa de AB de la manera estándar dada a conocer en la patente 5.200.051, se crean pequeñas aberturas (por ejemplo, de un diámetro de 5 μm) en la capa de AB en la región por encima de la capa de barrera de difusión (pero no en la región directamente encima de la capa enzimática) a través de la que puede pasar la glucosa. Preferentemente, el tamaño de la o de las aberturas es de al menos aproximadamente 0,01 μm por 1,0 μm (rectangular) o, si es circular, tienen un diámetro desde aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . Las aberturas rectangulares pueden ser desde aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 20 μm en el lado corto y desde aproximadamente 10 μm hasta aproximadamente 3000 μm en el lado largo. De forma deseable, las dimensiones de las aberturas rectangulares son desde aproximadamente 3 μm hasta aproximadamente 12 μm en un lado corto y desde aproximadamente 50 μm hasta aproximadamente 2000 μm en un lado largo. En una realización preferente, las aberturas rectangulares tienen dimensiones de aproximadamente 5 $\mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m}$.

Las aberturas también pueden formar un anillo, cuyo grosor puede variar de forma similar a las dimensiones del diámetro dadas anteriormente.

En ciertas circunstancias, es deseable que una porción de la capa de difusión también contenga una o más enzimas que puedan eliminar moléculas interferentes específicas, por ejemplo ascorbato y urato. Por ejemplo, la capa de difusión puede incorporar ascorbato oxidasa o uricasa o similares.

El biosensor de la invención puede ser hecho funcionar de forma amperométrica en conjunto con un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata que es externo al dispositivo o está incorporado adyacente al electrodo de iridio como se da a conocer en la patente U.S. n° 5.200.051. En la patente U.S. n° 5.112.455 se dan a conocer medios para activar los sensores microfabricados y para obtener datos fiables en muestras acuosas y de sangre completa. En general, esto supone comparar la respuesta del sensor con un electrodo de referencia tanto en un fluido calibrador como en un fluido de muestra, poniendo en relación las mediciones de la señal y determinando luego la concentración de las especies de analitos en el fluido de la muestra en base a la relación de la señal. El dispositivo descrito en el presente documento proporciona mediciones fiables de glucosa en sangre venosa completa, que tiene en general una concentración muy baja de oxígeno (reaccionante conjunto) (ca. 50 μM) en el intervalo completo de concentraciones de glucosa (molécula del analito) encontradas en las muestras de diabéticos (ca. 1-30 mM).

Con estos nuevos dispositivos, es práctico que la o las aberturas tengan un tamaño milimétrico solamente en una o en ambas dimensiones x-y. Por lo tanto, por ejemplo, una abertura puede ser un poro circular de 5 μm , una ranura de dimensiones de 5 $\mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m}$, o un anillo de 5 μm de ancho y que tiene un perímetro de 1000 μm . Además, la o las aberturas pueden estar colocadas directamente encima del elemento transductor, o adyacentes al elemento transductor o formadas al modelar la capa de AB para dejar un borde expuesto en el perímetro externo de la capa de difusión.

Otra alternativa es fabricar la abertura en la dimensión z-x o z-y. Esto se puede conseguir al modelar la capa de AB para dejar un borde perimétrico expuesto de la segunda capa. Esto permite que la altura (grosor, dimensión z) de la segunda capa controle una dimensión de la abertura mientras que la longitud del perímetro expuesto controla la otra dimensión. Como la segunda capa puede ser revestida por centrifugado sobre una oblea con un grosor controlado

en el intervalo de 0,01 μm hasta 2 mm (que es bien conocido en la técnica de microfabricación), es posible utilizar este procedimiento para fabricar aberturas esencialmente rectangulares en los planos z-x y z-y tan pequeños como 0,01 μm en la dimensión z y 1,0 μm en la dimensión x. Esto proporciona medios adicionales para controlar el flujo de una molécula del analito hasta la capa catalizadora. Las dimensiones particulares de la o de las aberturas pueden ser determinadas por un experto y son una función de, entre otros, el flujo deseado de analitos y de la estequiometría de la reacción.

El control dimensional preciso a estas geometrías solo es posible utilizando la microfabricación. Se pueden utilizar fotorresistentes orgánicos negativos y positivos, poliuretano, acetato de celulosa, poliimida y poliimida fotoformable y similares en vez de un copolímero de siloxano-no siloxano para actuar como capas de AB permeables al reaccionante conjunto e impermeables al analito. Cuando estos materiales son fotoformables, se puede formar una abertura directamente mediante exposición y desarrollo. De lo contrario, se requiere un procedimiento de modelación como para el copolímero de siloxano-no siloxano como se ha descrito anteriormente.

Además de la gelatina dicromada y del cloruro férrico que contiene gelatina y otros fotoactivadores, como se describe en la patente U.S. n° 5.200.051, también es posible utilizar diversos otros materiales de hidrogel, por ejemplo, un material fotoformable de alcohol de polivinilo para formar tanto la capa enzimática como la capa de difusión (o de filtrado de interferentes). Para ciertas enzimas, por ejemplo creatinasa, ésta permite la retención de mayores niveles de actividad.

La teoría general aplicable a los biosensores es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, la patente U.S. n° 4.484.987 da a conocer una ecuación que pone en relación las concentraciones a granel con las de la capa enzimática. A diferencia de la patente 4.484.987, las realizaciones de la presente invención incluyen una capa de difusión de analitos. Si un coeficiente de difusión, D, para una molécula típica de analito es de 10-6 cm-2s-1 en una capa de gelatina o de alcohol de polivinilo, la longitud de difusión, l, puede estimarse a partir de $l = (2Dt)^{1/2}$, lo que supone que estas moléculas se pueden difundir aproximadamente 10 μm en el primer segundo en el plano de la capa. Nótese que el coeficiente de difusión puede controlarse por medio del grado de reticulación en la capa, por ejemplo más o menos fotoiniciador o fotorreticulador en la matriz, o por medio de un tratamiento subsiguiente con glutaraldehído u otro reticulador. Un procedimiento para aumentar la porosidad y aumentar el coeficiente de difusión es añadir albúmina u otra proteína globular a la matriz antes de la modelación. Por lo tanto, al cambiar la longitud, el grosor y la composición de la capa de difusión, es posible controlar el tiempo de respuesta y el grado en el que exhibe el dispositivo una respuesta lineal extendida de salida a la molécula del analito incluso a niveles bajos de reaccionante conjunto. Por ejemplo, se ha descubierto que se puede utilizar de manera ventajosa una capa plana de difusión de 10-200 μm entre la abertura y la capa enzimática sobre el elemento transductor. Es solo mediante el uso de procedimientos de microfabricación, a diferencia de los enfoques aplicados por la técnica anterior, que es posible alcanzar un control preciso y un nivel elevado de reproducibilidad de dispositivo en dispositivo necesarios para una utilidad comercial.

En las Figuras se muestran varias realizaciones de la invención. La Figura 1 ilustra una primera realización en la que se indica un biosensor en su conjunto por el número 10. Se coloca un elemento transductor 12 sobre una superficie plana 14 y se coloca una capa enzimática 16 sobre el elemento transductor 12. Rodeando la capa enzimática 16 y el elemento transductor 12 hay una capa 18 de difusión que tiene una superficie 20 de borde. Colocada sobre la capa enzimática 16 y sobre la capa 18 de difusión hay una capa 22 de barrera de analitos. Se ubica un recubrimiento 24, utilizado en aberturas fotoformadas en la capa 22 de barrera de analitos, sobre la capa 22. El analito, como glucosa o creatinina, al igual que oxígeno, se difunde a través de la capa 18 de difusión a través de la superficie 20 del borde. Sin embargo, la capa 22 de barrera de analitos solo permite que pase el oxígeno (y otras moléculas de tamaño similar) a través de ella, mientras que evita que pasen moléculas más grandes, incluyendo el analito. Por lo tanto, se produce la difusión de oxígeno a la capa enzimática 16 sobre un área superficial mucho mayor de lo que lo hace la difusión de analito, compensando con ello la menor concentración de oxígeno en una muestra de sangre en comparación con la concentración del analito. Por lo tanto, el oxígeno y el analito se encuentran en una concentración sustancialmente estequiométrica en la capa enzimática 16. La capa 22 de AB contiene una o más aberturas (no mostradas) que exponen la superficie de la capa enzimática 15 y/o de la capa 18 de difusión al analito.

En la Figura 2 se ilustra una modificación del biosensor de la Figura 1. En esta realización se sustituye la capa 18 de difusión de la Figura 1 por una capa 30 de eliminación de interferentes que contiene una o más enzimas o catalizadores que reaccionan con moléculas que tienen un potencial para interferir con el análisis. La capa 30 de eliminación de interferentes puede estar construida de los mismos materiales que los de la capa 18 de difusión, proporcionando de esta manera la función doble de una capa de difusión y de eliminación de interferentes.

En una realización preferente, los diversos elementos del sensor de la Figura 2 comprenden un sensor que incluye un electrodo de metal noble que funciona como un electrocatalizador para la electrooxidación de H₂O₂; una capa de gamma aminosilano que funciona para evitar que especies activas de redox que son mayores que el peróxido de hidrógeno, por ejemplo ascorbato y urato, alcancen la superficie del electrodo; una capa enzimática para convertir moléculas reactivas no electroquímicas del analito en peróxido de hidrógeno; una capa de difusión; y una capa de AB de aproximadamente 0,1-2 μm de grosor que elimina las moléculas de analitos como la glucosa y la creatinina, que permean directamente en la capa enzimática, pero que sigue siendo libremente permeable al oxígeno y al agua. Se establece una capa de recubrimiento, de la misma forma que en el procedimiento estándar de glucosa pero la máscara contempla que se formen aberturas en ubicaciones específicas. Cuando se decapó la capa de AB de la forma estándar, las aberturas están fabricadas en la capa de AB a través de la cual pueden pasar las moléculas de analitos. Por lo

ES 2 333 831 T3

tanto, en este diseño, la difusión del sustrato en la capa enzimática se regula por medio del número y el tamaño de las aberturas en la capa de AB y por medio de la longitud de la vía de difusión.

La Figura 3 ilustra una realización similar a las Figuras 1 y 2 excepto que incluye tanto una capa 40 de difusión como una capa 42 de eliminación de interferentes.

La realización de la Figura 4 es similar a la de la Figura 3 en el sentido de que incluye capas separadas de difusión y de eliminación de interferentes. Sin embargo, en esta realización, la capa 50 de eliminación de interferentes se extiende sobre los bordes de la capa 52 de AB y del recubrimiento 54 y cubre una porción de la superficie superior 56 del recubrimiento 54.

En la realización de la Figura 5, la capa 60 de AB cubre la capa enzimática 62. Se proporciona un orificio 64 a través del recubrimiento 66 y de la capa 60 de AB para permitir que el sustrato entre en contacto con la capa 68 de difusión. En esta realización, el electrodo 66 y la capa enzimática 62 están colocados hacia fuera desde la capa 68 de difusión.

La Figura 6 ilustra una realización similar a la Figura 5 excepto que la capa de difusión está sustituida por una capa 70 de eliminación de interferentes.

La Figura 7 ilustra una realización configurada similar a las Figuras 5 y 6 y que incorpora tanto una capa 80 de eliminación de interferentes como una capa 82 de difusión.

La Figura 8 contempla una capa 90 de eliminación de interferentes colocada sobre el recubrimiento 92 y que tiene una capa 94 de AB que cubre la porción del borde de la capa enzimática 96.

Los parámetros del procedimiento se expanden sobre los dados a conocer en el documento US 5.200.051. Se usan tanto electrodos de platino como de iridio (200-360 μm de diámetro) con los procedimientos estándar de gamma aminosilano del documento US 5.212.050. Se inmovilizó glucosa oxidasa en una capa de gelatina dicromada con un grosor de 0,1-2,0 μm . Se optimizó el tiempo estándar de decapamiento de AB para garantizar que no se decapa insuficientemente ni en demasía la abertura, es decir, prever un control preciso del diámetro de la abertura.

La determinación de creatinina es un buen ejemplo de un analito que requiere una capa filtrante para eliminar interferentes. La medición de creatinina utiliza tres enzimas para convertir creatinina en peróxido de hidrógeno. Estas enzimas son CNH (creatinina a amidohidrolasa, también denominada creatininasa), CRH (creatina a aminohidrolasa, también denominada creatinasa) y SAO (sarcosina oxidasa) que catalizan las siguientes reacciones, respectivamente.

creatinina ----> creatina + H₂O

creatina ----> sarcosina + urea

sarcosina + oxígeno ----> glicina + formaldehído + H₂O₂

La reacción se complica por el hecho de que la sangre contiene de forma natural tanto creatinina como creatina, por lo tanto es necesario eliminar la creatina endógena antes de que se pueda medir la creatinina de forma precisa. Los expertos en la técnica comprenderán que cualquier cantidad de creatinina que alcanzase la capa enzimática produciría una señal errónea de background en la determinación de creatinina. Este problema se soluciona al crear una capa filtrante de la creatina como parte del sensor de creatinina.

Por ejemplo, el dispositivo mostrado en la Figura 3 es un sensor de creatinina que tiene una capa de difusión y una capa de eliminación de interferentes para la creatina. Su función es evitar la difusión de la creatina endógena a la capa enzimática al convertirla en sustancias no interferentes. Esta capa contiene las enzimas CRH, SAO y catalasa (CAT). Ésta convierte peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, evitando de esta manera que el peróxido de hidrógeno se difunda en el elemento transductor. Nótese que esta combinación de enzimas permite que la creatinina se difunda a través de la capa filtrante sin reacción, y alcance de esta manera la capa enzimática.

En este ejemplo, las enzimas en ambas capas están inmovilizadas en un alcohol de polivinilo fotoformable que porta grupos estrilpiridinio (PVA-SbQ). La capa enzimática está limitada dentro del perímetro del electrodo subyacente de platino, mientras que la capa de difusión y la capa de eliminación de interferentes se extienden más allá (20 a 50 μm) del perímetro del electrodo. Entonces, se reviste por centrifugado una capa (aproximadamente 1-2 μm) de AB sobre estas capas. El grosor de la AB es suficiente como para eliminar la permeación de creatinina (y de creatina) en la capa enzimática, pero para seguir siendo libremente permeable al oxígeno y al agua. Entonces, se modela la capa de AB de forma que no encierra completamente la capa filtrante, proporcionando de esta manera una vía de difusión para la creatinina (y la creatina). El procedimiento completo de microfabricación de creatinina se describe en la tabla adjunta.

En otra realización, en la que se requieren reactivos distintos de una enzima, por ejemplo ATP, glicerol, una molécula mediadora de redox, una molécula orgánica de tinte, en las capas enzimáticas o filtrantes para el funcionamiento fiable del sensor, se pueden introducir estos materiales como parte del procedimiento de deposición de la matriz de la

ES 2 333 831 T3

capa enzimática o filtrante, impregnada después de que se hayan establecido las capas pero antes de la deposición de la capa de AB, adsorbida a través de las aberturas microfabricadas después de ser formadas, o incluso adsorbida a través de las aberturas como parte del procedimiento de calibración antes de poner en contacto el sensor con la muestra.

- 5 La conversión de lactato es catalizada por la enzima lactato oxidasa y produce peróxido de hidrógeno, que se detecta en un electrodo de platino.

10 En una realización preferente, el electrodo de platino (diámetro de $360\ \mu\text{m}$) está revestido con una capa (descrita anteriormente) de gamma aminosilano sobre la que se modela una capa enzimática (diámetro de $360\ \mu\text{m}$, alcohol de polivinilo que porta grupos estirilpiridinio y lactato oxidasa). Se modela una capa (diámetro de $560\ \mu\text{m}$, grosor de $1,0\ \mu\text{m}$) de difusión sobre la capa enzimática y se extiende más allá de su perímetro. Se modela una capa de siloxano-siloxano para encerrar la estructura completa, excepto por una abertura anular concéntrica (anchura de $40\ \mu\text{m}$) que permite que el lactato entre en la capa de difusión $40\ \mu\text{m}$ más allá del perímetro de la capa enzimática. La Figura 11 muestra que la respuesta del sensor es esencialmente lineal en muestras acuosas que se corresponden con el intervalo de concentraciones de lactato encontradas en muestras fisiológicas. La Figura 12 muestra que el sensor proporciona resultados que se correlaciona con una prueba de lactato establecido comercialmente en muestras de sangre completa.

A los expertos en la técnica les resultarán evidentes otras realizaciones relacionadas, basadas en la revelación.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfabricado para detectar una molécula de analito en una muestra que contiene un reaccio-
nante conjunto que comprende

(a) un elemento transductor (12),

(b) una primera capa (16) que entra en contacto con la superficie de dicho elemento transductor (12), com-
prendiendo dicha primera capa (16) una matriz de soporte que contiene al menos un catalizador capaz de
catalizar la conversión de dichos analito y reaccionante conjunto en un producto de reacción detectable por
dicho elemento transductor (12),

caracterizado porque

(c) hay una segunda capa (18; 30; 40, 42; 42, 50; 62, 68; 70; 80, 82; 90) en contacto con dicha primera capa
(16), permitiendo dicha segunda capa (18; 30; 40, 42; 42, 50; 62, 68; 70; 80, 82; 90) el transporte de dicha
molécula de analito y reaccionante conjunto, y

(d) una tercera capa (22; 52; 94, 96) que cubre dichas capas primera y segunda, siendo dicha tercera capa (22;
52; 94, 96) permeable a dicho reaccionante conjunto pero sustancialmente impermeable a dicha molécula
de analito y conteniendo al menos una abertura microfabricada que se extiende a través de la misma, lo que
permite el transporte de dicho analito a dicha primera capa (16).

2. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la segunda capa se extiende
más allá del perímetro de la primera capa.

3. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la al menos una abertura en
la tercera capa se extiende hasta la primera capa.

4. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la abertura se encuentra en el
plano de la tercera capa.

5. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la abertura se encuentra en el
perímetro de la segunda capa.

6. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 5, en el que la abertura en la segunda
capa es de al menos aproximadamente 0,01 μm por 1,0 μm .

7. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la al menos una abertura en
dicha tercera capa se extiende hasta una superficie de la segunda capa.

8. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende una pluralidad de
aberturas en dicha tercera capa.

9. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 8, en el que la pluralidad de aberturas son
sustancialmente circulares.

10. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el diámetro de la abertura es
desde aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm .

11. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el diámetro de dicha abertura
es desde aproximadamente 2 μm hasta aproximadamente 10 μm .

12. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el diámetro de dicha abertura
es de aproximadamente 5 μm .

13. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la abertura es rectangular.

14. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 13, en el que la abertura tiene dimensio-
nes desde aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 20 μm en un lado corto y desde aproximadamente 10 μm
hasta aproximadamente 3000 μm en un lado largo.

15. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 13, en el que la abertura tiene dimensio-
nes desde aproximadamente 3 μm hasta aproximadamente 12 μm en un lado corto y desde aproximadamente 50 μm
hasta aproximadamente 2000 μm en un lado largo.

ES 2 333 831 T3

16. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 13, en el que la abertura tiene dimensiones de aproximadamente $5\text{ }\mu\text{m}$ en un lado corto y aproximadamente $1000\text{ }\mu\text{m}$ en un lado largo.
17. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la pluralidad de aberturas son sustancialmente anulares.
18. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 7, que comprende una pluralidad de aberturas que se extienden hasta una superficie de la segunda capa.
19. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la primera capa comprende un material fotoformable en la que se selecciona el componente de la matriz del grupo constituido por un material proteínico, una gelatina, un hidrogel, un polímero orgánico hidrófilo y alcohol de polivinilo, y se selecciona el material fotoactivo del grupo constituido por dicromato, cloruro férrico, una sal de estirilpiridinio y una sal de estilbizonio.
20. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la segunda capa comprende un material fotoformable en la que se selecciona el componente de la matriz del grupo constituido por un material proteínico, una gelatina, un hidrogel, un polímero orgánico hidrófilo y alcohol de polivinilo, y se selecciona el material fotoactivo del grupo constituido por dicromato, cloruro férrico, una sal de estirilpiridinio y una sal de estilbizonio.
21. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el catalizador es una enzima o una combinación de enzimas.
22. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 21, en el que la enzima o la combinación de enzimas están seleccionadas del grupo constituido por glucosa oxidasa, lactato oxidasa, piruvato oxidasa, colesterol oxidasa, bilirrubina oxidasa, sarcosina oxidasa, creatinasa y creatininas colesterol esterasa.
23. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la segunda capa comprende una capa fotoformable de gelatina o de alcohol de polivinilo.
24. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la tercera capa está seleccionada del grupo constituido por un copolímero de silicona, poliuretano, acetato de celulosa, un copolímero de siloxano-no siloxano, un polímero de tetrafluoretileno, un fotorresistente negativo orgánico, un fotorresistente positivo orgánico, una poliimida o una poliimida fotoformable.
25. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el reaccionante conjunto es oxígeno.
26. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la molécula de analito está seleccionada del grupo constituido por glucosa, creatina, colesterol, lactato, piruvato, sarcosina o bilirrubina.
27. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la primera capa tiene un grosor desde aproximadamente $0,01\text{ }\mu\text{m}$ hasta aproximadamente 2 mm , la segunda capa tiene un grosor desde aproximadamente $0,01\text{ }\mu\text{m}$ hasta aproximadamente 2 mm , y la tercera capa tiene un grosor desde aproximadamente $0,01\text{ }\mu\text{m}$ hasta aproximadamente 2 mm .
28. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la reacción catalizadora produce un producto de reacción detectable electroquímicamente.
29. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 28, en el que el producto de reacción electroquímicamente detectable está seleccionado del grupo constituido por oxígeno, peróxido de hidrógeno, un mediador de redox, dióxido de carbono, ión de hidrógeno, ión de potasio, ión de sodio, ión de amonio, ión de calcio, ión de fluoruro.
30. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el elemento transductor es un electrodo amperométrico, potenciométrico o conductimétrico.
31. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la reacción catalizadora produce un producto de reacción detectable ópticamente.
32. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho elemento transductor es un detector óptico.
33. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la segunda capa cubre completamente, cubre parcialmente o entra en contacto con el borde de la primera capa.
34. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la segunda capa incorpora uno o más reactivos para convertir una o más especies interferentes en especies no interferentes.

35. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en la reivindicación 1, en el que una porción de la segunda capa que no está en contacto directo con la primera capa incorpora uno o más reactivos para convertir una o más especies interferentes en especies no interferentes.

36. Un dispositivo microfabricado como se reivindica en las reivindicaciones 34 y 35, en el que se seleccionan uno o más reactivos del grupo constituido por ascorbato oxidasa, uricasa, sarcosina oxidasa, creatinasa, catalasa, bilirrubina oxidasa, lactato oxidasa, piruvato oxidasa y glucosa oxidasa.

37. Un procedimiento para fabricar un dispositivo plano microfabricado para detectar una molécula de analito en una muestra líquida que contiene oxígeno, que comprende:

microfabricar un elemento transductor (12) en una superficie plana (14),

microfabricar una primera capa (16) por encima de dicho elemento transductor (12) que comprende una enzima y una matriz de soporte, siendo dicha enzima capaz de convertir dicho analito y oxígeno de una forma detestable en dicho elemento transductor (12),

microfabricar una segunda capa (18; 30; 40, 42; 42, 50; 62, 68; 70; 80, 82; 90) por encima de dicha primera capa (16) que es permeable tanto a la molécula de analito como al oxígeno;

establecer una tercera capa (22, 52; 94, 96) por encima de dicha primera capa (16) que comprende un polímero permeable al oxígeno, pero impermeable a dicho analito,

establecer una capa fotoformable (24) sobre dicha tercera capa (22; 52; 94, 96),

exponer dicha capa fotoformable a través de una máscara, conteniendo dicha máscara un modelo para formar una o más aberturas de geometría controlada en ubicaciones predeterminadas en dicha capa fotoformable (24),

desarrollar dicho modelo y poner en contacto dicha capa fotoformada (24) con un decapante capaz de decapar dicha tercera capa (22; 52; 94, 96) para producir una tercera capa que contiene una o más aberturas microfabricadas de geometría controlada en ubicaciones predeterminadas capaces de permitir el transporte de dicho analito hasta dicha primera capa (12).

38. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 37, en el que la primera capa comprende un material fotoformable en la que se selecciona el componente de la matriz del grupo constituido por un material proteínico, una gelatina, un hidrogel, un polímero orgánico hidrófilo y alcohol de polivinilo, y se selecciona el material fotoactivo del grupo constituido por dicromato, cloruro férrico, una sal de estirilpiridinio y una sal de estilbizonio.

39. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 37, en el que la segunda capa comprende un material fotoformable en la que se selecciona el componente de la matriz del grupo constituido por un material proteínico, una gelatina, un hidrogel, un polímero orgánico hidrófilo y alcohol de polivinilo, y se selecciona el material fotoactivo del grupo constituido por dicromato, cloruro férrico, una sal de estirilpiridinio y una sal de estilbizonio.

40. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 37, en el que la enzima o la combinación de enzimas está seleccionada del grupo constituido por glucosa oxidasa, lactato oxidasa, piruvato oxidasa, colesterol oxidasa, bilirrubina oxidasa, sarcosina oxidasa, creatinasa y creatinasa colesterol esterasa.

41. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 37, en el que la tercera capa está seleccionada del grupo constituido por copolímero de silicona, poliuretano, acetato de celulosa, un copolímero de siloxano-no siloxano, un polímero de tetrafluoretileno, un fotorresistente negativo orgánico, un fotorresistente positivo orgánico, una poliimida o una poliimida fotoformable.

42. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 37, en el que la molécula de analito está seleccionada del grupo constituido por glucosa, creatina, colesterol, lactato, piruvato, sarcosina o bilirrubina.

43. Un procedimiento para fabricar un dispositivo plano microfabricado para detectar una molécula de analito en una muestra líquida que contiene oxígeno, que comprende:

microfabricar un elemento transductor (12) en una superficie plana,

microfabricar una primera capa (16) por encima de dicho elemento transductor que comprende una enzima y una matriz de soporte, siendo dicha enzima capaz de convertir dicho analito y oxígeno en una forma detectable en dicho elemento transductor (12),

microfabricar una segunda capa (18; 30; 40, 42; 42, 50; 62, 68; 70; 80, 82; 90) por encima de dicha primera capa (16) que es permeable tanto a la molécula de analito como al oxígeno,

ES 2 333 831 T3

establecer una tercera capa (22; 52; 94, 96) que es fotoformable por encima de dicha primera capa que es permeable al oxígeno, pero impermeable a dicho analito, exponer dicha capa fotoformable a través de una máscara, conteniendo dicha máscara un modelo para formar una o más aberturas de geometría controlada en ubicaciones predeterminadas y

desarrollar dicho modelo para producir una tercera capa que contiene una o más aberturas microfabricadas de geometría controlada en ubicaciones predeterminadas capaces de permitir el transporte de dicho analito hasta dicha primera capa (16).

44. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 43, en el que la primera capa comprende un material fotoformable en la que se selecciona el componente de la matriz del grupo constituido por un material proteináceo, una gelatina, un hidrogel, un polímero orgánico hidrófilo y alcohol de polivinilo, y se selecciona el material fotoactivo del grupo constituido por dicromato, cloruro férrico, una sal de estirilpiridinio y una sal de estilbizonio.

45. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 43, en el que la segunda capa comprende un material fotoformable en la que se selecciona el componente de la matriz del grupo constituido por un material proteináceo, una gelatina, un hidrogel, un polímero orgánico hidrófilo y alcohol de polivinilo, y se selecciona el material fotoactivo del grupo constituido por dicromato, cloruro férrico, una sal de estirilpiridinio y una sal de estilbizonio.

46. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 43, en el que la enzima o la combinación de enzimas están seleccionadas del grupo constituido por glucosa oxidasa, lactato oxidasa, piruvato oxidasa, colesterol oxidasa, bilirrubina oxidasa, sarcosina oxidasa, creatinasa y creatininasa colesterol esterasa.

47. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 43, en el que se selecciona la tercera capa del grupo constituido por un copolímero de silicona, poliuretano, acetato de celulosa, un copolímero de siloxano-no siloxano, un polímero de tetrafluoretileno, un fotorresistente negativo orgánico, un fotorresistente positivo orgánico, una poliimida o una poliimida fotoformable.

48. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 43, en el que la molécula de analito está seleccionada del grupo constituido por glucosa, creatina, colesterol, lactato, piruvato, sarcosina o bilirrubina.

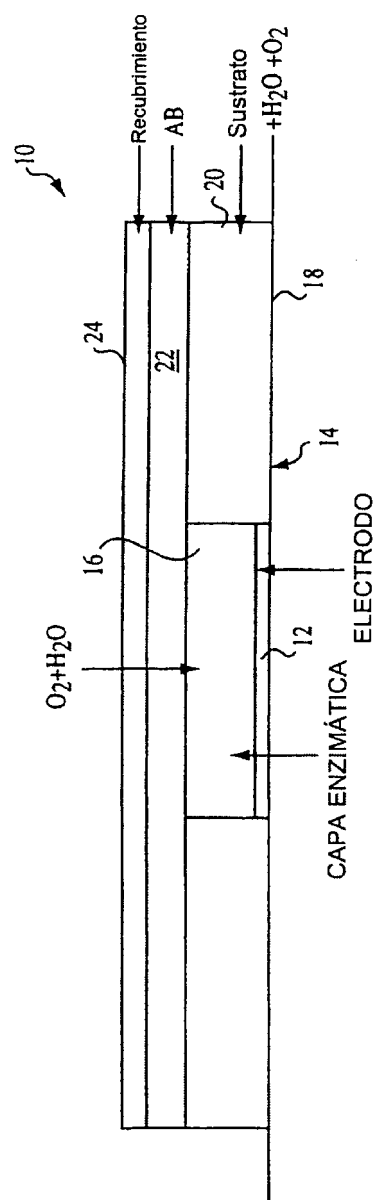


FIG. 1

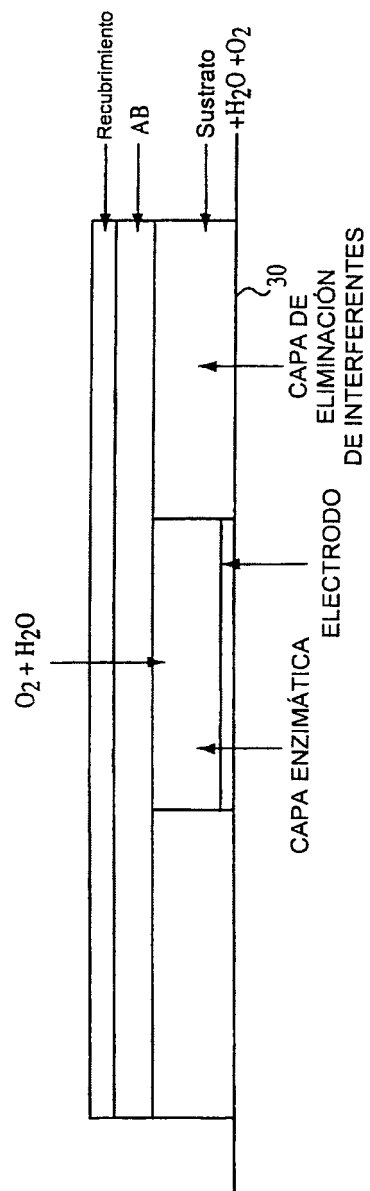


FIG. 2

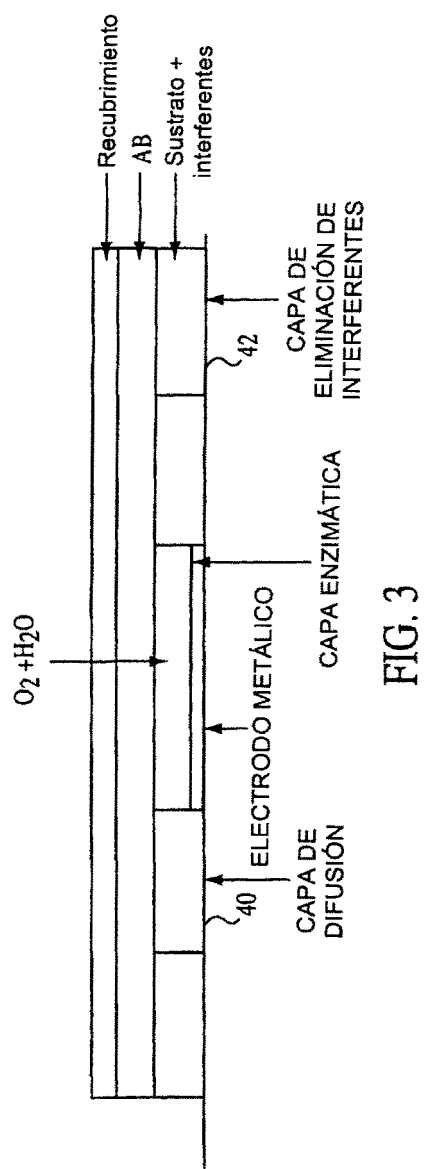


FIG. 3

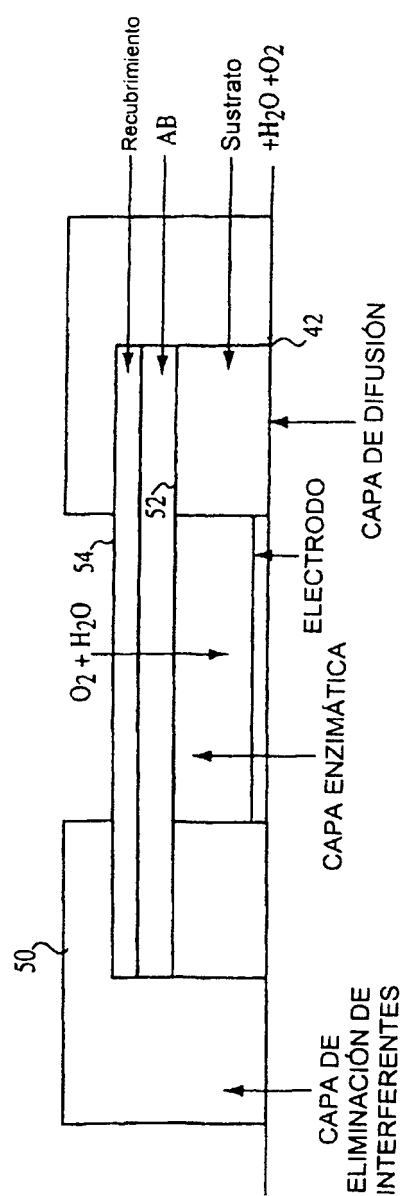


FIG. 4

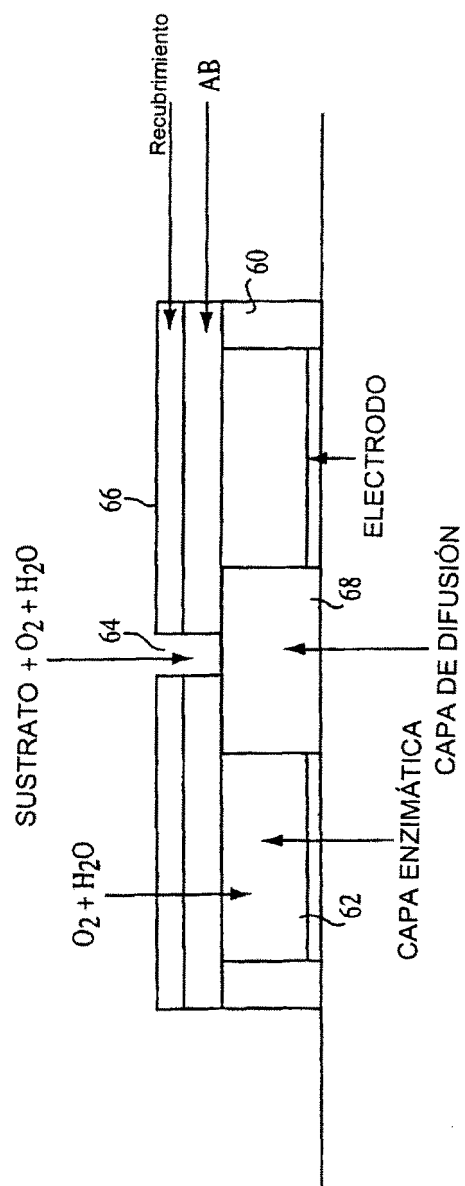


FIG. 5

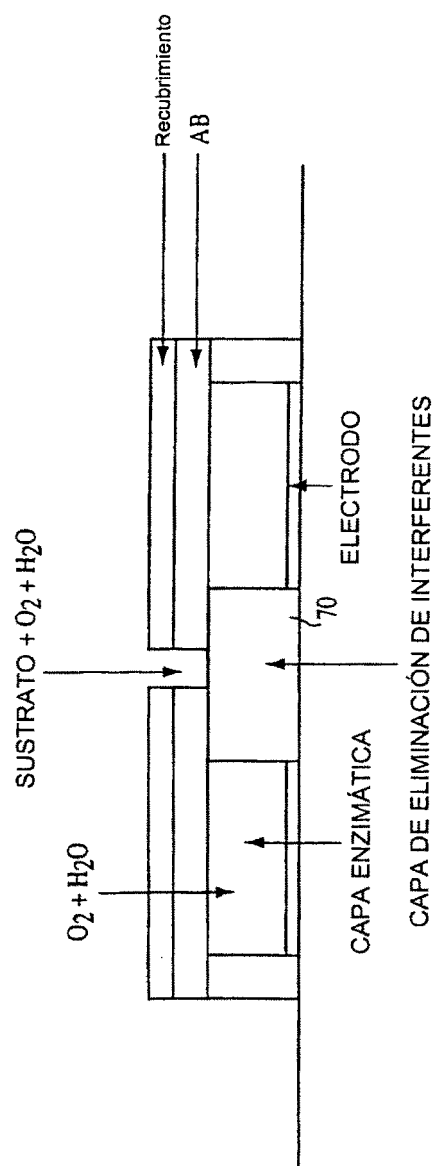


FIG. 6

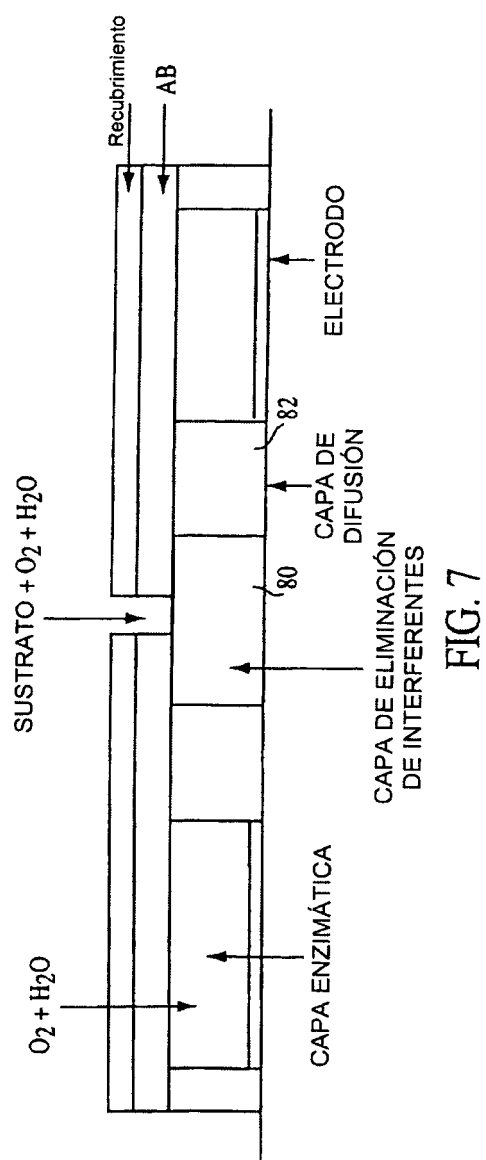


FIG. 7

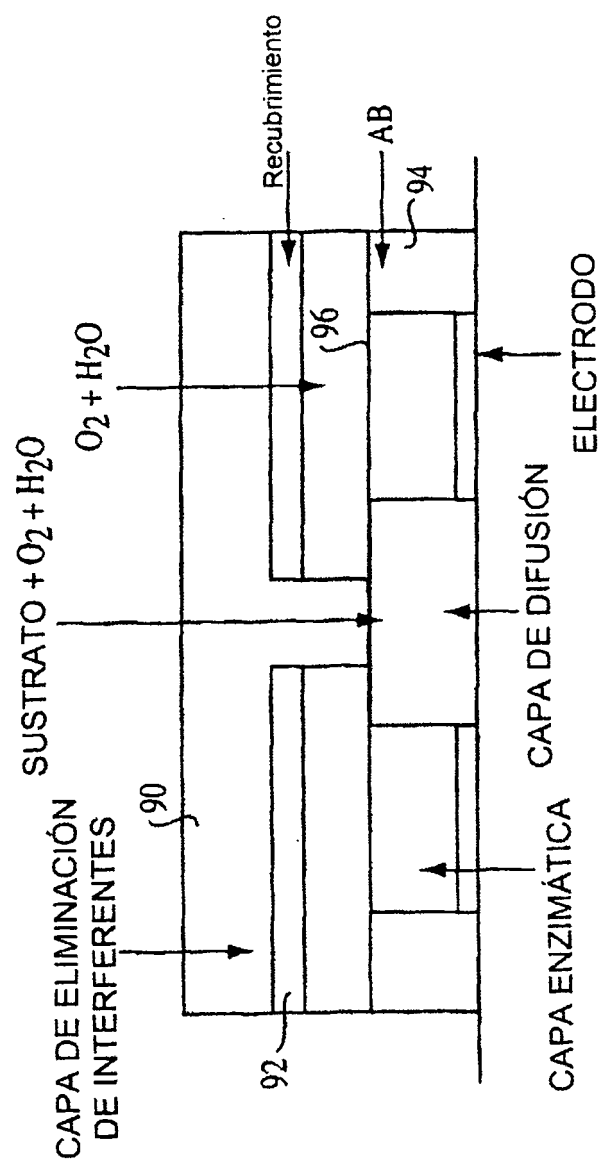


FIG. 8

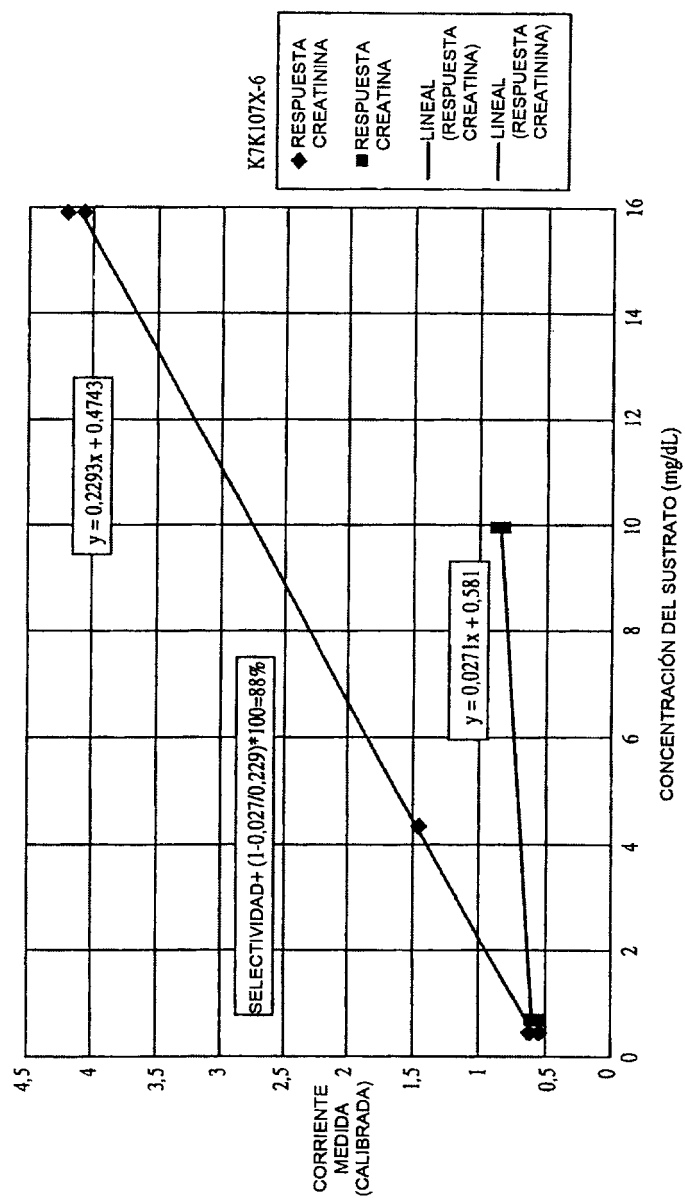


FIG. 9

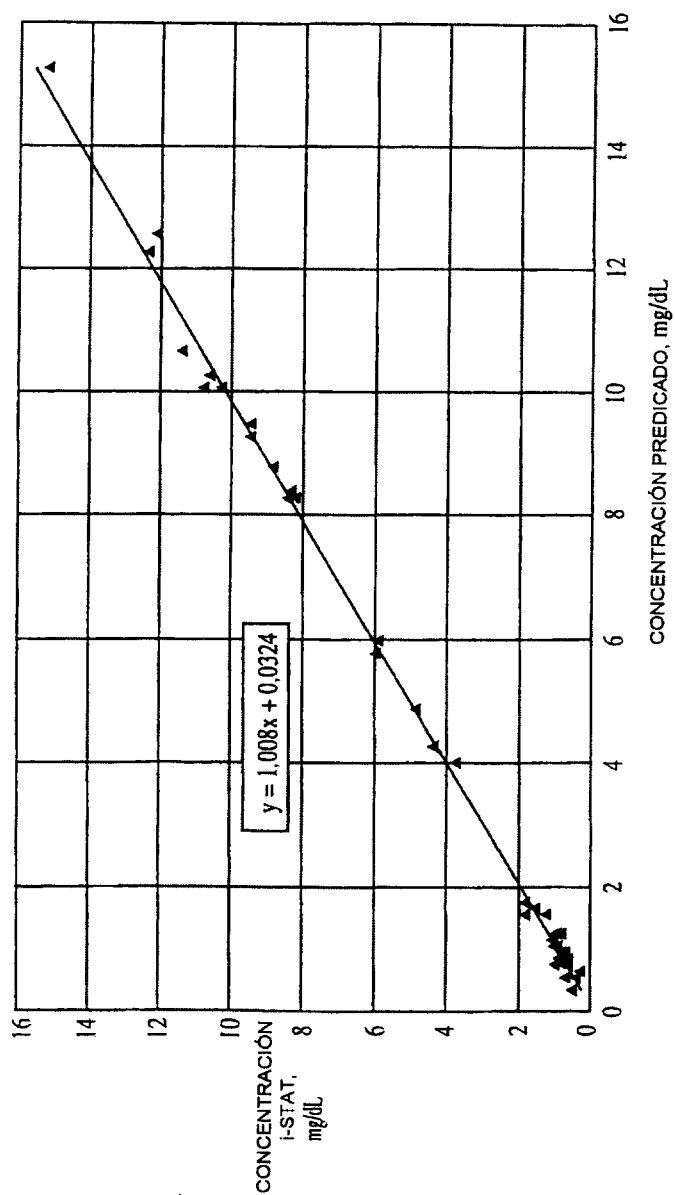


FIG. 10

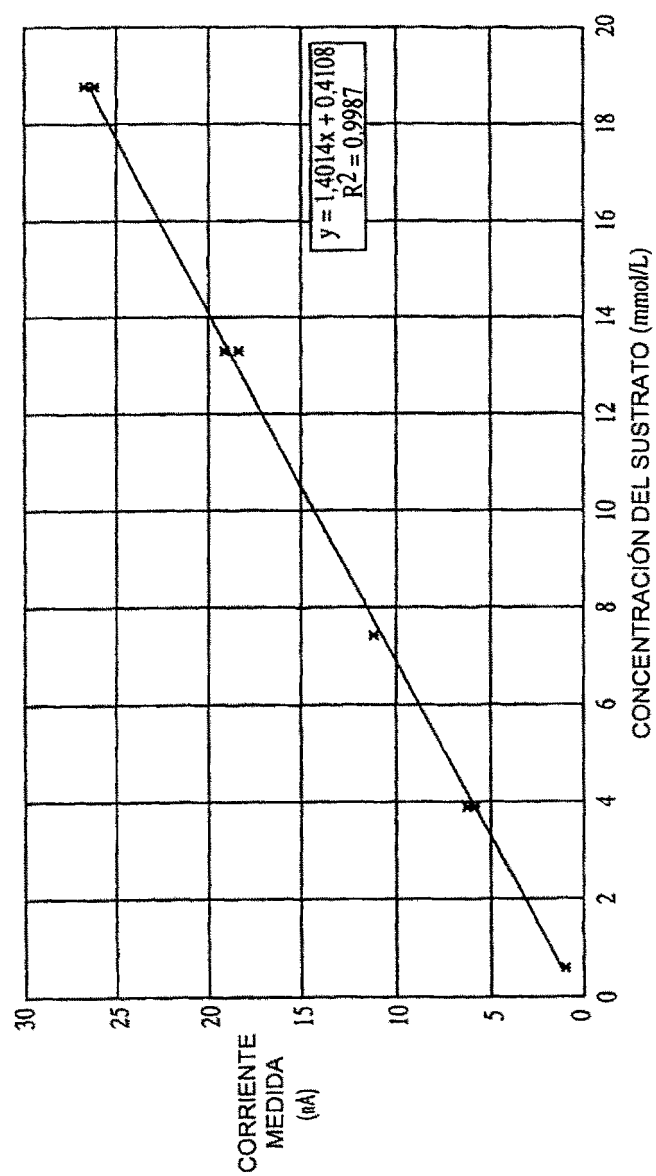


FIG. 11

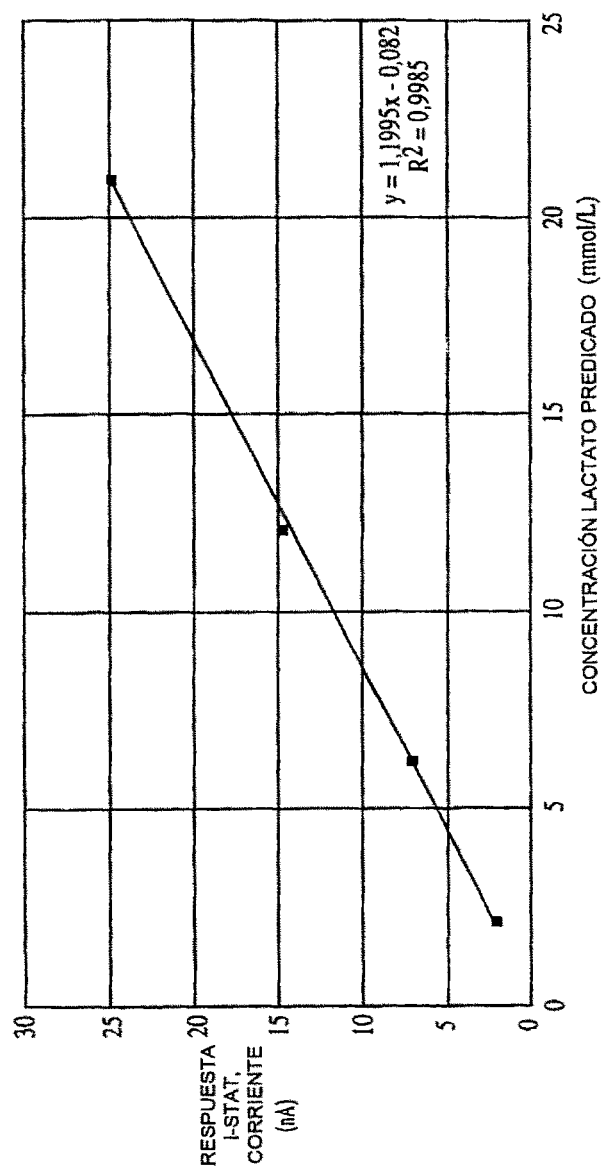


FIG. 12