(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 028 841**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2016 E 16176989 (8)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025 EP 3263712**

(54) Título: **Sensores funcionalizados galvánicamente**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2025

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

WIEDER, HERBERT

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Sensores funcionalizados galvánicamente

La presente invención se refiere a un biosensor para determinar un analito que comprende un sustrato, un electrodo de trabajo que comprende una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador, y una capa de enzima en contacto que permite la difusión con dicha capa de mediador, en el que dicha capa de mediador es una capa de mediador electrodepositada, y en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2 y en el que dicho analito es glucosa. La presente invención se refiere además a un procedimiento para la fabricación de un biosensor, que comprende proporcionar un sustrato que tiene al menos una almohadilla conductora, electrodepositar una capa de mediador sobre al menos parte de dicha almohadilla conductora, en el que dicha almohadilla conductora está en contacto directo con dicha capa de mediador, en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2, y depositar una capa de enzima sobre al menos parte de dicha capa de mediador, en el que depositar dicha capa de enzima comprende depositar una enzima que produce un peróxido en presencia de un analito, en el que dicho analito es glucosa. Además, la presente invención se refiere a usos y procedimientos relacionados con el biosensor de la presente invención.

La determinación de la concentración de uno o más analitos tales como glucosa en uno o más líquidos corporales, tales como líquido intersticial y/o sangre, es un componente esencial del tratamiento y/o prevención en muchas enfermedades. Específicamente, la determinación de la concentración de glucemia, así como de un medicamento correspondiente, es una parte esencial de la rutina diaria para muchos diabéticos. Para incrementar la comodidad y para evitar restringir la rutina diaria más allá de un grado tolerable, se conocen en la técnica dispositivos portátiles, tales como para medir la concentración de glucemia durante el trabajo, el ocio u otras actividades fuera del hogar. Específicamente, se conocen técnicas de medición electroquímica usando sensores que son total o parcialmente implantables en un tejido corporal del usuario y que pueden proporcionar mediciones continuas o discontinuas de la concentración del analito. En los documentos WO 2007/071562 A1, US 2011/0021889 A1, US 2010/0230285 A1, WO 2005/078424 A1 o la solicitud de patente internacional PCT/EP2011/072732 se divulgan ejemplos de estos tipos de elementos sensores implantables.

Los elementos de prueba para detectar electroquímicamente la concentración de al menos un analito en un líquido corporal, tal como para determinar una concentración de glucemia en sangre y/o en líquido intersticial, comprenden típicamente al menos un electrodo de trabajo, así como al menos un contraelectrodo. Además, opcionalmente, el elemento sensor puede comprender al menos un electrodo de referencia. Sin embargo, en modos de realización alternativos, un electrodo de referencia puede estar aislado y/o se puede combinar con el contraelectrodo. Para potenciales materiales de electrodos, tanto para el electrodo de trabajo como para el contraelectrodo, así como para potenciales configuraciones de medición electroquímica para determinar la concentración de analito usando configuraciones amperométricas correspondientes, se puede hacer referencia al documento WO 2007/071562 A1. Sin embargo, son posibles otros tipos de configuraciones de medición para derivar una concentración de analito a partir de una comparación de los potenciales de electrodo.

En configuraciones típicas de sensores electroquímicos, el contraelectrodo se proporciona para cerrar el circuito eléctrico al electrodo de trabajo. Para este propósito, se usan típicamente corrientes redox y/o, en menor medida, corrientes de carga capacitivas. Típicamente, el electrodo de trabajo comprende al menos una sustancia detectora adaptada para realizar una reacción de oxidación o una reacción de reducción con el analito. En muchos casos, la sustancia detectora comprende al menos una enzima, tal como la glucosa oxidasa (GO). En caso de que la reacción de detección comprenda una reacción de oxidación en el electrodo de trabajo, el contraelectrodo proporciona típicamente una reacción de reducción para cerrar el circuito eléctrico. La oxidación o reducción efectiva de un analito puede requerir un sobrepotencial elevado, lo que conlleva el peligro de inducir reacciones secundarias indeseables. En consecuencia, en la arquitectura de los electrodos de trabajo se incluyen típicamente catalizadores (mediadores) que, en principio, pueden ser catalizadores biológicos (enzimas) o catalizadores inorgánicos. Por ejemplo, se ha usado MnO_2 como electrocatalizador para la oxidación de peróxidos, en particular de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, para incrementar la intensidad de señal, se han realizado intentos de incrementar la superficie del electrodo, por ejemplo, galvanizando varias capas de metal como se propone en el documento US 2007/227907 A1. Los autores de Rawal *et al.*, Int. J. Biol. Macromolecules 51, 2012, páginas 175-181, describen un biosensor amperométrico basado en lacasas inmovilizadas sobre nanopartículas de MnO_2 electrodepositado para detectar compuestos fenólicos en extracto de hojas de té. En Yu *et al.*, Talanta, 146, 2015, páginas 707-713, los autores divulgan un biosensor para colina basado en nanopartículas de MnO_2 sintetizadas *in situ* en la superficie de un electrodo mediante electrodepósito en una sola etapa.

Diversas configuraciones de electrodos son conocidas en la técnica. Por tanto, en el documento US 2009/0198117 A1 se divulga un aparato sensor de analitos para implantación dentro de un mamífero. El aparato sensor de analitos comprende una capa base, una capa conductora dispuesta sobre la capa base, una capa sensora del analito y una capa de modulación del analito dispuesta sobre la capa sensora del analito. La capa conductora incluye un electrodo de trabajo que comprende una pluralidad de nanotubos conductores. La capa sensora del

analito comprende una oxidorreductasa dispuesta sobre los nanotubos conductores. La oxidorreductasa genera peróxido de hidrógeno en presencia de un analito que se va a detectar. La capa moduladora del analito modula la difusión del analito a través de la misma.

Como se menciona anteriormente, se conocen una pluralidad de combinaciones de electrodos. Por tanto, en configuraciones de tres electrodos, además del electrodo de trabajo y el contraelectrodo, se proporciona al menos un electrodo de referencia, independientemente del contraelectrodo. El potencial del contraelectrodo, en este caso, típicamente se puede ajustar independientemente del potencial del electrodo de referencia. Como se expone con más detalle en el documento WO 2007/071562 A1, se puede proporcionar un controlador potenciostático que, por una parte, proporciona una diferencia de potencial o tensión deseada entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y, por otra parte, se adapta de modo que una corriente de la reacción de detección que tiene lugar en el electrodo de trabajo se equilibra mediante un procedimiento contrario apropiado en el contraelectrodo, cerrando de este modo el circuito eléctrico. Para este último propósito, el contraelectrodo se tiene que ajustar a un potencial al que se genere la corriente apropiada y requerida mediante una reacción apropiada de electrodos en el contraelectrodo.

Por tanto, el procedimiento que tiene lugar en el contraelectrodo se puede comparar con el procedimiento de potenciometría galvanostática. El contraelectrodo alcanzará en general un potencial al que el procedimiento redox genera la corriente requerida. En caso de que este procedimiento redox de un sistema redox sea insuficiente para proporcionar una corriente apropiada, los compañeros de reacción disminuirán y el contraelectrodo procederá a un potencial de una reacción redox posterior, hasta que la suma de todas las corrientes parciales sea suficiente para generar una contracorriente apropiada para equilibrar la reacción de detección del electrodo de trabajo.

El potencial del contraelectrodo, así como las reacciones de electrodos en el contraelectrodo, dependerán típicamente de una pluralidad de factores. Por tanto, la propia superficie del contraelectrodo influirá, tal como el área de la superficie, la rugosidad del electrodo y/u otras propiedades de la superficie. Además, la presencia de especies redox y el respectivo sobrepotencial en el contraelectrodo influirán en las propiedades del contraelectrodo mencionadas anteriormente, así como en la concentración de las especies redox y el potencial redox y la sobretensión del procedimiento.

Específicamente, en el caso de sensores de monitorización continua *in vivo*, estos sensores estarán típicamente rodeados de sangre y/o líquido intersticial. Como se menciona anteriormente, la mayoría de los biosensores conocidos usan reacciones de detección de oxidación en el electrodo de trabajo en el que se oxida el analito, tal como la glucosa. Como ejemplo, la glucosa se oxidará enzimáticamente y se generarán coproductos reducidos, tal como H_2O_2. Dado que la mayoría de los constituyentes de la sangre y del líquido intersticial están presentes en forma reducida, el número de especies reducibles en las mediciones *in vivo* típicas es limitado. En el orden de sus respectivos potenciales redox, se pueden nombrar como ejemplos las siguientes especies reducibles: oxígeno, H_2O_2, H_2O. La cantidad de oxígeno es típicamente bastante limitada, específicamente en mediciones *in vivo*, específicamente en líquido intersticial. Mediante la encapsulación del elemento sensor implantado en el tejido corporal, el suministro de oxígeno al electrodo de trabajo puede disminuir aún más con el tiempo. El H_2O_2 se puede generar por reacción de los electrodos, tal como por reducción de O_2 y/o por reacción enzimática. Típicamente, el H_2O está ampliamente disponible en altas concentraciones. Sin embargo, el uso de agua como especie reducible incluye típicamente la formación de H_2 gaseoso. Esta formación de gas puede dar lugar a una deshumectación del electrodo, lo que, típicamente, incrementará los efectos mencionados anteriormente. Además, la formación de gas puede dar lugar al despegue de una membrana que típicamente cubre el electrodo de trabajo e incluso puede dar lugar a una retirada completa de la membrana y/o del electrodo.

Típicamente, los sensores *in vivo* se producen proporcionando un soporte que incluya cables eléctricos apropiados para proporcionar los electrodos requeridos y mediante serigrafía de una pasta que comprende una química de referencia para el electrodo de referencia y una pasta que comprende la química de reacción para el electrodo de trabajo en dos procedimientos separados, por ejemplo, procedimientos de serigrafía; véase, por ejemplo, el documento US 2004/007461 A1. Este procedimiento requiere un control de calidad laborioso de los reactivos y sus mezclas. Además, los procedimientos de serigrafía requieren varias etapas de secado y, por tanto, son propensos a errores al producir sensores que no están completamente impresos o de los que se ha desprendido parte de la capa aplicada, en particular si se usa un soporte flexible. Además, el procedimiento de serigrafía requiere la presencia de disolventes, de los que pueden quedar trazas después del secado y que pueden interferir en la medición. En particular, un disolvente usado con frecuencia, el éter monobutílico de dietilenglicol (DEGMBE), es difícil de retirar por completo y se puede peroxidar durante la fabricación, lo que típicamente provoca interferencias en los sensores que detectan peróxidos, por ejemplo, los sensores de glucosa que usan una química de glucosa oxidasa / H_2O_2. Además, mediante la serigrafía de una reacción química, la enzima (por ejemplo, glucosa oxidasa) y el mediador (por ejemplo, MnO_2 usado para catalizar la oxidación de H_2O_2), aunque dispersos, típicamente están presentes en la química de reacción como agregados, de modo que el H_2O_2 debe, en primer lugar, difundirse desde un agregado de enzima a un agregado de MnO_2 para la detección, lo que disminuye la velocidad y la sensibilidad de la detección al disminuir la eficacia de captura.

Como arquitectura alternativa para un electrodo de trabajo, se propuso electrodepositar sobre el metal del

electrodo, en primer lugar, una capa de metal que incluye una enzima y, como capa adicional, electrodepositar un mediador de transferencia de electrones (documento EP 0 368 209 A1). El documento WO 2014/116293 A1 divulga un sensor de glucosa amperométrico que tiene electrodos formados a partir de procedimientos que electrodepositan negro de platino usando un procedimiento de revestimiento pulsado.

Problema que se va a resolver

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un biosensor que pueda ser al menos parcialmente implantable en un tejido corporal, que evite total o parcialmente las deficiencias de los elementos sensores conocidos como se analiza anteriormente. En particular, el elemento sensor proporcionará mejoras con respecto a los problemas relacionados con la serigrafía de químicas de reacción y/o químicas de referencia.

Sumario de la invención

Este problema se resuelve por un biosensor y procedimientos relacionados con los rasgos característicos de las reivindicaciones independientes. Los modos de realización preferentes del biosensor y el procedimiento para fabricar el biosensor se divulgan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones dependientes.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un biosensor para determinar un analito que comprende un sustrato, un electrodo de trabajo que comprende una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador, y una capa de enzima en contacto que permite la difusión con dicha capa de mediador, en el que dicha capa de mediador es una capa de mediador electrodepositada, y en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2; y en el que dicho analito es glucosa.

Como se usa en lo que sigue, los términos "tener", "comprender" o "incluir" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usan de manera no excluyente. Por tanto, estos términos se pueden referir tanto a una situación en la que, aparte del rasgo característico introducido por estos términos, no están presentes otros rasgos característicos en la entidad descrita en este contexto como a una situación en la que están presentes uno o más de otros rasgos característicos. Como ejemplo, todas las expresiones "A tiene B", "A comprende B" y "A incluye B" se pueden referir tanto a una situación en la que, además de B, no está presente ningún otro elemento en A (es decir, una situación en la que A consiste única y exclusivamente en B) como a una situación en la que, además de B, uno o más de otros elementos están presentes en la entidad A, tal como el elemento C, los elementos C y D o incluso otros elementos.

Además, como se usan en lo que sigue, los términos "preferentemente", "más preferentemente", "lo más preferentemente", "en particular", "más en particular", "específicamente", "más específicamente" o términos similares se usan junto con rasgos característicos opcionales, sin restringir posibilidades alternativas. Por tanto, los rasgos característicos introducidos por estos términos son rasgos característicos opcionales y no pretenden restringir el alcance de las reivindicaciones de ninguna manera. La invención, como reconocerá el experto en la técnica, se puede realizar usando rasgos característicos alternativos. De forma similar, los rasgos característicos introducidos por "en un modo de realización de la invención" o expresiones similares pretenden ser rasgos característicos opcionales, sin ninguna restricción con respecto a modos de realización alternativos de la invención, sin ninguna restricción con respecto al alcance de la invención y sin ninguna restricción con respecto a la posibilidad de combinar los rasgos característicos introducidos de dicha manera con otros rasgos característicos opcionales o no opcionales de la invención. Además, si no se indica de otro modo, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado con la precisión técnica comúnmente aceptada en el campo relevante, en un modo de realización se refiere al ±20 % del valor indicado.

El término "biosensor", como se usa en el presente documento, se refiere a un dispositivo que comprende los medios como se indican en el presente documento. En un modo de realización, el biosensor comprende un sustrato, un electrodo de trabajo que comprende una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador y una capa de enzima en contacto que permite la difusión con dicha capa de mediador, como se describe en otra parte en el presente documento, respectivamente.

En un modo de realización, el biosensor es un biosensor implantable. Por tanto, en un modo de realización, el biosensor comprende además una membrana de difusión y/o una capa de biocompatibilidad. El término "membrana de difusión", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que permite la difusión del analito, en particular con un grosor de desde 1 µm a 100 µm, en un modo de realización de desde 2,5 µm a 50 µm. En un modo de realización, la membrana de difusión comprende o consiste en un polímero biocompatible, en particular un polímero producido por polimerización de monómeros de metacrilato de butilo (BUMA) y/o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). En otro modo de realización, la membrana de difusión permite la difusión del analito, pero no de los constituyentes de alto peso molecular comprendidos en un fluido de análisis, por ejemplo, un líquido corporal. En consecuencia, la membrana de difusión, en un modo de realización, permite específicamente la difusión de moléculas con un peso molecular inferior a 10 kDa, en un modo de realización inferior a 5 kDa, en otro modo de realización inferior a 1 kDa. Por tanto, en un modo de realización, la membrana de difusión es una

membrana semipermeable, en particular una membrana de diálisis, en un modo de realización una membrana de diálisis biocompatible. El término "capa de biocompatibilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a una capa exterior de un biosensor que comprende o que consiste en un material biocompatible. En un modo de realización, el material biocompatible es un material que no induce una respuesta corporal, por ejemplo, un material inerte. En un modo de realización, el biosensor está completamente cubierto por la capa de biocompatibilidad, con la excepción de una abertura cubierta por una membrana de difusión. En otro modo de realización, el biosensor está completamente cubierto por la capa de biocompatibilidad. En un modo de realización, dicha abertura se localiza en la proximidad del electrodo de trabajo y la membrana de difusión separa el electrodo de trabajo, la capa de mediador y la capa de enzima del fluido de análisis. Además, en particular en el caso de que el biosensor sea un biosensor implantable, el biosensor típicamente puede comprender otros medios eléctricos y electrónicos, que incluyen, por ejemplo, una fuente de energía, como una batería, y/o una unidad de comunicación para intercambiar información con un dispositivo externo, por ejemplo, para informar de los valores medidos de un analito. Los medios adecuados para proporcionar fuentes de energía y unidades de comunicación son bien conocidos en la técnica.

Se entenderá que el biosensor puede comprender medios adicionales que el experto en la técnica considere apropiados. En un modo de realización, el biosensor es un biosensor electroquímico; por tanto, el biosensor puede comprender cables y contactos eléctricos adicionales. En un modo de realización, el biosensor comprende electrodos adicionales, que pueden ser electrodos que tengan los rasgos característicos que se describen, o pueden ser electrodos estructural y/o funcionalmente diferentes de los mismos. Se pueden adaptar otros electrodos, por ejemplo, para su uso como un control de llenado, como un sensor de temperatura y similares. En un modo de realización, el biosensor comprende además un contraelectrodo, en otro modo de realización comprende además un electrodo de referencia y un contraelectrodo. Es conocido en la técnica que el biosensor puede comprender tres electrodos, de los que cada uno es un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia ("configuración de tres electrodos"); o el biosensor puede comprender dos electrodos, de los que uno es un electrodo de trabajo y el segundo es un contraelectrodo y un electrodo de referencia ("configuración de dos electrodos"). Como se indica anteriormente, el biosensor también puede comprender otros electrodos.

El término "analito", como se usa en el presente documento, se refiere a glucosa presente en un líquido, en particular, un líquido corporal. En un modo de realización, el líquido es una muestra de análisis como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el analito es una molécula orgánica, en otro modo de realización, una molécula orgánica que puede experimentar una reacción redox en presencia de la enzima de acuerdo con la presente invención. El analito de acuerdo con la invención es una molécula del metabolismo de un sujeto, es decir, una molécula producida y/o consumida en al menos una reacción química que tiene lugar en al menos un tejido de dicho sujeto. Un analito no de acuerdo con la presente invención pero también divulgado es uno seleccionado de la lista que consiste en malato, etanol, ácido ascórbico, colesterol, glicerol, urea, 3-hidroxibutirato, lactato, piruvato, cetonas, creatinina y similares; de acuerdo con la presente invención, el analito es glucosa.

Los términos "muestra" y "muestra de análisis", como se usa en el presente documento, se refieren a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas, a una muestra de un tejido o un órgano o a una muestra de líquido de lavado/aclarado obtenido de una superficie corporal exterior o interior. En un modo de realización, la muestra es una muestra de un líquido corporal. Como se usa en el presente documento, el término "líquido corporal" se refiere a todos los líquidos corporales de un sujeto que se sabe que comprenden o se sospecha que comprenden el analito de la presente invención, incluyendo sangre, plasma, líquido intersticial, líquido lagrimal, orina, linfa, líquido cefalorraquídeo, bilis, heces, sudor y saliva. En un modo de realización, el líquido corporal es sangre, suero o plasma. Las muestras de líquidos corporales se pueden obtener por técnicas bien conocidas que incluyen, por ejemplo, punción venosa o arterial, punción epidérmica y similares. En un modo de realización, el líquido corporal se extrae del cuerpo de un sujeto para realizar la determinación; por tanto, en un modo de realización, el biosensor de la presente invención se usa en un procedimiento *in vitro*. En otro modo de realización, en caso de que el biosensor sea un biosensor implantable, el líquido corporal está comprendido dentro de un sujeto; en dicho caso, el líquido corporal, en un modo de realización, es sangre o líquido intersticial; por tanto, en otro modo de realización, el biosensor de la presente invención se usa en un procedimiento *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, el término "sustrato" se refiere a un elemento portador (soporte) que, básicamente, puede tener una conformación arbitraria, tal como una conformación de tira. Materiales y geometrías útiles son conocidos en la técnica. En un modo de realización, el sustrato es un sustrato flexible. En un modo de realización, el sustrato comprende una configuración de capa que tiene una, dos o más capas, en un modo de realización, una configuración de capa flexible. El sustrato, en general, se puede hacer de cualquier material de sustrato arbitrario, tal como un material plástico y/o un material laminado y/o un material de papel y/o un material cerámico. Se pueden usar otros materiales de forma alternativa o adicionalmente, tales como metales o configuraciones de película delgada. En un modo de realización, el sustrato es una capa aislante; por tanto, en caso de que el sustrato sea un metal, el metal está, en un modo de realización, cubierto por una capa aislante. En un modo de realización, el sustrato comprende o consiste en PCB flexible o en una poliimida.

El término "electrodo" es, en principio, conocido en la técnica como relacionado con un conductor eléctrico usado

para ponerse en contacto con una parte no metálica de un circuito eléctrico. El experto en la técnica conoce una variedad de materiales y geometrías que se pueden usar como electrodos en un biosensor, por ejemplo, a partir de los documentos WO 2007/071562 A1, US 2009/0178923 A1, US 2011/0196216 A1 y US 2015/0099954 A1. En un modo de realización, el electrodo de la presente invención comprende al menos una almohadilla eléctricamente conductora y al menos una ruta conductora. El término "almohadilla conductora", como se usa en el presente documento, se refiere a una pequeña masa de metal que forma parte de un electrodo en la que se produce la reacción de detección (en caso de que la almohadilla sea una almohadilla de un electrodo de trabajo), una contrarreacción (en caso de que la almohadilla sea una almohadilla de un contraelectrodo) o una reacción de referencia (en caso de que la almohadilla sea una almohadilla de un electrodo de referencia). Como se usa en el presente documento, el término "se produce una reacción en una almohadilla conductora de un electrodo" se refiere a una reacción que tiene lugar en una capa que está en contacto conductor, en un modo de realización en contacto directo, con dicha almohadilla conductora, por ejemplo en una capa de mediador o en una capa de Ag/AgCl. En un modo de realización, dicha al menos una almohadilla eléctricamente conductora y/o ruta conductora consiste en un material no corrosivo con alta conductividad, en particular un metal noble, incluyendo oro, plata, platino y paladio, o una aleación de los mismos; o grafito. En un modo de realización, la al menos una almohadilla conductora y/o ruta conductora comprende al menos una capa de oro, en un modo de realización consiste en oro. Como comprenderá el experto en la técnica, la al menos una almohadilla eléctricamente conductora y/o ruta conductora puede comprender una multitud de capas, por ejemplo, dos o más de dos capas. Por tanto, en un modo de realización, la al menos una almohadilla conductora y/o ruta conductora de un electrodo puede comprender una capa de cobre y una capa de oro. En un modo de realización, el electrodo es un electrodo fabricado depositando galvánicamente una capa de oro sobre una estructura de electrodo de cobre; en un modo de realización, dicha estructura de electrodo de cobre se genera estructurando litográficamente rutas conductoras sobre un sustrato. En otro modo de realización, la ruta conductora (cable eléctrico) conecta de forma conductora una almohadilla conductora, por ejemplo, a un conector comprendido en un dispositivo de medición. La almohadilla conductora y la ruta conductora pueden, en principio, tener cualquier geometría que se considere apropiada.

En un modo de realización, el electrodo, en particular un electrodo de trabajo, se adapta para entrar en contacto con una muestra, en particular un líquido corporal en el interior de un tejido corporal, ya sea directamente o por medio de al menos una membrana semipermeable. Por tanto, en un modo de realización, el electrodo se dispone de modo que el electrodo se ponga en contacto con al menos un electrólito y/o disolvente contenido en el líquido corporal, tal como agua. El electrodo puede ser o puede comprender una o más almohadillas conductoras (campos de electrodos) que pueden estar o se pueden poner en contacto total o parcialmente con el líquido corporal. Por tanto, cada campo de electrodo puede proporcionar al menos una interfase con el líquido corporal, por ejemplo, ya sea estando directamente en contacto con un tejido corporal que contiene el líquido corporal o poniéndose en contacto con el líquido corporal por medio de al menos una membrana que puede ser total o parcialmente permeable al líquido corporal o a uno o más componentes del mismo. Se puede poner en contacto uno o más de los campos de electrodo por medio de uno o más cables de contacto apropiados, también denominados rutas conductoras. Por tanto, un cable de contacto o ruta conductora se puede poner en contacto eléctricamente precisamente con un electrodo o con una pluralidad de dos o más electrodos. El al menos un electrodo, en un modo de realización, puede tener exactamente una superficie continua que se puede adaptar para ponerse en contacto con un líquido corporal en el interior del tejido corporal. Se pueden proporcionar uno o más electrodos del mismo tipo en el biosensor. Cada electrodo se puede poner en contacto eléctricamente por al menos un cable de contacto. En caso de que se proporcione más de un electrodo del mismo tipo, los electrodos se pueden poner en contacto por uno o más cables de contacto. Por tanto, dos o más electrodos del mismo tipo se podrían poner en contacto eléctricamente por un mismo cable de contacto. De forma alternativa, se pueden proporcionar cables de contacto separados para poner en contacto los electrodos, tales como al menos un cable de contacto separado por electrodo.

Cada electrodo se puede realizar de modo que pueda tener lugar una reacción electroquímica en el electrodo, en el que el líquido corporal o una parte del mismo, tal como un electrólito y/o el analito, puede tener lugar en esta reacción electroquímica. Por tanto, el electrodo se puede realizar de modo que pueda tener lugar una reacción de oxidación o una reacción de reducción en el electrodo.

El biosensor puede comprender precisamente un electrodo de trabajo o puede comprender una pluralidad de electrodos de trabajo. En caso de que se proporcione más de un electrodo de trabajo, al menos uno de dichos electrodos de trabajo comprenderá una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador, en el que dicha capa de mediador es una capa de mediador electrodepositada, y en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2. Además, el biosensor puede comprender exactamente un contraelectrodo o puede comprender una pluralidad de contraelectrodos. En caso de que se proporcionen uno o más electrodos de referencia adicionales, se puede proporcionar precisamente un electrodo de referencia o se puede proporcionar una pluralidad de electrodos de referencia.

El biosensor es un biosensor para determinar un analito, en el que el analito es glucosa, en particular en una muestra. En un modo de realización, dicha muestra es una muestra de un sujeto. El término "determinación", como se usa en el presente documento, se refiere a detectar o medir la cantidad de un analito, en un modo de realización,

de forma semicuantitativa o, en otro modo de realización, de forma cuantitativa. En un modo de realización, determinar comprende estimar la cantidad de electrones liberados o consumidos en un electrodo de trabajo tras poner en contacto un biosensor de acuerdo con la presente invención con un fluido que se sospecha que comprende un analito. Los procedimientos de estimación de la cantidad de electrones liberados o consumidos en un electrodo de trabajo son conocidos a partir de la técnica anterior. En un modo de realización, la cantidad de electrones liberados o consumidos se estima por medio de una medición potenciostática.

El término "electrodo de trabajo" se entiende, en general, como relacionado con el electrodo de una celda electroquímica en el que se produce la reacción de interés. De acuerdo con la presente invención, al menos una almohadilla eléctricamente conductora del electrodo de trabajo está en contacto directo con una capa de mediador como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el electrodo de trabajo comprende una multiplicidad de almohadillas eléctricamente conductoras, que también se denominan campos de electrodos. En otro modo de realización, la multiplicidad de almohadillas eléctricamente conductoras es una multiplicidad de campos como se describe en el documento US 2011/196216 A1 citado anteriormente. En un modo de realización, al menos una, en un modo de realización al menos dos, en otro modo de realización la mitad, en otro modo de realización todas, de dichas almohadillas conductoras (campos de electrodos) del electrodo de trabajo están en contacto directo con una o más capas de mediador. En un modo de realización, las almohadillas conductoras del electrodo de trabajo están en contacto conductor con la misma capa de mediador, por ejemplo, entrando en contacto con una capa de mediador contigua que cubre todas las almohadillas conductoras y los cables que conectan las mismas. En otro modo de realización, las almohadillas conductoras de uno o más electrodos de trabajo están en contacto conductor con al menos dos capas de mediador separadas o diferentes, en el que el término "capas de mediador separadas" se refiere a capas de mediador espacialmente separadas que son idénticas en su composición, mientras que el término "capas de mediador diferentes" se refiere a capas de mediador que difieren en su composición. En un modo de realización, un electrodo de trabajo es un electrodo del biosensor en el que se produce la oxidación de un peróxido, en particular de peróxido de hidrógeno; en consecuencia, en un modo de realización, el electrodo de trabajo es un ánodo.

El término "contraelectrodo" se entiende, en general, como relacionado con el electrodo de una celda electroquímica en el que se produce la contrarreacción electroquímica a la reacción de interés; por tanto, preferentemente, el contraelectrodo es el electrodo usado para cerrar un circuito eléctrico con el electrodo de trabajo durante la medición. Los medios y procedimientos de producción de un contraelectrodo son bien conocidos en la técnica, por ejemplo a partir de las referencias citadas anteriormente. En un modo de realización, el contraelectrodo de acuerdo con la presente invención se localiza en el lado opuesto de dicho sustrato con respecto al electrodo de trabajo, en particular como se describe en el documento US 2015/099954 A1 citado anteriormente; en un modo de realización, el contraelectrodo comprende una almohadilla conductora que comprende o consiste en oro, que puede o no estar funcionalizado adicionalmente en dicho caso.

El material del contraelectrodo puede comprender además al menos un material redox del contraelectrodo adaptado para realizar al menos una reacción redox y/o puede comprender uno o más materiales eléctricamente conductores tales como uno o más metales. Como se usa en el presente documento, el término "reacción redox" se refiere al hecho de que un compañero de la reacción redox se reduce, mientras que otro compañero de la reacción redox se oxida. Por tanto, el término "material redox" se refiere a un material que comprende al menos un componente reducible y al menos un componente oxidable. Como ejemplo, el material redox del contraelectrodo puede comprender uno o más de los siguientes sistemas redox: Ag/AgCl; $Hg/HgCl_2$ y Mn(II)/Mn(IV). El al menos un material eléctricamente conductor puede proporcionar al menos una superficie eléctricamente conductora que, en un modo de realización, es una superficie eléctricamente polarizable, y que se puede adaptar de modo que puedan tener lugar una o más reacciones redox con uno o más componentes contenidos en el líquido corporal.

El término "electrodo de referencia" es conocido por el experto en la técnica por referirse a un electrodo adaptado para proporcionar un potencial de electrodo conocido y ampliamente constante como potencial de referencia, en particular proporcionando un sistema redox que tiene un potencial de electrodo conocido y constante. En principio, los procedimientos para proporcionar un electrodo de referencia son conocidos por el electrodo, por ejemplo a partir de la técnica citada anteriormente. En un modo de realización, el electrodo de referencia está en contacto conductor con una capa de un material de referencia, en particular un material de referencia que tiene un potencial de electrodo conocido y ampliamente constante. En un modo de realización, dicho material de referencia comprende al menos uno de los metales plata (Ag), cobre (Cu), manganeso (Mn), plomo (Pb), mercurio (Hg), níquel (Ni), cobalto (Co), bismuto (Bi), renio (Re) y telurio (Te), en un modo de realización comprende uno de dichos metales. En un modo de realización, el material de referencia comprende dicho metal, metales o aleación de los mismos en forma iónica, en forma elemental o en forma iónica y elemental. En otro modo de realización, el material de referencia comprende dicho metal, metales o aleación de los mismos en forma iónica y elemental. En un modo de realización, el material de referencia comprende dicho metal, metales o aleación de los mismos en forma elemental, y un material de referencia que comprende dicho metal, metales o aleación de los mismos en forma iónica y elemental se produce *in situ* oxidando parcialmente de forma electroquímica dicha forma elemental. Por tanto, en un modo de realización, el material de referencia comprende al menos uno de dichos metales en forma iónica como un óxido o como un cloruro, en otro modo de realización comprende al menos uno de dichos metales en forma elemental y en forma iónica, en otro modo de realización comprende al menos uno de dichos metales (i)

en forma elemental y (ii) como un óxido o como un cloruro. En un modo de realización, el electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl producido de acuerdo con procedimientos estándar; en otro modo de realización, el electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl producido *in situ* oxidando electroquímicamente plata en presencia de iones cloruro.

En un modo de realización, el biosensor no comprende un electrodo de referencia; en particular, en dicho modo de realización, el biosensor comprende un contraelectrodo que comprende un material redox de contraelectrodo que, al mismo tiempo, funciona como un material de referencia como se especifica anteriormente en el presente documento.

En un modo de realización, el material de referencia, en particular el material de referencia como se describe anteriormente en el presente documento, se electrodeposita sobre el electrodo de referencia, es decir, en particular mediante una semirreacción de una celda galvánica. En un modo de realización, el material de referencia, en particular plata, se electrodeposita sobre el electrodo de referencia en forma elemental y, a continuación, se oxida parcialmente para proporcionar un material de referencia que comprende dicho metal, metales o aleación de los mismos en forma iónica y elemental. Los procedimientos de electrodepósito de plata sobre un electrodo de oro son, en principio, conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en el presente documento en los ejemplos a continuación. En un modo de realización, la plata se electrodeposita a partir de una solución de nitrato de plata, en particular que tiene una concentración de desde 1 µM hasta saturada a temperatura ambiente (25 °C), en un modo de realización, de desde 100 µM hasta saturada a temperatura ambiente. En un modo de realización, el depósito se realiza potenciostáticamente, es decir, aplicando un voltaje constante. El experto en la técnica conoce cómo determinar voltajes apropiados para depósito potenciostático. En un modo de realización, se aplica un voltaje de desde -60 mV hasta -150 mV, en otro modo de realización de desde -65 mV hasta -120 mV. En otro modo de realización, el depósito se realiza galvanostáticamente, es decir, ajustando la corriente de modo que se logre una velocidad de depósito adecuada, que es, en un modo de realización, constante durante el tiempo de depósito. En un modo de realización, el depósito galvanostático se optimiza derivando un intervalo de corriente óptimo a partir de una curva de corriente/potencial establecida para el procedimiento de depósito. Como comprenderá el experto en la técnica, la cantidad de material electrodepositado, en un modo de realización el grosor de la capa, se puede controlar ajustando la corriente de depósito y/o el tiempo de depósito.

El término "contacto conductor" se entiende por el experto en la técnica. En un modo de realización, un contacto conductor es un contacto que permite conducir una carga eléctrica desde un primer compañero de contacto hasta un segundo compañero de contacto, lo que puede estar mediado por un compuesto conductor intermedio, por ejemplo un electrolito o, en particular, un conductor de electrones, por ejemplo un metal. En general, como se usa en el presente documento, el término "eléctricamente conductor" se refiere a una conductividad eléctrica σ, típicamente dada en S/m o 1/Ωm, de al menos 1 x 10^0 S/m, preferentemente de al menos 1 x 10^3 S/m y, más preferentemente, de al menos 1 x 10^5 S/m. Como se usa además en el presente documento, el término "eléctricamente aislante" se refiere a una conductividad eléctrica de no más de 1 x 10^{-1} S/m, preferentemente de no más de 1 x 10^{-2} S/m y, lo más preferentemente, de no más de 1 x 10^{-5} S/m. De acuerdo con la invención, el contacto conductor entre la almohadilla eléctricamente conductora y la capa de mediador es contacto directo; en un modo de realización, el contacto conductor entre un electrodo de trabajo y una capa de mediador de la presente invención es contacto directo. Es decir, en un modo de realización, una almohadilla conductora de un electrodo de trabajo está cubierta, al menos parcialmente, por una capa de mediador. De acuerdo con la invención, una almohadilla conductora de un electrodo de trabajo está en contacto directo con dicha capa de mediador. Correspondientemente, en otro modo de realización, en un modo de realización, el contacto conductor entre un electrodo de referencia y un material de referencia de la presente invención es contacto directo. Es decir, en un modo de realización, una almohadilla conductora de un electrodo de referencia está cubierta, al menos parcialmente, por un material de referencia, en particular directamente en contacto con dicho material de referencia.

Asimismo, el término "contacto que permite la difusión", como se usa en el presente documento, se refiere al contacto que permite la difusión de un compuesto, en particular un compuesto que tiene un peso molecular como se especifica para un analito en otra parte en el presente documento, desde un primer compañero de contacto hasta un segundo compañero de contacto. Por tanto, en un modo de realización, el contacto que permite la difusión es un contacto mediado por una composición intermedia que permite la difusión de un compuesto desde un primer compañero de contacto hasta un segundo compañero de contacto. En otro modo de realización, el contacto que permite la difusión es contacto directo; por tanto, en un modo de realización, el contacto que permite la difusión entre una capa de mediador y una capa de enzima es contacto directo. Es decir, en un modo de realización, una capa de mediador en contacto conductor con una almohadilla conductora de un electrodo de trabajo está cubierta, al menos parcialmente, por un material de referencia, en particular directamente en contacto con dicho material de referencia.

Como se usa en el presente documento, el término "capa de mediador" se refiere a una capa que consiste en un agente electrocatalítico. El término "agente electrocatalítico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico inorgánico que cataliza una reacción electroquímica, en particular una reacción de reducción o una reacción de oxidación en un electrodo. En un modo de realización, dicha catálisis disminuye el

sobrepotencial requerido para que se produzca dicha reacción electroquímica en comparación con la reacción no catalizada y/o incrementa la velocidad a la que se produce dicha reacción electroquímica en comparación con la reacción no catalizada. En particular, "incrementar la velocidad a la que se produce dicha reacción electroquímica" se refiere a la velocidad de reacción por área de electrodo, en particular por área de electrodo de trabajo; por tanto, en un modo de realización, la electrocatálisis no incrementa el área de un electrodo, en particular el área de un electrodo de trabajo. En un modo de realización, el agente electrocatalítico es selectivo, es decir, el agente electrocatalítico cataliza específica o semiespecíficamente la reacción electroquímica de un compuesto específico o de una clase de compuestos, por ejemplo, de peróxidos. De acuerdo con la invención, el agente electrocatalítico comprende manganeso, y/o el agente electrocatalítico comprende óxido de manganeso(IV) (MnO_2).

De acuerdo con la invención, la capa de mediador de la presente invención no comprende ningún componente distinto del agente electrocatalítico, en particular está libre de peróxidos de éteres orgánicos, en un modo de realización está libre de éteres orgánicos, en otro modo de realización está libre de disolventes orgánicos. En línea con la invención, la capa de mediador consiste en el agente electrocatalítico; por tanto, la capa de mediador consiste en manganeso y/o en MnO_2, en un modo de realización consiste en MnO_2.

La capa de mediador, es decir, el agente electrocatalítico como se describe anteriormente en el presente documento, se electrodeposita sobre el electrodo de trabajo o electrodos de trabajo, es decir, en particular mediante una semirreacción de una celda galvánica. Los procedimientos para electrodepositar un agente electrocatalítico como se hace referencia en el presente documento son, en principio, conocidos en la técnica. Como se especifica en otra parte en el presente documento, el agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2, o es MnO_2. En dicho caso, el agente electrocatalítico, es decir, MnO_2, se puede, por ejemplo, electrodepositar a partir de una solución acuosa de sulfato de manganeso. Los pH y voltajes adecuados para el electrodepósito de un metal o una sal particular del mismo se pueden derivar, por ejemplo, de un gráfico de Pourbaix. En un modo de realización, el depósito se realiza potenciostáticamente, es decir, aplicando un voltaje constante. El experto en la técnica conoce cómo determinar las condiciones apropiadas para el electrodepósito, en particular los voltajes para el depósito potenciostático, por ejemplo, como se muestra en los ejemplos. Por ejemplo, en un modo de realización, se puede electrodepositar MnO_2 a partir de una solución de $MnSO_4$ que tiene un pH de desde 3 hasta 8, en particular un pH de desde 5 hasta 7, a un potencial de 1 V a 4 V, en particular de 3,0 V a 3,5 V frente a un electrodo de Ag/AgCl. En otro modo de realización, el depósito se realiza galvanostáticamente, es decir, ajustando la corriente de modo que se logre una velocidad de depósito adecuada, que es, en un modo de realización, constante durante el tiempo de depósito. En un modo de realización, el depósito galvanostático se optimiza derivando un intervalo de corriente óptimo a partir de una curva de corriente/potencial establecida para el procedimiento de depósito. Como comprenderá el experto en la técnica, la cantidad de material electrodepositado, en un modo de realización el grosor de la capa, se puede controlar ajustando la corriente de depósito y/o el tiempo de depósito. En un modo de realización, como se muestra en los ejemplos, se puede depositar MnO_2 a partir de una solución de iones de Mn(II), en particular $MnSO_4$ o $MnCl_2$ a una corriente constante de desde 1 µA hasta 15 µA, en un modo de realización de desde 4 hasta 12,5 µA. En otro modo de realización, como se muestra en los ejemplos, se puede depositar Ag a partir de una solución de iones de Ag(I), en particular $AgNO_3$, a una corriente constante de desde 10 µA hasta 300 µA, en un modo de realización de desde 25 µA hasta 275 µA. Como comprenderá el experto en la técnica, la corriente adecuada para el electrodepósito en un electrodo específico depende de una variedad de parámetros adicionales, incluyendo el área del electrodo, la geometría del electrodo, la geometría del campo eléctrico aplicado, en particular el posicionamiento relativo del contraelectrodo, y similares.

El término "enzima", como se usa en el presente documento, se refiere a una macromolécula biológica, en particular un polipéptido, que cataliza en presencia de un analito una reacción química que produce o consume un compuesto, cuya conversión electroquímica se cataliza por el agente electrocatalítico como se especifica en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, la enzima es una oxidasa; en otro modo de realización, la enzima produce un peróxido en presencia de un analito, en particular produce peróxido de hidrógeno; por tanto, en un modo de realización, la enzima es una oxidasa que produce peróxido de hidrógeno, por ejemplo, una glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5), colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6), galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9), alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13), L-gulonolactona oxidasa (EC 1.1.3.8), NAD(P)H oxidasa (formadora de H_2O_2, EC 1.6.3.1), NADH oxidasa (formadora de H_2O_2, EC 1.6.3.3) o catalasa (EC 1.11.1.6). En un modo de realización, la enzima es glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4).

El término "capa de enzima", como se usa en el presente documento, se refiere a una capa que comprende una enzima como se especifica anteriormente en el presente documento. En un modo de realización, la capa de enzima comprende componentes adicionales, en particular un polipéptido adicional, por ejemplo una proteína portadora que se puede aplicar en una proporción sustancialmente fija con la enzima. El término "proteína portadora", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o una mezcla de proteínas que carece(n) de al menos una actividad catalítica que produzca un compuesto determinable por el biosensor de la invención; en particular, la proteína portadora no tiene una actividad enzimática conocida y/o es una proteína inactivada por calor. En un modo de realización, la enzima y la proteína portadora se distribuyen de manera sustancialmente uniforme por toda la capa de enzima. Típicamente, la capa de enzima es delgada, por ejemplo, tiene un grosor de desde 1 nm hasta 10 µm, en un modo de realización de desde 2 nm hasta 5 µm. Las capas de enzima de este grosor se pueden fabricar, por ejemplo, por electrodepósito o por serigrafía. Como se entenderá, en

particular para la serigrafía de una capa de enzima, la enzima se puede dispersar en una composición que comprende aditivos adicionales, incluyendo rellenos, disolventes, mediadores de adherencia y similares bien conocidos en la técnica. En un modo de realización típico, la capa de enzima es muy delgada, por ejemplo, tiene un grosor de aproximadamente 1 µm, aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 0,25 µm o aproximadamente 0,1 µm. Se pueden obtener capas de enzima de dicho grosor distribuyendo o pulverizando la enzima y, potencialmente, los aditivos que pueden estar presentes disueltos en un disolvente apropiado, por ejemplo, agua o un tampón acuoso.

El sensor puede comprender además al menos un material eléctricamente aislante. El material eléctricamente aislante se puede aplicar al sustrato, tal como recubriendo el sustrato con una o más capas del al menos un material eléctricamente aislante. Como ejemplo, el material eléctricamente aislante puede comprender una o más resinas eléctricamente aislantes. Por tanto, el sustrato se puede recubrir total o parcialmente con una o más capas de la resina eléctricamente aislante. Adicionalmente o de forma alternativa, se pueden usar otros tipos de materiales aislantes que cubran total o parcialmente el sustrato. El al menos un material eléctricamente aislante se puede aplicar directa o indirectamente al sustrato, tal como mediante técnicas de recubrimiento. De nuevo, adicionalmente o de forma alternativa, el material eléctricamente aislante puede formar parte del propio sustrato. Por tanto, el propio sustrato puede estar hecho total o parcialmente de al menos un material eléctricamente aislante. Como ejemplo, el sustrato puede estar hecho total o parcialmente de un material plástico aislante tal como un poliéster aislante y/o puede estar hecho total o parcialmente de un material aislante tal como papel y/o un material cerámico aislante.

De forma ventajosa, se encontró durante el trabajo subyacente a la presente invención, que una capa de mediador como MnO_2 se puede electrodepositar sobre un electrodo de trabajo de un biosensor y que dicho electrodepósito da lugar a una capa homogénea, firmemente adherente y con una gran superficie. Además, se puede ahorrar el esfuerzo técnico relacionado con la serigrafía de dicha capa. Además, dado que el nuevo procedimiento no requiere el uso de una pasta de serigrafía que incluya DEGMBE, no existen éteres peroxidados presentes en la capa de mediador y, por tanto, las corrientes cero de los nuevos sensores son muy bajas. Por el mismo motivo, los nuevos biosensores tampoco requieren una ejecución previa. Además, usando el procedimiento de la presente invención, se puede definir con mayor exactitud el tamaño de un electrodo de trabajo, ya que se evita la variabilidad provocada por la serigrafía. Además, se puede definir con mayor exactitud la cantidad de mediador depositado durante el depósito galvánico. Por tanto, se puede reducir la variabilidad entre lotes, por ejemplo, de las tiras reactivas de analito.

Las definiciones realizadas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a lo que sigue. Las definiciones y explicaciones adicionales realizadas más adelante también se aplican *mutatis mutandis* a todos los modos de realización descritos en esta memoria descriptiva.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación de un biosensor, que comprende

a) proporcionar un sustrato que tiene al menos una almohadilla conductora,

b) electrodepositar una capa de mediador sobre al menos parte de dicha almohadilla conductora, en el que dicha almohadilla conductora está en contacto directo con dicha capa de mediador, en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2, y

c) depositar una capa de enzima sobre al menos parte de dicha capa de mediador, en el que depositar dicha capa de enzima comprende depositar una enzima que produce un peróxido en presencia de un analito, en el que dicho analito es glucosa.

El procedimiento de fabricación de la presente invención, en un modo de realización, puede comprender etapas adicionales a las mencionadas anteriormente de forma explícita. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden estar relacionadas, por ejemplo, con el revestimiento de una almohadilla conductora sobre un sustrato para la etapa a), o con la aplicación de una capa adicional en, antes o después de la etapa b). Además, una o más de dichas etapas se pueden realizar por un equipo automatizado. Además, el procedimiento de fabricación puede comprender adicionalmente la aplicación de una técnica de recubrimiento, por ejemplo, una o más de las siguientes técnicas: una técnica de impresión; una técnica de distribución. La técnica de impresión puede comprender una técnica de impresión arbitraria, tal como serigrafía, impresión con chorro de tinta, impresión por estarcido, impresión offset, impresión por tampón o cualquier otra técnica de impresión o cualquier combinación arbitraria de las mismas. Adicionalmente o de forma alternativa, se pueden emplear otras técnicas de recubrimiento.

Además, el procedimiento de fabricación puede comprender etapas adicionales, tales como al menos otra etapa para proporcionar al menos una almohadilla conductora y/o al menos una ruta conductora del contraelectrodo en el sustrato, aplicar un recubrimiento en la que se aplica una capa adicional a la almohadilla conductora y/o en la que se aplica el material del contraelectrodo a la almohadilla conductora del contraelectrodo mediante al menos una técnica de recubrimiento, tal como mediante al menos una técnica de impresión y/o al menos una técnica de

distribución. En caso de que se use una técnica de impresión, la al menos una técnica de impresión puede comprender uno o más tipos diferentes de técnicas de impresión. En un modo de realización, la técnica de impresión comprende al menos una técnica de serigrafía. El material de referencia y/o el material del contraelectrodo, como se describe anteriormente, se pueden aplicar como una pasta. El material de referencia y/o el material del contraelectrodo pueden recubrir además una o más aberturas de un material eléctricamente aislante, tal como mediante al menos una de una técnica de impresión y una técnica de distribución, tal como por serigrafía. Adicionalmente o de forma alternativa, se puede aplicar un material aislante después del recubrimiento, tal como después de la impresión y/o distribución, del material eléctricamente conductor del sensor y/o del material eléctricamente conductor del contraelectrodo, respectivamente.

Además, la presente invención se refiere a un biosensor producido o producible de acuerdo con el procedimiento de fabricación de la presente invención.

Además, la presente invención se refiere al uso de un biosensor de acuerdo con la presente invención para determinar un analito en una muestra.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar un analito en una muestra, que comprende

a) poner en contacto dicha muestra con una capa de enzima de un biosensor,

comprendiendo dicho biosensor un sustrato, un electrodo de trabajo que comprende una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador electrodepositada que consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2, una capa de enzima en contacto que permite la difusión con dicha capa de mediador, y al menos un contraelectrodo,

b) cerrar un circuito eléctrico que comprende dicho electrodo de trabajo, dicha capa de mediador y dicho contraelectrodo,

c) aplicar un voltaje al circuito eléctrico de la etapa b), medir la corriente resultante y, de este modo,

d) detectar dicho analito en dicha muestra,

en el que dicho analito es glucosa.

El procedimiento de detección de la presente invención puede ser un procedimiento *in vitro*, realizado en una muestra de un sujeto, o un procedimiento *in vivo*, en caso de que el biosensor se implante en el cuerpo de un sujeto. Además, el procedimientos de detección pueden comprender etapas además de las mencionadas anteriormente de forma explícita. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden estar relacionadas, por ejemplo, con la obtención de una muestra o la implantación del biosensor para la etapa a), o la realización de calibraciones y/o cálculos sobre los valores obtenidos en la etapa c). Además, una o más de dichas etapas se pueden realizar por un equipo automatizado.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un vertebrado. En un modo de realización, el sujeto es un mamífero, en otro modo de realización, un ratón, rata, gato, perro, hámster, cobaya, oveja, cabra, cerdo, ganado o caballo. Todavía en otro modo de realización, el sujeto es un primate. En otro modo de realización, el sujeto es un ser humano. En un modo de realización, el sujeto padece o se sospecha que padece una enfermedad o afección asociada con una desviación mensurable de la normalidad de al menos un analito. En otro modo de realización, el sujeto es un sujeto que padece o se sospecha que padece diabetes, en particular diabetes de tipo II.

El procedimiento de detección de la invención puede comprender además una medición amperométrica, por ejemplo, cuando una muestra que contiene un analito se pone en contacto con el biosensor, el analito, la enzima y el agente electrocatalítico participan en una reacción en la que el analito se reduce (recibe al menos un electrón) o bien se oxida (dona al menos un electrón). Típicamente, el analito se oxida. Después de que se complete esta reacción, se puede aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Por tanto, en un modo de realización, después del inicio de la reacción, se usa una fuente de alimentación (por ejemplo, una batería) para aplicar una diferencia de potencial entre los electrodos y, por ejemplo, se mide una corriente de ensayo en estado estable mediante un medidor que mide corriente. La corriente medida se puede correlacionar con la concentración de analito; por ejemplo, la magnitud de la corriente, en particular cuando se mide en una condición de estado cuasiestable, se puede correlacionar con la cantidad de producto de reacción presente y, en consecuencia, con la cantidad de analito en la muestra. La diferencia de potencial aplicada se selecciona de modo que se produzca la electrooxidación de al menos un producto de reacción en la superficie del electrodo de trabajo. El electrodo de trabajo de acuerdo con la presente invención está en estrecho contacto, en un modo de realización en contacto directo, con la capa de mediador del biosensor; por tanto, el producto de reacción se puede oxidar o reducir rápidamente en el electrodo de trabajo. En general, los analitos, las enzimas y sus

productos de reacción son los especificados anteriormente en el presente documento. En un modo de realización, el biosensor es un biosensor de acuerdo con la presente invención.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: cronoamperometría galvanostática del depósito galvánico de Ag a 250 µA en el ejemplo 1. Eje de ordenadas: tiempo t (s); eje de abscisas: potencial ΔU (V).

Fig. 2: estabilidad del potencial de un electrodo producido por electrodepósito de plata, seguida de electrooxidación en solución que contiene cloruro. Se muestra el potencial frente a un electrodo de MnO_2 a lo largo del tiempo; línea discontinua: solo Ag (antes de la oxidación), línea continua: AgCl (después de la oxidación). Eje de ordenadas: tiempo t (s); eje de abscisas: potencial ΔU (V).

Fig. 3: determinación del voltaje de depósito para depositar MnO_2 a partir de una solución de $MnSO_4$; voltamograma cíclico galvanostático de $MnSO_4$ a un potencial de 350 mV frente a Ag/AgCl / Cl^-0,15 M. Eje de ordenadas: corriente I (A); eje de abscisas: potencial ΔU (V).

Fig. 4: funcionalidad de una capa de MnO_2 electrodepositada en catálisis de oxidación electroquímica de H_2O_2. En los puntos temporales de 100 s, 280 s, 430 s y 550 s, se añadió H_2O_2, seguido de mezclado esporádico (100 s), mezclado moderado (280 s), mezclado intensivo (430 s) y mezclado intensivo invirtiendo toda la celda del sensor (550 s). Eje de ordenadas: tiempo t (s); eje de abscisas: corriente I (A).

Los siguientes ejemplos meramente ilustrarán la invención. No se interpretarán, de ningún modo, para limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: depósito de plata sobre un sustrato: electrodo de referencia

Se usó una configuración de 3 electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia, contraelectrodo; todos teniendo almohadillas de Au) en un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N. Usando cronopotenciometría galvanostática a -250 µA (fig. 1), se pudo obtener una velocidad particularmente alta de depósito de plata a partir de una solución de nitrato de plata sobre una almohadilla de electrodo de oro; el depósito comienza aproximadamente a -120 mV (en comparación con la pseudo-referencia de Au en la solución de $AgNO_3$). La plata brillante depositada era visible en el microscopio. La cantidad depositada se determinó como: Carga Q = 180 s x 250 µA = 45 mC; cantidad de sustancia n = Q/F = (45 E-3 C)/96484 C/mol = 460 nmol. En consecuencia, se puede depositar galvánicamente plata de forma selectiva sobre una almohadilla de electrodo de referencia.

Ejemplo 2: estabilidad del potencial después de la oxidación parcial

Para someter a prueba su utilidad como electrodo de referencia, se sometió a prueba la estabilidad del potencial del electrodo recubierto con Ag del ejemplo 1. El electrodo mostró inicialmente el potencial de referencia esperado (aprox. 275-325 mV frente a dióxido de manganeso) sin oxidación; sin embargo, el potencial no era estable. Después de una oxidación galvanostática corta (10 segundos) a 1 µA en una solución que contenía iones cloruro, el potencial contra MnO_2 fue esencialmente constante. Se ajustó la proporción Ag/AgCl por medio de la cantidad de carga aplicada. En la figura 2, se usó un depósito de Ag a 45 mC (ejemplo 1) (línea discontinua) y solo la oxidación a AgCl a 10 µC (línea continua), lo que redujo drásticamente la deriva del potencial.

Ejemplo 3: depósito de MnO_2 sobre un sustrato: electrodo de trabajo

Se depositó MnO_2 sobre múltiples almohadillas de un electrodo de sensor en una configuración de 2 electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia/contraelectrodo, electrodo de referencia de sensor no usado), usando un voltamograma cíclico galvanostático desde 0 a 15 µA (frente a un electrodo de referencia/contraelectrodo en Mn^{2+}); el potencial de depósito fue de 3,4 V con un voltaje de disco de electrodo de referencia = contraelectrodo a 2 V en el contraelectrodo del sensor (fig. 3). En estas condiciones, se depositó MnO_2 sobre todas las almohadillas de electrodo de trabajo. En consecuencia, el depósito galvánico de MnO_2 es posible.

Ejemplo 4: pruebas de funcionalidad (oxidación de H_2O_2)

Se sometió a prueba la funcionalidad del MnO_2 electrodepositado en la oxidación de H_2O_2 y la funcionalidad del electrodo de referencia de Ag/AgCl en una cronoamperometría a 350 mV frente a la referencia del sensor y la adición de H_2O_2. Como se muestra en la fig. 4, el sensor muestra una señal dependiente de H_2O_2 a 350 mV. Cabe destacar que la corriente cero es muy baja (aproximadamente 50 pA). Además, no se observa un rodaje de corriente cero, ya que el electrodo depositado galvánicamente no contiene peróxidos de éter del disolvente en pasta DEGMBE.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor para determinar un analito que comprende un sustrato, un electrodo de trabajo que comprende una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador y una capa de enzima en contacto que permite la difusión con dicha capa de mediador,

en el que dicha capa de mediador es una capa de mediador electrodepositada, y en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico,

en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2; y

en el que dicho analito es glucosa.

2. El biosensor de la reivindicación 1, en el que dicho agente electrocatalítico es un agente que cataliza al menos una reacción electroquímica disminuyendo el sobrepotencial requerido para que se produzca dicha reacción electroquímica y/o incrementando la velocidad a la que se produce dicha reacción electroquímica.

3. El biosensor de la reivindicación 2, en el que dicho agente electrocatalítico es un agente que cataliza al menos una reacción electroquímica disminuyendo selectivamente el sobrepotencial requerido para que se produzca dicha reacción electroquímica y/o incrementando la velocidad a la que se produce dicha reacción electroquímica.

4. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho electrodo de trabajo comprende una multiplicidad de almohadillas eléctricamente conductoras, de las cuales al menos una, en un modo de realización al menos dos, en otro modo de realización la mitad, en otro modo de realización todas, están en contacto directo con una capa de mediador que está en contacto que permite la difusión con una capa de enzima.

5. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho biosensor comprende además un contraelectrodo, en un modo de realización comprende además un electrodo de referencia y un contraelectrodo, en un modo de realización, en el que dicho contraelectrodo se sitúa en el lado opuesto de dicho sustrato con respecto al electrodo de trabajo.

6. El biosensor de la reivindicación 5, en el que dicho electrodo de referencia comprende una capa de material de referencia, en un modo de realización, material de referencia electrodepositado.

7. El biosensor de la reivindicación 5 o 6, en el que dicho material de referencia comprende plata, que en un modo de realización comprende plata y cloruro de plata.

8. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha capa de enzima comprende una enzima que produce un peróxido en presencia de un analito, en un modo de realización, en el que dicho peróxido es peróxido de hidrógeno.

9. Un procedimiento para fabricar un biosensor, que comprende

a) proporcionar un sustrato que tiene al menos una almohadilla conductora,

b) electrodepositar una capa de mediador sobre al menos parte de dicha almohadilla conductora, en el que dicha almohadilla conductora está en contacto directo con dicha capa de mediador, en el que dicha capa de mediador consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2, y

c) depositar una capa de enzima sobre al menos parte de dicha capa de mediador, en el que depositar dicha capa de enzima comprende depositar una enzima que produce un peróxido en presencia de un analito, en el que dicho analito es glucosa.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho procedimiento comprende proporcionar un sustrato que comprende además al menos uno de un electrodo de referencia y un contraelectrodo, en un modo de realización que comprende además un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que dicho procedimiento comprende además electrodepositar una capa de material de referencia sobre dicho electrodo de referencia.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha capa de enzima se deposita mediante distribución, mediante pulverización o mediante serigrafía.

13. Uso de un biosensor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para determinar un analito en una muestra, en el que dicho analito es glucosa.

14. Un procedimiento para detectar un analito en una muestra, que comprende

a) poner en contacto dicha muestra con una capa de enzima de un biosensor,

comprendiendo dicho biosensor un sustrato, un electrodo de trabajo que comprende una almohadilla eléctricamente conductora en contacto directo con una capa de mediador electrodepositada que consiste en un agente electrocatalítico, en el que dicho agente electrocatalítico es manganeso y MnO_2 o MnO_2, una capa de enzima en contacto que permite la difusión con dicha capa de mediador, y al menos un contraelectrodo,

b) cerrar un circuito eléctrico que comprende dicho electrodo de trabajo, dicha capa de mediador y dicho contraelectrodo,

c) aplicar un voltaje al circuito eléctrico de la etapa b), medir la corriente resultante y, de este modo,

d) detectar dicho analito en dicha muestra;

en el que dicho analito es glucosa.

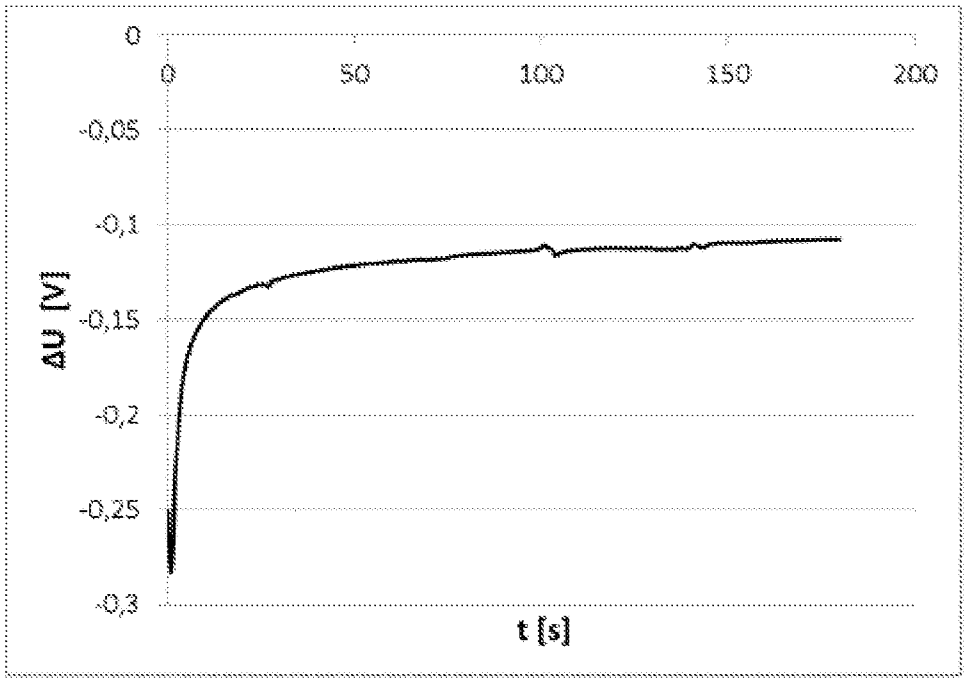

0
0
50
100
150
200
-0,05
-0,1
-0,15
-0,2
-0,25
-0,3
Δu [V]
t [s]

Fig. 1

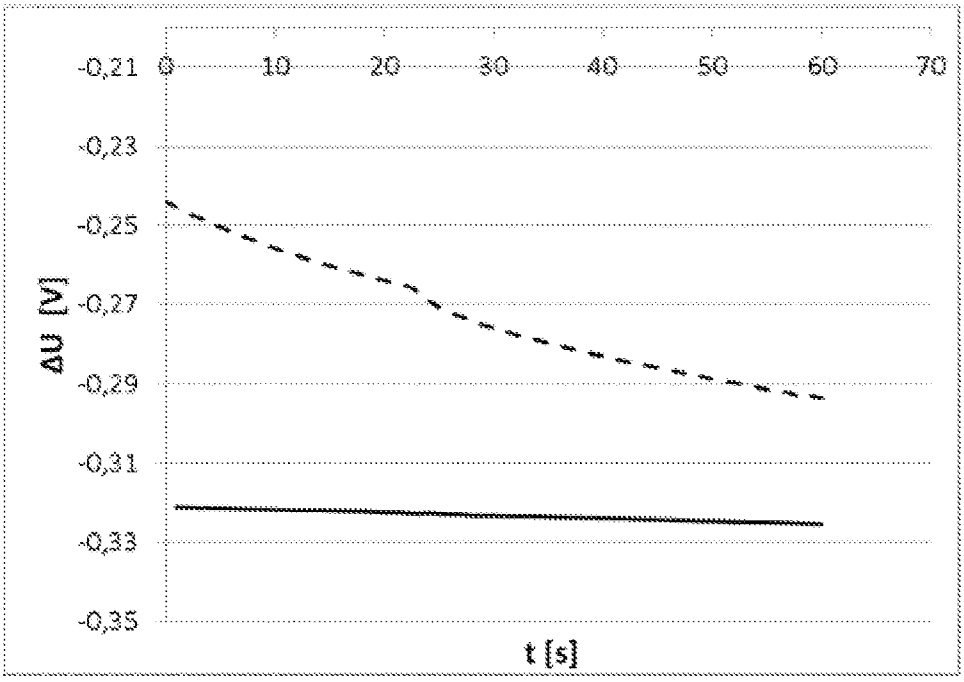

-0,21
0
10
20
30
40
50
60
70
-0,23
-0,25
-0,27
-0,29
-0,31
-0,33
-0,35
Δu [V]
t [s]

Fig. 2

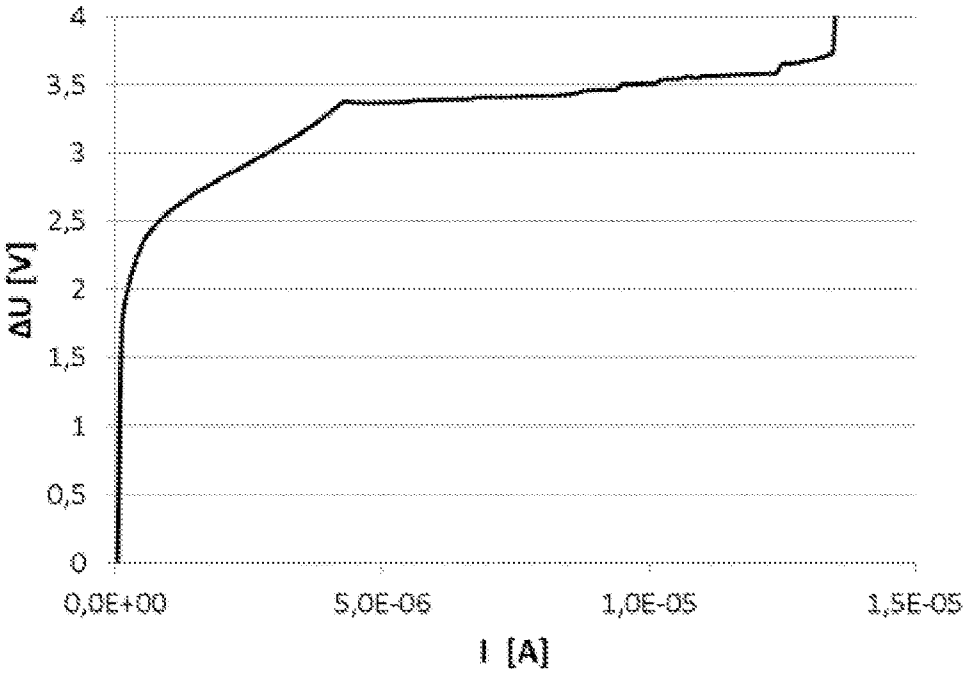

4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
ΔU [V]
0,0E+00
5,0E-06
1,0E-05
1,5E-05
I [A]

Fig. 3

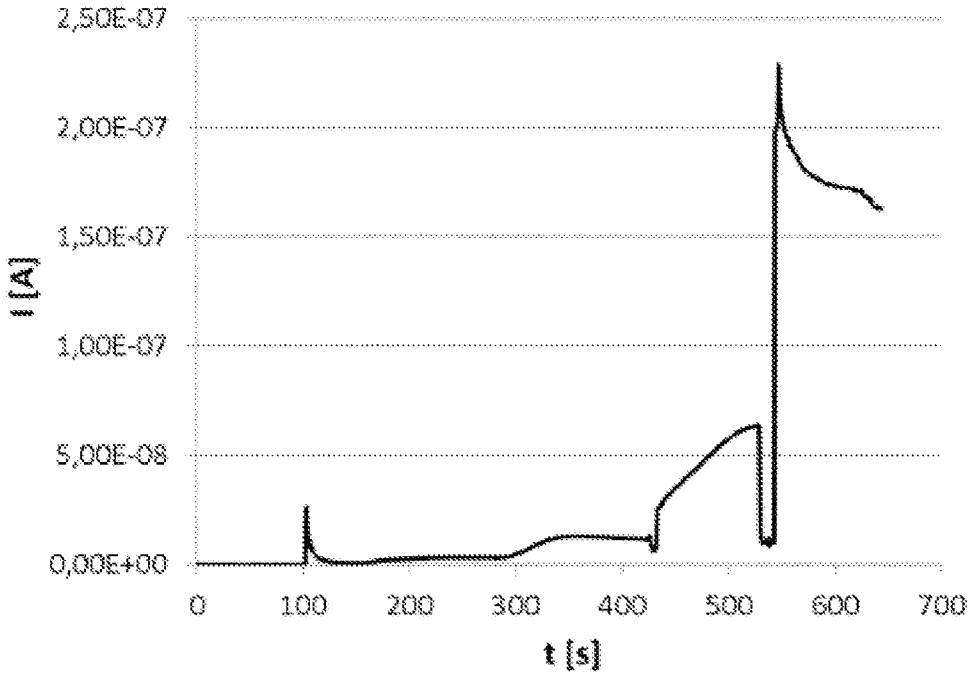

2,50E-07
2,00E-07
1,50E-07
1,00E-07
5,00E-08
0,00E+00
I [A]
0
100
200
300
400
500
600
700
t [s]

Fig. 4