



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 744**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**A61B 5/00** (2006.01)  
**A61M 31/00** (2006.01)  
**G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/566** (2006.01)  
**G01N 33/66** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05815307 .3**  
96 Fecha de presentación : **14.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1805518**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

54 Título: **Dispositivo de fibra óptica para detectar analitos y su procedimiento de fabricación.**

30 Prioridad: **19.10.2004 US 967220**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.05.2011**

73 Titular/es: **BECTON, DICKINSON & COMPANY**  
**1 Becton Drive**  
**Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US**

72 Inventor/es: **Jacobson, Ross, W.;**  
**Weidemaier, Kristin;**  
**Alarcon, Javier;**  
**Herdman, Christopher y**  
**Keith, Steven**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 744 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

Dispositivo de fibra óptica para detectar analitos y su procedimiento de fabricación

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un dispositivo que se puede usar para vigilar las concentraciones de compuestos fisiológicamente relevantes

**Antecedentes de la invención**

10 El control de concentraciones *in vivo* de compuestos fisiológicamente relevantes para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos es una meta deseable y podría mejorar la vida de muchas personas. Los avances en este campo se muestran particularmente prometedores en el área de facilitar un control metabólico adecuado en diabéticos. Actualmente, la mayor parte de los diabéticos usa el procedimiento de la "tira reactiva en dedo" para vigilar el nivel de glucosa en sangre, y el seguimiento de este procedimiento por el paciente es problemático debido al dolor producido por los frecuentes pinchazos en el dedo. Como consecuencia, se han hecho esfuerzos para desarrollar procedimientos no invasivos o mínimamente invasivos *in vivo* y más eficaces *in vitro* para vigilar de manera frecuente y/o continua la glucosa en sangre u otros fluidos biológicos.

15 Las soluciones para el control *in vivo* de manera frecuente y/o continua tienden a clasificarse en dos categorías generales: "no invasiva" y "mínimamente invasiva". El control no invasivo determina los niveles de analito rastreando directamente cambios espectroscópicos en la piel y el tejido. La espectroscopía de radiación infrarroja y de impedancia de ondas de radio son ejemplos de esta tecnología. El progreso con estas soluciones ha sido lento debido a la necesidad de una calibración frecuente, iluminación reproducible de la muestra, y varianzas en los fondos espectroscópicos entre individuos. La solución "mínimamente invasiva" evita la extracción directa de sangre del cuerpo y se basa en la vigilancia de cambios de señal en los fluidos biológicos usando un elemento detector intermedio. Los biosensores de este tipo son dispositivos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica usando un elemento de reconocimiento biológico que se combina con un elemento de transducción (de detección).

20 La mayor parte de sistemas convencionales para el control frecuente o continuo del analito implican biosensores amperométricos que emplean enzimas tales como glucosa oxidasa (GOx) para oxidar glucosa a ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno, generando una señal electroquímica. Estos sensores están sometidos a una medida imprecisa debido a la deficiencia de oxígeno y a la aparición de subproductos de oxidación. Una medida precisa de las concentraciones de glucosa requiere un exceso de oxígeno, que generalmente no está presente en la sangre o el fluido intersticial humano. También, la propia reacción electroquímica genera la aparición de subproductos de oxidación que pueden inhibir o degradar la enzima y su capa protectora.

25 Se han desarrollado también biosensores basados en señales ópticas en lugar de electromecánicas, y pueden ofrecer mejoras significativas en la estabilidad y en la calibración. Por ejemplo referenciar una señal óptica dependiente del analito a una segunda señal independiente del analito puede corregir las fuentes de ruido e inestabilidad en el sensor. Sin embargo, no se ha explotado todavía el potencial de detección óptica para la detección *in vivo* del analito. Una razón para esto es que muchos procedimientos de detección óptica actuales se basan en la química enzimática tales como la glucosa oxidasa. En un procedimiento común, se usa un colorante fluorescente sensible a oxígeno para vigilar el consumo de oxígeno por la reacción enzimática de la GOx. Aunque se trata de un biosensor óptico, en el que el nivel de la señal de fluorescencia varía con el cambio de los niveles de oxígeno, dicho sensor está sometido a los mismos problemas que los dispositivos amperométricos basados en esta misma química: deficiencia de oxígeno y degradación enzimática.

30 Para superar los desafíos asociados con la detección de la enzima (por ejemplo, la GOx), ya sea electroquímica como óptica, se está explorando la detección óptica o fluorescente basada en proteínas no enzimáticas. Se han usado concanavalina A y dextrano marcados para crear un ensayo competitivo FRET; sin embargo, este sistema requiere atrapar ambos componentes, y el intervalo dinámico del ensayo está limitado. Véase Ballerstadt, R., Schultz, J.S.; "Competitive-binding assay method based on fluorescence quenching of ligands held in close proximity by a multivalent receptor." Anal. Chem. Acta 345 (1- 3): 203-212 (1997). Véase también, Russell, R.J., Pishko M.V., Gefrides C.C., McShane, M. J., Cote, G.L.; "A fluorescence-based glucose biosensor using concanavalin A and dextran encapsulated in a poly(ethylene glycol) hydrogel" Anal. Chem. 71 (15): 3126- 3132 (1999).

35 Otra química de detección basada en proteínas usa el receptor periplásmico de *Escherichia coli* (*E. coli*), la proteína de unión a glucosa-galactosa (GGBP) para generar una señal de fluorescencia en respuesta a la unión a la glucosa. Véanse, por ejemplo, Tolosa, L., I. Gryczynski, L. R. Eichhorn, J. D. Dattelbaum, F. N. Castellano, G. Rao, y J. R. Lakowicz; "Glucose sensor for low-cost lifetime-based sensing using a genetically engineered protein" Anal. Biochem. 267: 114-120 (1999); Hellings, H. W., and J. S. Marvin; "Protein engineering and the development of generic

biosensors." Trends Biotechnol. 16: 183-189 (1998); Salins, L. L., R. A. Ware, C. M. Ensor, y S. Daunert, "A novel reagentless sensing system for measuring glucose based on the galactose/glucose-binding protein" Anal Biochem 294: 19-26 (2001); y de Lorimier, R. M., J. J. Smith, M. A. Dwyer, L. L. Looger, K. M. Sali, C. D. Paavola, S. S. Rizk, S. Sadigov, D. W. Conrad, L. Loew, y H. W. Hellinga. "Construction of a fluorescent biosensor family" Protein Sci. 11: 2655-2675 (2002). La GGBP experimenta un cambio de conformación sustancial tras la unión al ligando, atrapando el ligando entre sus dos dominios globulares. Véase, por ejemplo, Shilton, B. H., M. M. Flocco, M. Nilsson, y S. L. Mowbray; "Conformational changes of three periplasmic preceptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose- and ribosebinding proteins" J. Mol. Biol. 264: 350-363 (1996). Si se marca de manera sitioespecífica la proteína con un fluoróforo ambientalmente sensible, se puede aprovechar este atributo para generar una señal fluorescente. Véase, por ejemplo, Salins, L. L., R. A. Ware, C. M. Ensor, y S. Daunert; "A novel reagentless sensing system for measuring glucose based on the galactose/glucose binding protein" Anal Biochem 294: 19-26 (2001). Debido a que la GGBP ni consume glucosa ni genera productos de reacción, se puede usar como sensor sin reactivo. Esto puede proporcionar mayor precisión y fiabilidad que los biosensores amperométricos.

En el documento WO 00/74763 A2 se da a conocer un dispositivo biosensor que se corresponde con la primera parte de la reivindicación 1. Este dispositivo se proporciona para la administración de fármacos a través de un tejido biológico y para el muestreo controlado de fluidos biológicos de manera mínimamente invasiva, indolora y conveniente. El dispositivo incluye una porción superior o sustrato del cual sobresale una pluralidad de microagujas. El dispositivo de microagujas incluye un sensor o biosensor químico integrado. El sistema de detección del analito puede incluir enzimas que reaccionan con el analito de interés y transductores tanto mecánicos como ópticos que miden el contenido de la reacción.

El documento US 2003/0134346 A1 da a conocer una composición de proteínas de unión mutadas que contienen grupos indicadores para usar en dispositivos biosensores de analitos. Un biosensor de glucosa comprende al menos una proteína de unión mutada y al menos un grupo indicador unido a la anterior para proporcionar un cambio de señal detectable y reversible cuando dicha proteína de unión mutada se expone a concentraciones variantes de glucosa.

El artículo de GE Xudong y col ["DUAL-LABELED GLUCOSE BINDING PROTEIN FOR RATIO-METRIC MEASUREMENTS OF GLUCOSE" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, EE.UU, vol. 76, nº. 5, 1 de marzo 2004 (2004-03-01), páginas 1403-1410, XP001196709 ISSN: 003-2700] describe un dispositivo de control de glucosa muy sensible que comprende una proteína de unión a glucosa.

El documento US 2003/0153026 A1 de la empresa solicitante da a conocer un biosensor que contiene proteínas de unión mutadas que contienen grupos indicadores, en el que las GGBP mutadas están contenidas en una matriz de unión.

Aunque numerosos grupos han desarrollado mutaciones de GGBP capaces de responder a la glucosa en el intervalo fisiológico, no ha habido informes de un dispositivo biosensor funcional basado en la tecnología de la proteína de unión que sea adecuado para el control *in vivo* o *in vitro* del analito. Un biosensor frecuente y/o continuo funcional debe acoplar el elemento de detección a los elementos de detección óptica manteniendo a la vez la integridad y funcionalidad del sensor así como la comodidad del paciente. Por ejemplo, el elemento de reconocimiento biológico y el elemento de transducción acompañante deberían incorporarse preferiblemente dentro del material biocompatible que protege el elemento de detección del sistema inmune, que permite la difusión del analito hacia dentro y fuera y que evita el lixiviado del elemento de detección en la sangre u otro fluido biológico del paciente (por ejemplo, fluido intersticial). Debido a que las proteínas de unión requieren el control de la orientación y la libertad de conformación para permitir el uso eficaz, se considera en la bibliografía que muchas estrategias de absorción física y aleatoria o de unión o inmovilización superficial covalente volumétricas son tanto subóptimas como insatisfactorias. Además, debe concebirse un medio para examinar la muestra con luz de una manera reproducible y/o controlada.

Una solución generalmente conocida es acoplar el elemento de detección a un extremo de una fibra óptica y acoplar los elementos ópticos tales como las fuentes o los detectores de excitación al otro extremo. Sin embargo, el acoplamiento de proteínas de unión a un extremo de una fibra óptica está sometido al estímulo anteriormente mencionado de preservar la movilidad de conformación y/o de orientación de la proteína. Además, el cableado de fibra óptica no es a menudo práctico desde el punto de vista del uso por un paciente debido a que los pacientes pueden necesitar retirar o sustituir el sensor periódicamente. La sustitución de la fibra completa puede ser costosa e inconveniente. Finalmente, el sistema óptico, que comprende, por ejemplo, fuentes de excitación, detectores, y otros elementos ópticos debe ser suficientemente robusto para tolerar o corregir cambios en la alineación óptica debido, por ejemplo, al movimiento del paciente o deriva electrónica en el lector óptico. El sistema óptico debe ser también lo suficientemente sensible para detectar la señal de los colorantes indicadores sin depender de un elevado consumo de energía eléctrica y/o de elementos sobredimensionados que podrían hacer al lector del sistema no portátil y por tanto no poderse llevar puesto.

**Resumen de la invención**

Es un objeto de la invención proporcionar un dispositivo biosensor para detectar un analito diana en una muestra que incorpora en su elemento de detección una proteína de unión con movilidad de conformación y/o de orientación, acoplado a elementos de detección óptica que proporcionan un dispositivo robusto que se puede llevar puesto.

- 5 El dispositivo biosensor de la invención está comprendiendo una pluralidad de agujas que tienen un extremo proximal y un extremo distal y que se unen a una montura individual, y al menos una aguja comprende un elemento de detección unido a la superficie interna de la aguja. Está caracterizado porque dicho elemento de detección comprende al menos una proteína de unión periplásmica adaptada para unirse con al menos un analito diana y al menos un grupo indicador asociado con la proteína de unión, en el que el grupo indicador está adaptado para experimentar un cambio de
- 10 luminiscencia tras la unión de la proteína de unión al analito diana, en el que una fibra óptica que tiene un extremo proximal y un extremo distal se aloja al menos parcialmente en el interior de la aguja y la matriz polimérica se une covalentemente al extremo distal de la fibra óptica mediante grupos reactivos en la matriz polimérica.

La invención se refiere además a un procedimiento para la fabricación de un dispositivo biosensor para detectar un analito diana en una muestra que comprende:

- 15 proporcionar una aguja que tiene un extremo proximal y un extremo distal que incluye una punta biselada;  
insertar un extremo distal de una fibra óptica en las cánula de la aguja;

- proporcionar una matriz polimérica que atrapa un elemento de detección o a la que se une un elemento de detección, y cuya matriz polimérica se une covalentemente al extremo distal de la fibra óptica, en el que el elemento de detección (6) comprende al menos una proteína de unión periplásmica marcada de forma luminiscente adaptada para
- 20 experimentar un cambio de luminiscencia tras la unión a la proteína de unión en el analito diana.

- La presente invención se refiere a un dispositivo para detectar la concentración de un analito diana en una muestra. La muestra puede ser sangre, saliva, lágrimas, sudor, orina, fluido cerebroespinal, fluido linfático, fluido intersticial, plasma, suero de tejido animal y medios. El dispositivo comprende generalmente: (i) un conducto óptico que tiene un extremo proximal y un extremo distal; y (ii) un elemento de detección en proximidad óptica al extremo distal del conducto óptico que comprende al menos una proteína de unión que está adaptada para unirse con al menos un analito diana; comprendiendo también dicho elemento de detección al menos un grupo indicador.
- 25

- El conducto óptico, que puede variar en longitud desde aproximadamente 0,1 cm a 1 metro, acopla la luz hacia dentro y hacia fuera de un sistema óptico y hacia dentro y hacia fuera del elemento de detección. Por ejemplo, el conducto óptico puede ser una lente, un canal de reflexión, una aguja; o una fibra óptica. La fibra óptica puede ser tanto una
- 30 única hebra de fibra óptica (individual o multimodo) como un haz de más de una fibra. El haz de fibras puede estar bifurcado. La fibra puede estar sin ahusar o ahusada de tal manera que puede penetrar la piel de un paciente.

- Se puede conectar un sistema óptico al extremo proximal del conducto óptico. El sistema óptico está constituido por una combinación de una o más fuentes de excitación y uno o más detectores. Puede estar constituido además por filtros, elementos dicróicos, una fuente de tensión energía, y la electrónica para la detección y modulación de la señal.
- 35 El sistema óptico puede incluir opcionalmente un microprocesador.

- El sistema óptico examina la muestra de manera tanto continua como intermitente acoplando en el conducto óptico. La una o más longitudes de onda de luz de examen atraviesan a continuación el conducto óptico e iluminan el elemento de detección. Un cambio en la concentración del analito da como resultado un cambio de la longitud de onda, intensidad, duración, eficacia de transferencia de energía, y/o polarización de la luminiscencia del grupo indicador, que es una parte del elemento de detección. La señal de luminiscencia cambiada resultante pasa de nuevo a través del
- 40 conducto óptico del sistema óptico, donde se detecta, interpreta, y almacena y/o muestra. El sistema óptico puede comprender múltiples fuentes de excitación. Una o más de estas fuentes pueden estar moduladas para permitir el procesamiento dinámico de la señal, aumentando por tanto la relación señal a ruido y la sensibilidad de la detección. Se puede usar también la modulación para reducir el consumo de energía eléctrica del dispositivo o para aumentar la vida útil del elemento de detección minimizando fenómenos indeseables tales como el fotoblanqueamiento. El sistema óptico puede incluir también uno o más detectores de energía electromagnética que se pueden usar para detectar la señal de luminiscencia procedente de los grupos indicador y de referencia opcional así como para la referenciación y/o la calibración interna. El consumo de energía eléctrica global del sistema óptico se mantiene pequeño para permitir que el dispositivo funcione usando la energía eléctrica de una pila.
- 45

- El elemento de detección comprende una o más proteínas de unión que están adaptadas a unirse con al menos un analito diana, y al menos un grupo indicador. Una proteína de unión adecuada puede ser cualquiera que se adapte para el uso como un biosensor. Por ejemplo, la proteína de unión adecuada puede ser una cualquiera de las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos relacionada con otra y de titularidad compartida N° 2003/0153026; Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2003/0134346; Publicación de Solicitud
- 50

de Patente de los Estados Unidos N° 2003/0130167; y Solicitud de Patente de los Estados Unidos con N° de Serie 10/721.091 para "Compositions and Methods for Measuring Analyte Concentrations" de Terry Amiss y col., presentada el 26 de noviembre de 2003. Las proteínas de unión adecuadas pueden ser también una de las descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 6.277.627, Patente de los Estados Unidos N° 6197534, o documento WO 03/060464 A2.

5 El grupo indicador, que está asociado a la proteína de unión, está adaptado para experimentar un cambio de luminiscencia tras la unión de la proteína de unión con el analito diana. Tal como se usa en el presente documento, el término "asociado a" significa que el grupo indicador se asocia covalente o no covalentemente con la proteína de unión de tal manera que, tras la unión de un analito diana a la proteína de unión, se produce un cambio en las propiedades de luminiscencia del grupo indicador tales como la longitud de onda, la intensidad, la duración, la eficacia de la transferencia de energía, y/o la polarización. Los ejemplos de grupos indicadores incluyen, pero no se limitan a, colorantes orgánicos, parejas de colorantes orgánicos, proteínas de fusión fluorescentes o bioluminiscentes, o cualquier combinación de las anteriores. El grupo indicador puede estar constituido por un donante y un aceptor que experimentan transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia. Otros restos marcados luminiscentes incluyen lantánidos tales como europio (Eu<sup>3+</sup>) y terbio (Tb<sup>3+</sup>), así como complejos metal-ligando, que incluyen los de rutenio [Ru (II)], renio [Re (I)], u osmio [Os (II)], normalmente en complejos con ligandos de diimina tales como fenantrolinas.

10 El elemento de detección se encuentra en proximidad óptica con el conducto óptico "Proximidad óptica" significa que los componentes del dispositivo están lo suficientemente cercanos entre sí de tal manera que se puede transmitir una señal óptica a o recibirse de un objeto por otro. Se puede colocar el elemento de detección en proximidad óptica con el conducto óptico de numerosas maneras, por ejemplo: unido directamente al conducto óptico; unido a un conector que está unido al conducto óptico, unido a una cadena polimérica o a una matriz polimérica que está unida al conducto óptico; o unido a una cadena polimérica o a una matriz polimérica que está unida a uno conector que está unidos al conducto óptico. El elemento de detección puede fijarse permanentemente al conducto óptico o unirse de manera sustituible de tal manera que el elemento de detección se puede sustituir de modo conveniente y económico.

20 El elemento de detección puede comprender además uno o más grupos de referencia. A diferencia del grupo indicador, el grupo de referencia tiene una señal de luminiscencia que no cambia sustancialmente tras la unión del analito diana a la proteína de unión. "Sustancialmente sin cambios" significa que el cambio de luminiscencia del grupo de referencia es significativamente menor que el cambio de luminiscencia experimentado por el grupo indicador. El grupo de referencia, que puede estar constituido por colorantes y/o proteínas luminiscentes, se usa para la referenciación y la calibración interna. El grupo de referencia se puede unir a cualquier número de componentes del dispositivo incluyendo el elemento de detección, una proteína de unión que no contiene el grupo indicador, la matriz polimérica, la cadena polimérica, una biomolécula que no es una proteína de unión, el conducto óptico, o una punta.

30 El elemento de detección (normalmente esto se refiere a la proteína de unión con el grupo indicador asociado y el grupo de referencia opcional) se puede unir directamente al extremo distal del conducto óptico usando por ejemplo interacciones covalentes, iónicas, o de Van der Waals, revestimiento por inmersión, revestimiento por rotación, revestimiento por plasma, o deposición a vacío. El elemento de detección se puede unir a un conector, lo que permite al elemento de detección ser desconectable fácilmente de tal manera que se convierte en sustituible.

35 El elemento de detección se une a o inmoviliza en una matriz polimérica. Tal como se usa en el presente documento, el término "matriz" puede ser cualquier estructura bidimensional o tridimensional que es permeable a un analito. La matriz puede, opcionalmente, evitar la interferencia sustancial de otras biomoléculas y puede ser sustancialmente biocompatible. La matriz permite a la proteína de unión retener cierto grado de movilidad de conformación y/u orientación. La matriz puede estar constituida por múltiples capas, con una capa interna que sirve para retener la proteína de unión, y una o más capas externas para controlar la permeabilidad y/o conseguir la biocompatibilidad. Por ejemplo, la matriz polimérica puede ser una cualquiera de las descritas en la Solicitud de los Estados Unidos relacionada con otra y de titularidad compartida 10/428.295, presentada el 2 de mayo de 2003. La inmovilización se lleva a cabo enlazando covalentemente el elemento de detección a la matriz polimérica. La matriz polimérica atrapa físicamente el elemento de detección, los poros de la matriz están dimensionados para retener el elemento de detección. El elemento de detección se une a la matriz usando, por ejemplo, un enlace covalente o iónico. La matriz polimérica se puede unir al extremo distal del conducto óptico.

40 El dispositivo comprende además una punta (tanto ahusada como sin ahusar) que se diseña para perforar la piel para permitir al elemento de detección entrar en contacto con los fluidos corporales en el espacio intradérmico o subcutáneo. Preferiblemente, la punta es desechable. La punta puede estar hecha de plástico, acero, vidrio, polímero, o cualquier combinación de estos o materiales similares. La punta se puede unir directamente con el conducto óptico (fibra) usando adhesivos o un ajuste mecánico. Se puede usar también la punta para alojar el conducto óptico que contiene el elemento de detección, de tal manera que éste encaja el conducto óptico y el elemento de detección. El elemento de detección puede estar contenido dentro de la punta.

55 El dispositivo puede comprender además un conector que se puede usar para conectar los componentes del

dispositivo entre sí. El conector puede ser, por ejemplo, cualquier dispositivo mecánico, tal como conectores de fibra óptica normalizados, cierres luer, manguitos de metal o vidrio o carcasas con resorte en carga. Por ejemplo, el conector puede usarse para conectar el conducto óptico al sistema óptico. El objetivo principal del conector es proporcionar un componente que permite a al resto de componentes poderse desconectar fácilmente de tal manera que el componente se convierte en sustituible.

### **Breve descripción de los dibujos**

La invención se comprenderá más fácilmente con referencia a las figuras de dibujos adjuntos, en las que:

La Fig. 1 es un esquema generalizado de un biosensor;

La Fig. 2 ilustra dos posibles configuraciones ópticas en la porción óptica del sensor;

La Fig. 3 ilustra algunas puntas de biosensores;

La Fig. 4 ilustra una forma de realización que no pertenece a la invención que es un biosensor óptico que se puede llevar *in vivo*;

La Fig. 5 es un diagrama que muestra el rendimiento de un biosensor de fibra óptica que rastrea los niveles cambiantes de glucosa en un cerdo anestesiado;

La Fig. 6 es un diagrama que muestra el rendimiento de un biosensor de fibra óptica que usa un sensor de fibra óptica con un único núcleo de 400 micrómetros y la configuración óptica ilustrada en la Fig. 2A;

La Fig. 7 muestra el rendimiento de un biosensor de fibra óptica que usa un sensor de fibra óptica con un único núcleo de 400 micrómetros y la configuración óptica ilustrada en la Fig. 2A;

La Fig. 8 ilustra un ejemplo que incluye un detector múltiple y una referencia interna;

La Fig. 9 es un diagrama que muestra el rendimiento de un ejemplo de un biosensor construido de acuerdo con el Ejemplo 5.

La Fig. 10 es una vista en despiece de un ejemplo de un biosensor construido de acuerdo con el Ejemplo 6; y

La Fig. 11 es un diagrama que muestra el rendimiento de un ejemplo de un biosensor construido de acuerdo con el Ejemplo 7.

En todas las figuras de los dibujos, deberá entenderse que numerales semejantes se refieren a características y estructuras semejantes.

### **Descripción detallada de las formas de realización preferidas**

Se describirán ahora las formas de realización preferidas de la invención con referencia a las figuras de los dibujos adjuntos. No se pretende que la siguiente descripción detallada de la invención sea ilustrativa de todas las formas de realización.

La presente invención implica una proteína de unión diseñada para unirse a un analito de interés dentro de un intervalo clínico o analítico deseado. Adicionalmente, uno o más grupos indicadores luminiscentes están asociados con la proteína de unión. Estos grupos indicadores luminiscentes incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, moléculas de colorantes aromáticos orgánicos, acopladas covalentemente a restos de cisteína de la proteína o, por ejemplo, biomoléculas luminiscentes tales como proteínas fusionadas a la proteína de unión diseñada. La cisteína u otros grupos aminoácidos en la proteína de unión pueden estar diseñados para proporcionar sitios de unión para la molécula indicadora luminiscente. La unión del analito con la proteína de unión da como resultado un cambio en las propiedades luminiscentes de uno o más grupos indicadores. La propiedad luminiscente afectada puede ser la longitud de onda de absorción o emisión, la intensidad de absorción o emisión, el tiempo de vida de la emisión, la polarización de la emisión, y/o la eficacia de la transferencia de energía. La unión del analito es también reversible, dando la separación de nuevo como resultado un cambio en las propiedades luminiscentes de la molécula indicadora.

La una o más proteínas de unión junto con sus grupos indicadores asociados comprenden el elemento de detección. Opcionalmente, el elemento de detección puede contener también uno o más grupos de referencia. A diferencia del grupo indicador, el grupo de referencia tiene una señal de luminiscencia que no cambia sustancialmente tras la unión del analito diana con la proteína de unión. La señal de luminiscencia procedente del grupo de referencia proporciona un patrón óptico interno que se puede usar para corregir los artefactos ópticos debidos por ejemplo a la deriva electrónica del sistema óptico o al movimiento de la muestra o del conducto óptico. Se puede usar también el grupo de referencia para la calibración. Se puede unir el grupo de referencia a cualquier número de componentes del dispositivo que

incluyan el elemento de detección, una proteína de unión que no contiene el grupo indicador, la matriz polimérica, la cadena polimérica, una biomolécula que no es una proteína de unión, el conducto óptico, o la punta. En una forma de realización, el grupo de referencia se une a la proteína de unión que se ha diseñado para que no muestre respuesta significativa al analito a concentraciones fisiológicamente relevantes.

5 El elemento de detección, que comprende una o más proteínas de unión, uno o más grupos indicadores, y grupos de referencia opcionales, se puede inmovilizar en el extremo del conducto óptico o en el interior de una punta desechable que tiene una interfase con el conducto óptico. La inmovilización del elemento de detección en el conducto óptico o en el interior de la punta desechable se puede llevar a cabo depositando una delgada capa del elemento de detección, por ejemplo, mediante revestimiento por arrastre o por rotación, enlace covalente, tratamiento con plasma, y similares,  
10 directamente en el conducto óptico o en la punta. Alternativamente, se puede inmovilizar en primer lugar el elemento de detección en una matriz polimérica y a continuación se puede unir la matriz al conducto óptico, o a la punta, mediante interacciones covalentes.

15 El sistema óptico es capaz de examinar la respuesta luminiscente de los grupos indicadores y de referencia haciendo pasar luz desde una fuente de excitación electromagnética hacia el conducto óptico en el extremo distal que contiene el elemento de detección. El sistema óptico controla e interpreta también las señales de retorno generadas por la respuesta de luminiscencia del grupo indicador y del grupo de referencia. Las propiedades luminiscentes del grupo indicador, tanto la longitud de onda, la intensidad, el tiempo de vida, la eficacia de transferencia de energía, o la polarización, cambian en la respuesta a la unión o no unión del analito procedente de la proteína de unión.

20 Ahora, con referencia a la Fig. 1, se describirá un ejemplo específico. El sistema óptico 2 incluye una combinación de elementos que incluyen pero no se limitan a emisores de energía electromagnética, detectores de energía electromagnética, diversos espejos, filtros, electrónica, óptica holográfica, elementos dicróicos, y los patrones ópticos necesarios para enviar radiación de examen desde el emisor de energía electromagnética hacia el conducto óptico de elemento de detección y a continuación resolver e interpretar la señal luminiscente de retorno. La señal luminiscente de retorno procedente del grupo indicador cambia en respuesta a las concentraciones cambiantes del analito que se va a  
25 detectar. El sistema óptico 2 puede comprender también un ordenador o un microprocesador 3 que efectúa el procesamiento de la señal, la manipulación matemática de una o más señales, y el almacenamiento y la manipulación de datos. El ordenador o microprocesador 3 puede estar en contacto físico con los diferentes componentes del sistema óptico, o, preferiblemente, puede estar físicamente separado por hasta algunos metros de los diferentes componentes del sistema óptico. La información procedente de los detectores de energía electromagnética y de los elemento de procesamiento electrónico en el sistema óptico se comunica a continuación inalámbricamente al ordenador o microprocesador 3. El ordenador o microprocesador 3 puede almacenar también información sobre la calibración, específica del elemento de detección. La luz de una o más longitudes de onda producida en el sistema óptico 2 se canaliza hacia un conducto óptico 4 hasta el elemento de detección 6. El conducto óptico 4 puede ser tanto una fibra óptica como una corta guía luminosa que transmite luz con una mínima pérdida. El elemento de detección 6 está  
30 constituido por una o más proteínas de unión con uno o más grupos indicadores luminiscentes asociados ya sea inmovilizados en una matriz polimérica, unidos a una cadena polimérica, incorporados en una punta desechable, unidos directamente en el extremo distal del conducto óptico, o bien unidos a un conector. El elemento de detección 6 puede también estar constituido por grupos de referencia luminiscentes adicionales que están unidos opcionalmente a biomoléculas, polímeros, o moléculas orgánicas con el objetivo de proporcionar una señal de referencia o calibración. El elemento de detección 6 se une al extremo distal del conducto óptico 4 mediante una matriz polimérica.

35 La Fig. 2 es una ampliación del sistema óptico 2 en dos formas de realización típicas. En la Figura 2A, se usa un espejo dicróico o divisor de haz 11 para dirigir la luz desde una fuente de energía electromagnética 7 al conducto óptico 4. Las fuentes de excitación pueden estar constituidas por, pero no se limitan a, por ejemplo, lámparas de arco, diodos láser, o LBD. En esta forma de realización, el conducto óptico 4 es un cable de fibra óptica, y se usa la misma fibra para  
45 transmitir la luz de excitación desde la fuente de energía electromagnética 7 al elemento de detección 6 y también para transmitir las señales de luminiscencia desde los grupos indicador o de referencia hacia el sistema óptico 2. Un elemento dicróico 11 separa preferiblemente la señal de retorno de la luz de excitación y dirige la señal a los detectores de energía electromagnética 8. Los detectores pueden estar constituidos por, pero no se limitan a, por ejemplo, fotodiodos, chips CCD, o tubos fotomultiplicadores. En el episodio en el que se hacen retornar múltiples señales luminiscentes, se pueden usar elementos dicróicos adicionales para dirigir porciones de las señales de retorno a  
50 múltiples detectores. Preferiblemente, un grupo de referencia luminiscente que es insensible al analito se incluye junto con la molécula indicadora dependiente del analito para proporcionar una señal de referencia. Se puede usar esta señal de referencia, por ejemplo, para corregir la deriva óptica o electrónica.

55 La Fig. 2B ilustra una segunda forma de realización en la que se usa un haz óptico bifurcado o una disposición de fibra óptica fusionada para transmitir luz a y desde el elemento de detección. Aquí, la luz de la fuente de excitación 7 se transmite por un brazo del haz de fibra bifurcado. Las señales luminiscentes de retorno procedentes del elemento de detección se detectan usando el segundo brazo de la fibra bifurcada, de tal manera que en este caso, el haz de fibra sirve para separar la luminiscencia de excitación de la procedente del retorno. Se pueden usar adicionalmente la óptica

dicroica, divisores de haces, o polarizadores para dividir adicionalmente la luminiscencia de retorno, basándose por ejemplo en la longitud de onda o la polarización. Opcionalmente, se pueden usar filtros de paso de banda 12 para seleccionar la longitud de onda luminiscente que se va a detectar. El suministro de energía eléctrica 9 suministra energía eléctrica para el sistema óptica 2.

5 La Fig 3 ilustra algunos procedimientos o medios representativos de unión del elemento de detección 6 al extremo de un conducto óptico 4, cuando, por ejemplo, el conducto óptico comprende una fibra óptica. Un experto en la materia reconocerá que en todos los procedimientos de unión representativos que se muestran en la Fig 3 se debe prestar atención a consideraciones de diseño tales como obtener un contacto suficiente o íntimo entre el elemento de detección 6 y la fibra óptica 4, evitando la deslaminación del elemento de detección 6 de la fibra óptica en funcionamiento para asegurar que se transmite eficazmente la luz a y desde el elemento de detección 6. Además, es importante mantener la integridad del elemento de detección durante el funcionamiento para asegurar que se puede obtener una respuesta de la señal fiable. Por ejemplo, cuando se usa el elemento de detección 6 *in vivo*, se puede someter el elemento de detección 6 a diversos entornos lo que puede producir contracción, hinchazón, deterioro o afectar negativamente otras características funcionales deseables que incluyen la intensidad de la señal, la luminiscencia el tiempo de respuesta, etc. De esta manera, los procedimientos o medios de unión óptimos pueden variar dependiendo de las características, configuración, y dimensiones del elemento de detección particular o de la aplicación particular. Aunque la Fig. 3 representa gráficamente de manera general el extremo distal 10 de la fibra óptica 4 como una superficie plana en ángulo recto respecto del eje de la fibra óptica 4, el extremo distal 10 puede ser una superficie compleja/compuesta/curva y/o puede estar ahusada o en ángulo con respecto al eje. Los procedimientos de unión mostrados en la Fig. 3 se pueden usar tanto individualmente como en combinación.

El elemento de detección 6 se puede unir directamente al extremo distal 10 de la fibra óptica 4 usando interacciones covalentes. En referencia a la Fig. 3A, el elemento de detección, que comprende las proteínas de unión, los grupos indicadores asociados, y los grupos de referencia opcionales, se pueden unir a un polímero 13, tal como por ejemplo una monocapa o un polímero de cadena larga, y el polímero 13 se puede unir directamente al extremo distal 10 de la fibra óptica 4 usando por ejemplo, un revestimiento por arrastre o por rotación, revestimiento por plasma, deposición a vacío, interacciones covalentes, iónicas, o de van der Waals, tecnología de chorro de tinta, o sus combinaciones.

En referencia a la Fig 3B, el elemento de detección 6 puede estar inmovilizado en una matriz polimérica 14 y la matriz polimérica 14 estar unida al extremo distal 10 de la fibra óptica 4 usando interacciones covalentes. Se pueden usar grupos reactivos de la matriz polimérica 14 y de la proteína para unir covalentemente el elemento de detección 6 directamente a la fibra óptica 4, tal como por ejemplo, introduciendo grupos amina en la punta o superficie distal de un vidrio o fibra de sílice. La matriz 14 se configura y dimensiona preferiblemente para optimizar la transmisión de la señal o la magnitud de la señal frente al tiempo de respuesta. A este respecto, la altura o la distancia 15 a la que la matriz 14 se extiende desde la superficie distal 10 de la fibra óptica 4 está entre aproximadamente 5 micrómetros o menos a aproximadamente 1 mm. Por ejemplo, en una operación a modo de ejemplo, el tiempo de respuesta fue de aproximadamente 3 segundos cuando la altura de la matriz 15 fue aproximadamente de 50 micrómetros. Generalmente, a medida que disminuye la altura de la matriz 15, se consigue un tiempo de respuesta más corto, sin embargo, el tiempo de respuesta de la señal puede variar dependiendo de otras condiciones, tales como, por ejemplo, las dimensiones exactas, el estado de hidratación, o la aplicación particular. La superficie más distal 16 de la matriz 14 puede incluir una capa de material reflector o dispersor de luz con la superficie reflectante de luz enfrentada a la fibra óptica 4 para mejorar la luminiscencia y/o amplificar la señal de retorno. En una variación, la capa de material reflectante puede comprender un revestimiento de plasma u obtenido por sublimación catódica o una delgada película superficial de dispersión de la luz unida a la matriz 14. La materia particulada que refleja la luz se puede dispersar a través de la matriz para aumentar el efecto dispersor de la luz.

En referencia a la Fig. 3C, se puede colocar un manguito de plástico o de polímero 17 sobre el extremo distal de la fibra óptica 4 para alojar y/o proteger el elemento de detección (no se muestra). El elemento de detección puede estar atrapado en o unido a una matriz polimérica tal como se muestra en la Fig. 3B. La matriz polimérica, que puede contener o no el elemento de detección, se puede introducir en el manguito ya sea mediante inyección, vertido, o arrastre y a continuación se puede reticular o polimerizar en el interior del manguito 17. Si la matriz polimérica se introduce en el manguito sin el elemento de detección, se puede introducir o difundir posteriormente el elemento de detección al interior de la matriz polimérica para atrapar, unir o enlazar covalentemente el elemento de detección a la matriz. Alternativamente, se puede polimerizar el elemento de detección 6 en el interior del manguito 17 antes de la inserción de la fibra óptica 4. Durante el funcionamiento, el manguito 17 que incluye el elemento de detección 6 y la fibra óptica 4 se puede implantar *in vivo* para un uso continuo o episódico. Cuando el elemento de detección 6 se sitúa dentro del manguito 17, se puede acoplar de manera eliminable el manguito 17 a la fibra óptica 4 y se puede insertar de manera eliminable la fibra óptica 4 dentro y fuera del manguito 17 de tal manera que todo o parte del manguito 17 puede permanecer *in vivo* y se puede insertar la fibra óptica 4 y retirarse a voluntad para el uso episódico. Se pueden usar diferentes alojamientos en lugar del manguito 17.

En referencia a la Fig. 3D, la fibra óptica se mantiene en el interior de una aguja 18. Tal como se usa en el presente

documento, el término “aguja” incluye pero no se limita a microaguja La aguja 18 puede tener un extremo distal modificado 19 tal como un bisel 20 para controlar la profundidad de perforación y/o uno o más puertos laterales para permitir el acceso del analito al elemento de detección contenido en la aguja 18. El elemento de detección 6 puede situarse en el interior de la aguja 18 de tal manera que puede unirse directamente a la fibra óptica usando cualquiera de los procedimientos descritos en la discusión de las Figs. 3A, 3B, o 3C o, alternativamente, puede tener solo contacto mecánico con la fibra óptica 4. El extremo distal de la aguja 18 puede estar rebordeado para fijar mecánicamente el elemento de detección 6 a la aguja 18. El diámetro externo 23 de la fibra óptica 4 es de entre aproximadamente 50 – 400 micrómetros, preferiblemente entre aproximadamente 50 – 200 micrómetros y el diámetro interno 27 de la aguja 18 está dimensionado ligeramente más grande que el diámetro externo 23 para acomodar la inserción de la fibra óptica 4 en la aguja 18. En una variación, la aguja 18 puede estar mecánicamente fija a la fibra óptica 4 mediante, por ejemplo, ajuste por fricción o aguja rebordeada 18 sobre la fibra óptica 4 La fibra óptica 4 puede estar químicamente fija en el interior de la aguja 18 mediante un adhesivo o cualquier otro medio adecuado conocido por los expertos en la materia. A este respecto, se puede fabricar un ensamblaje de punta de biosensor y un elemento de detección que sean desechables para un uso episódico o pueden permanecer *in vivo* para un uso continuo. Se puede insertar de manera eliminable la fibra óptica 4 dentro y fuera de la aguja 18 de tal manera que la aguja 18 puede permanecer in vivo y la fibra óptica 4 se puede insertar y retirar según se desee para un uso episódico. El extremo proximal 28 de la aguja 18 incluye un miembro de acoplamiento óptico configurado y dimensionado para recibir un componente óptico conectable al anterior, por ejemplo, para conectar o hacer interfase con un sistema óptico tal como el que se muestra en las FIGS. 2A o 2B. La aguja 18 puede ser una aguja recta, aunque en formas de realización alternativas, la aguja 18 puede tener una o más porciones dobladas o flexadas en cualquier punto a lo largo de su longitud. Además, en otra forma alternativa que se muestra e la Fig. 3E, el extremo distal de la aguja 18 puede incluir una porción de punta flexada 29 en el extremo distal 19 que se extiende distalmente más allá y adyacente a la matriz 14 y puede incluir una superficie o capa reflectora o dispersora de la luz 30 con la superficie reflectora de la luz enfrentada a la fibra 4 para mejorar la luminiscencia y/o amplificar la señal de retorno. En referencia a la Fig. 3F, se muestra otra versión de un conjunto de aguja en el que el extremo distal 19 de la aguja 18 incluye uno o más puertos u orificios 31 a través de los cuales puede fluir o migrar el analito para permitir el acceso del analito al elemento de detección 6 contenido en la aguja 18.

La Fig. 4 muestra una forma de realización a modo de ejemplo de un biosensor óptico que se puede llevar puesto no de acuerdo con la invención. En esta forma de realización, el cuerpo de la punta 21 comprende una aguja de acero aproximadamente de 1 – 10 mm de longitud que contiene en su interior el elemento de detección 6 inmovilizado o fijo sobre una fibra óptica 22 La fibra 4, el elemento de detección 6, y la aguja 21 se sitúan en una cantidad 24. El cuerpo de la punta o la aguja 21, que contiene la fibra óptica 4 y el elemento de detección 6, se inserta perpendicularmente en la piel de un paciente de tal manera que el elemento de detección 6 reside tanto en el espacio intradérmico como en el subcutáneo. En una forma de realización a modo de ejemplo, la aguja 21 está montada de manera fija en una montura 24 de tal manera que se puede obtener una profundidad de inserción controlada. A este respecto, la aguja 21 se extiende preferiblemente en la piel de un paciente a una distancia entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm, lo más preferible entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 2 mm. Un anillo adhesivo 25 mantiene entonces la montura más el conjunto de la aguja en su lugar. El sistema óptico 2 se afianza entonces sobre la montura más el conjunto de la aguja, teniendo el conector 25 una interfase de la fibra óptica 22 con el sistema óptico 2. Se puede separar también el lector óptico de la plataforma mediante, por ejemplo, aproximadamente 0,02 – 1 metro y conectarse al resto del sistema con una fibra óptica. Se puede diseñar el sistema óptico, por ejemplo, de acuerdo tanto con la forma de realización óptica que se muestra en la Figura 2A como en la 2B. Las fuentes de excitación pueden estar constituidas por, pero no se limitan a, por ejemplo, lámparas de arco, diodos láser, o LBD. Los detectores pueden estar constituidos, pero no se limitan a, por ejemplo, fotodiodos, chips CCD, o tubos fotomultiplicadores. Desviaciones de la Fig. 4, una pluralidad de cuerpos de punta o conjuntos de agujas 21 se unen en un único montaje 24. A este respecto, los cuerpos de punta o los conjuntos de aguja se pueden configurar para probar múltiples analitos en los que cada conjunto de aguja se configura para probar un único analito. En otra forma de realización, los cuerpos de punta o los conjuntos de agujas pueden estar conectados al montaje 24 de tal manera que se puede administrar un fármaco a través de al menos un cuerpo de punta o conjunto de aguja. De esta manera, se puede diseñar un sistema de administración de fármacos de tal manera que se pueda calcular una dosificación apropiada del fármaco basándose en la prueba de un analito y administrarse mediante un cuerpo de punta o un conjunto de aguja conectado al mismo montaje de biosensor 24. En esta forma de realización, el cuerpo de punta o el conjunto de aguja usado para la administración del fármaco puede comprender uno o más puertos para administrar el fármaco a su través. En otra realización más, una sonda de temperatura puede estar contenida dentro, ser adyacente a, o unirse a al menos un cuerpo de punta o conjunto de aguja. Esta sonda de temperatura podría ser, por ejemplo, un termopar o un monitor de temperatura óptica que usa, por ejemplo, un fluoróforo sensible a la temperatura. En otra variación, se puede incorporar la punta de un biosensor en un dispositivo de tipo parche que se puede llevar puesto, en el que el extremo proximal del cuerpo de la punta se une a un parche y el parche se configura y dimensiona para llevar puesto sobre la piel exterior del paciente. En otra forma de realización, se puede incorporar la punta del biosensor en un reloj, en el que el extremo proximal del cuerpo de la punta está unido a un reloj y el reloj se configura y dimensiona para llevar puesto en la zona de la muñeca del paciente.

En todos los ejemplos anteriormente mencionados, la fibra ensamblada y el elemento de detección o el dispositivo de

punta fabricado es estéril. A este respecto, "estéril" significa esencialmente exento de microorganismos o bacterias. En un procedimiento de fabricación, los componentes ensamblados pueden esterilizarse periódicamente tras cada etapa de fabricación. Por ejemplo, en el ejemplo que se muestra en la Fig. 3C, el manguito se puede esterilizar tras cada etapa de fabricación finalizando en última instancia con un dispositivo envasado asépticamente. Alternativamente, la fibra ensamblada y el elemento de detección o el dispositivo de punta fabricado se pueden esterilizar en una etapa terminal.

Los siguientes ejemplos ilustran determinados ejemplos preferidos y se pretende meramente que sean ilustrativos. En el presente documento se utilizan proteínas de unión mutadas marcadas con sondas informadoras fluoróforas de acuerdo con el procedimiento definido en Cass y col., Anal. Chenz. 1994, 66, 3840-3847, o como otros han descrito.

### **Ejemplo 1**

De acuerdo con un ejemplo, se usó la proteína de unión de glucosa galactosa (GGBP) con una triple mutación que incluía una cisteína sustituida por un ácido glutámico en la posición 149, una arginina sustituida por una alanina en la posición 213 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S). Se marcó la proteína en la posición 149 con N,N'-dimetil-N-(yodoacetil)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)etilendiamina (amida IANBD)oxi. Esta GGBP (E149C/A213R/L238S) mutada es específica de la glucosa, y el grupo indicador experimenta un cambio de intensidad de fluorescencia en respuesta a la unión a la glucosa.

Se preparó una matriz multirrevestida o multicapa de la siguiente forma. Se formó una matriz núcleo mezclando 1 parte de proteína de unión marcada de forma luminiscente o con colorante (15 uM en tampón PBS, pH 7,4, preparada tal como se describe en el documento PCT/US03/00203) con de 2 a 4 partes de alginato al 3% en peso (v/v) en un vial de centelleo y se sometió a vortización a baja velocidad. Se colocaron 3 ml de la mezcla proteína-alginato resultante en una jeringuilla y se infundió a una velocidad de 10 ml/h en 200 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M en un mezclador formando por tanto perlas de aproximadamente 0,4 a 1,5 mm de diámetro. Se mezclaron las perlas en una disolución de CaCl<sub>2</sub> en el mezclador durante 15-60 minutos. A continuación se formó una capa de contención colocando las perlas anteriores en una disolución de poli-L-lisina al 0,01% p/v en agua, aproximadamente 10 ml, durante 1 hora, secando a continuación las perlas recubiertas de poli-lisina en una torre de absorción durante 15 a 30 minutos. En este momento, el sensor estuvo listo para ser usado.

La fibra usada en este ejemplo fue una fibra óptica bifurcada. Ésta contenía seis fibras de 400 µm dispuestas alrededor de una fibra central de 400 µm. Se usaron las seis fibras como el conducto de excitación y la fibra central como el conducto de detección. El diámetro total de la fibra era de 1,4 mm. Una vez que la fibra se pulió, se usó pegamento Loctite 401 de calidad médica 1 para adherir el elemento de detección al extremo distal de la fibra óptica. Se bifurcó el extremo proximal de la fibra, yendo un brazo a una fuente de excitación y yendo el otro brazo a un detector. Se usó un LED de 470 nm como la fuente de excitación, y se usó un espectrómetro de fluorescencia comercial como el detector de energía electromagnética. A continuación se midió la intensidad de la emisión a 540 nm.

En un ensayo, el extremo distal y el elemento de detección de un biosensor formado de esta manera se insertaron a través de una aguja de calibre 13 en el costado de un cerdo anestesiado, aproximadamente 1-2 mm por debajo de la piel. Se infundieron disoluciones alternadas de de Ringer lactado con y sin dextrosa al 10% a través de la vena de la oreja del cerdo para aumentar y disminuir los niveles de glucosa en el cerdo de una manera controlable. A intervalos, se vertieron muestras de sangre de la vena cava del cerdo a través de un catéter de cuello y se probaron las lecturas de azúcar en sangre en un medidor de glucosa en sangre manipulado manualmente. Se observó la intensidad de la fluorescencia del biosensor para rastrear niveles de glucosa cambiantes en el cerdo anestesiado, tal como se muestra en la Fig. 5.

### **Ejemplo 2**

En otro ejemplo, la proteína de unión fue proteína de unión de glucosa galactosa (GGBP), con una cisteína sustituida por un ácido glutámico en la posición 149, una arginina sustituida por una alanina en la posición 213 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S). La proteína se marcó en la posición 149 con N,N'-dimetil-N-(yodoacetil)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)etilendiamina (amida IANBD). Se preparó el biosensor insertando la punta de una fibra núcleo con un diámetro de 400 micrómetros en una pieza corta de tubería de catéter, y dejando a la tubería de catéter sobresalir por encima de la punta de la fibra en 0,1 – 1 mm. La fibra comprendía un núcleo de sílice, un revestimiento de sílice, y un tampón de poliimida. El diámetro de la fibra era de 400/440/470 micrómetros, donde las secciones denotan los diámetros medidos desde las zonas exteriores del tampón de revestimiento del núcleo.

La matriz de inmovilización era un hidrogel basado en alginato reticulado, preparado reticulando covalentemente alginato Pronova™ UP LVG usando la química de la carbodiimida a través de los carboxilos con dihidrazida del ácido adipico (AAD). Se seleccionó Pronova™ UP LVG en este ejemplo por su baja viscosidad y su elevada relación de gularónico a manurónico. Se preparó una disolución de alginato al 2% disolviendo 1 gramo de alginato en 50 ml de

tampón MES 0,1 M (pH 6,5) y añadiendo a continuación 110 mg de AAD y 79 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt). Se almacenó la disolución a 4°C hasta que se usó. A la disolución de alginato, se añadieron 145 mg de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC) por 10 ml de disolución, usando una técnica de mezcla mediante jeringuilla doble. El alginato, la AAD, el HOBt, la mezcla de EDC se aspiraron en una jeringuilla de 1 ml, y se montó en la jeringuilla una aguja de calibre 30 enroscada. Se cebó la aguja, y a continuación se insertó la punta en la moldura de la tubería del catéter en la fibra óptica. Se rellenó la tubería del catéter en la fibra, asegurando un buen contacto entre la punta de la fibra óptica y la matriz de alginato. Se dejó reticular la matriz durante 15 minutos, y a continuación la punta de la fibra y el conjunto matriz se transfirieron a una disolución MES 0,1 M a pH 6,5, cuando se almacenaron durante 2 horas. Al final de las dos horas, se colocaron las puntas de detección en disolución tampón de fosfato en exceso (PBS, cloruro de potasio 0,0027 M, cloruro de sodio 0,137, pH 7,4, cuando se almacenaron un mínimo de 30 minutos para detener rápidamente la reacción.

Para unirse a la proteína de unión, las puntas se incubaron en una disolución de GGBP marcada en tampón PBS [NBDE149C/A213R/L238S GGBP] (53 uM, 50 ul) durante aproximadamente 8 horas. Se protegieron los sensores de la luz ambiente durante la incubación. Después de 8-24 horas de incubación, se añadieron a continuación 50 µl de EDC/NHS (200 mM/50/0 mM) al tubo de incubación. Después de 40 minutos, se retiraron las puntas de los sensores y se colocaron en 50 ul de etanolamina 1M, pH 8,5, para detener rápidamente la reacción. Después de 20 minutos en la disolución de etanolamina, en que se dejaron asentar durante al menos 24 horas mientras que la proteína sin reaccionar desapareció por difusión. A continuación se transfirieron los sensores a PBS reciente y se almacenaron en oscuridad hasta que estuvieron listos para el uso.

La fibra en este ejemplo fue una única fibra multimodo con un núcleo de 400 µm (núcleo de sílice, revestimiento de sílice, tampón poliimida). Debido a que en este ejemplo la misma fibra transmite la señal de excitación y la de luminiscencia, se usó una óptica dicróica para separar la luminiscencia de la excitación, tal como se muestra en la Fig. 2A. La excitación se llevó a cabo con un LED de 470 nm. Se usó un filtro dicróico comercial para reflejar la excitación a 470 nm hacia el extremo de entrada de la fibra y transmitir la fluorescencia, centrada a 550 nm, al detector. Se usaron lentes esféricas de vidrio para la colimación del haz y para la luz de foco en las fibras y en los detectores. La excitación dispersa se eliminó adicionalmente del detector usando un filtro de paso de banda de 550 nm. Conectores SMA permitieron una rápida conexión y desconexión de los sensores de fibra óptica. El detector de energía electromagnética de este ejemplo fue un único tubo fotomultiplicador de recuento de fotones. Se llevó a cabo la adquisición de los datos en un ordenador de sobremesa que se comunicaba con el detector mediante una conexión RS-232.

FIG. 6: En una prueba, se insertaron el extremo distal y el elemento de detección de un biosensor formado de esta manera en disoluciones de suero de porcino que contenían diferentes concentraciones de glucosa. Todas las disoluciones de suero de porcino se filtraron a través de un filtro de 200 micrómetros, y se midieron los niveles de glucosa en las disoluciones en un analizador clínico. La Fig. 6 ilustra el comportamiento *in vitro* del sensor. Se determinó que el nivel inicial de glucosa en el suero era de 56 mg/dl. Se prepararon muestras de suero a 150 y 300 mg/dl añadiendo glucosa concentrada 1 M en PBS en alícuotas de suero.

### **Ejemplo 3**

En otro ejemplo, se formó un biosensor mediante enlace covalente de una delgada película sobre la superficie de una fibra óptica. La proteína de unión fue proteína de unión a glucosa galactosa (GGBP), con una cisteína sustituida por un ácido glutámico en la posición 149, una arginina sustituida por una alanina en la posición 213 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S). Se marcó la proteína en la posición 149 con N,N'-dimetil-N-(yodoacetil)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-3-il)etilendiamina (amida IANBD).

Se preparó el biosensor mediante enlace covalente de una matriz de alginato a la superficie de una fibra de sílice funcionalizada con amina. La fibra comprendía un núcleo de sílice, un revestimiento de sílice, y un tampón poliimida. El diámetro de la fibra era de 400/440/470 micrómetros, en el que las líneas inclinadas denotan los diámetros medidos de las zonas exteriores del núcleo/revestimiento/tampón.

Se retiró el tampón poliimida de la punta de la fibra óptica exponiendo los últimos milímetros finales de la fibra a una antorcha durante aproximadamente 1 – 2 segundos. A continuación se eliminó con un trapo la poliimida residual. A continuación se colocó la punta a la que se había eliminado el tampón en ácido sulfúrico 1 M durante 1 hora. A continuación se enjuagaron las puntas con agua destilada, se colocaron en etanol durante 15 minutos, y a continuación se sumergieron en tolueno anhidro durante 15 minutos. Las puntas limpias se colocaron a continuación en tolueno anhidro caliente (60°C) que contenía 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) al 1% y se dejaron reaccionar durante 5 minutos. A continuación se retiraron las puntas de la disolución de APTES y se lavaron con etanol durante 15 minutos. Al final de este procedimiento, se verificó la presencia de grupos amina en la superficie de la fibra mediante espectroscopía de fotoelectrones.

A continuación se aplicó una matriz de alginato a la superficie de la fibra funcionalizada con amina de la siguiente forma. La matriz de inmovilización era un hidrogel basado en alginato reticulado, preparado usando alginato Pronova™

UP LVG con reticulación covalente, seleccionado por su baja viscosidad y su elevada relación gulurónico a manurónico, mediante química de la carbodiimida a través de los carboxilos con dihidrazida de ácido adípico (AAD). Se preparó una disolución de alginato al 2% disolviendo 1 gramo de alginato en 50 ml de tampón MES 0,1 M (pH 6,5) y añadiendo a continuación 110 mg de AAD y 79 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt). A continuación se mezcló una alícuota de 0,5 ml de esta disolución con 10 mg de EDC en 50  $\mu$ l de tampón MES usando una técnica de mezcla mediante jeringuilla doble. El volumen total de la disolución fue aproximadamente de 0,55 ml. A continuación se transfirieron el alginato, la AAD, el HOBt, la mezcla de EDC a viales de microcentrífuga, y se sumergieron las puntas de fibra funcionalizadas con APTES en la disolución de alginato durante 3-4 minutos o hasta que la matriz comenzó a solidificar. A continuación se retiraron las puntas de la disolución de alginato, se dejó continuar la reacción en aire durante aproximadamente 1-10 minutos, y a continuación se transfirió a tampón MES 0,1 M, pH 6,5. Se dejaron asentar las puntas en el tampón MES durante 2 horas, y a continuación se detuvieron rápidamente en disolución de tampón fosfato en exceso (PBE, cloruro de potasio 0,0027 M, cloruro de sodio 0,137 M, pH 7,7) durante un mínimo de 30 minutos.

Para unirse a la proteína de unión, se incubaron las puntas en una disolución de GGBP marcada en tampón PBS [NBD-E149C/A213R/L238S GGBP] (20 - 60  $\mu$ M, 50  $\mu$ l) durante algunas horas. Se protegieron los sensores de la luz ambiente durante la incubación. Después de aproximadamente 2-8 horas de incubación, se añadieron 50  $\mu$ l de EDC/NHS (200 mM/50 mM) al tubo de incubación. Después de 5 - 40 minutos, se retiraron las puntas de los sensores y se colocaron en 50  $\mu$ l de etanolamina 1M, pH 8,5 para detener rápidamente la reacción. Después de 20 minutos en la disolución de etanolamina, se transfirieron las puntas de los sensores a una disolución de PBS, en la que se dejaron asentar durante al menos 8 horas mientras que la proteína sin reaccionar se eliminaba por difusión. A continuación se transfirieron los sensores a PBS reciente y se almacenaron en la oscuridad hasta que estuvieron listos para el uso.

En una prueba del ejemplo anteriormente descrito, el lector óptico fue el mismo que el descrito en el ejemplo anterior, con la excepción que la excitación a 470 nm se moduló con un obturador impulsado por un solenoide. Además de hacer interfase y controlar los obturadores y detectores, el software permitió la adquisición temporalizada de la lectura de fluorescencia, la presentación gráfica de los resultados, y el análisis de los datos y de los algoritmos de calibración.

A continuación se insertaron el extremo distal y el elemento de detección de un biosensor formado de esta manera en el costado de un cerdo anestesiado. Se llevó a cabo la inserción insertando la fibra tanto intradrenal como subcutáneamente a través de un orificio en la piel formado por una aguja de calibre 18 - 24. Se infundieron disoluciones de Ringer lactadas alternadas con y sin dextrosa al 10 % a través de la vena de la oreja del cerdo para aumentar y disminuir los niveles de glucosa en el cerdo de una manera controlable. Se vertieron muestras de sangre, a intervalos, desde la vena cava del cerdo a través de un catéter de cuello, y se probaron lecturas de azúcar en sangre en un medidor de glucosa manipulado manualmente. Se observó la intensidad de la fluorescencia del biosensor para rastrear niveles cambiantes de glucosa en sangre en el cerdo anestesiado, tal como se muestra en la Fig. 7.

#### **Ejemplo 4**

En otro ejemplo, se llevó a cabo la detección con doble longitud de onda con un grupo de referencia de óptica interna. La proteína de unión fue proteína de unión a glucosa galactosa (GGBP), con cisteína sustituida por un ácido glutámico en la posición 149, una arginina sustituida por una alanina en la posición 213 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S). Se marcó la proteína en la posición 149 con el grupo indicador N,N'-dimetil-N-(yodoacetil)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)etilendiamina (amida IANBD). El grupo de referencia fue maleimida Texas Red® C2 unida a GGBP con una cisteína sustituida por un ácido glutámico en la posición 149 (TR-E149C GGBP). En el intervalo fisiológico de las concentraciones de glucosa, la luminiscencia de TR-E149C GGBP no cambió sustancialmente, y de esta manera, TR-E149C GGBP sirve como una referencia interna para la señal de la proteína de unión dependiente de analito y del grupo indicador (NBD-E149C/A213R/L238S GGBP).

Se preparó el biosensor insertando la punta de una fibra con un núcleo de un diámetro de 400 micrómetros en una pieza corta de tubería de catéter, dejando a la tubería de catéter sobresalir por encima de la punta de fibra en 0,1 - 0,5 mm. La fibra comprendía un núcleo de sílice, un revestimiento de sílice, y un tampón poliimida. El diámetro de la fibra era de 400/440/470 micrómetros, en la que las líneas inclinadas denotan los diámetros medidos de las zonas exteriores del núcleo/revestimiento/tampón.

La matriz de inmovilización era un hidrogel basado en alginato reticulado, preparado mediante alginato Pronova™ UP LVG con reticulación covalente, seleccionado por su baja viscosidad y su elevada relación gulurónico a manurónico, mediante química de la carbodiimida a través de los carboxilos con dihidrazida de ácido adípico (AAD). Se preparó una disolución de alginato al 2% disolviendo 1 gramo de alginato en 50 ml de tampón MES 0,1 M (pH 6,5) y añadiendo a continuación 110 mg de AAD y 79 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt). Se almacenó la disolución a 4°C hasta que se usó. Usando una técnica de mezcla mediante jeringuilla doble, se mezcló a continuación una alícuota de 0,5 ml de la disolución de alginato con una disolución de 50  $\mu$ l de MES que contenía 10 mg de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC) y 90  $\mu$ l de TR-E149C GGBP 60  $\mu$ M. El alginato, la AAD, el HOBt, la EDC, la mezcla de TR-E149C, se aspiraron en una jeringuilla de 1 ml, y se montó en la jeringuilla una aguja de calibre 30 enromada. Se cebó la aguja,

y a continuación se insertó la punta en la moldura de la tubería del catéter en la fibra óptica. Se rellenó la tubería del catéter en la fibra, asegurando un buen contacto entre la punta de la fibra óptica y la matriz de alginato. Se dejó reticular la matriz durante 15 minutos, y a continuación se transfirieron la punta de la fibra y el conjunto de la matriz a una disolución de MES 0,1 M, pH 6,5, en la que se almacenaron durante 2 horas. Al término de las dos horas, se colocaron puntas de detección en disolución de tampón fosfato en exceso (PBS, cloruro de potasio 0,0027 M, cloruro de sodio 0,137 M, pH = 7,4) en el que se almacenaron un mínimo de 30 minutos para detener rápidamente la reacción.

Para unirse a la proteína de unión, se incubaron las puntas en una disolución que contenía GGBP marcada con IANBD en tampón PBS [NBD-E149C/A213R/238S GGBP]. La disolución de NBD-E149C/A213R/L238S GGBP y de TR-E149C GGBP tenía una concentración de 60  $\mu$ M en ambas especies. Durante el periodo de incubación, se protegieron los sensores de la luz ambiente. Después de aproximadamente 2 – 8 horas de incubación, se añadieron 50  $\mu$ l de EDC/NHS (200 mM/50 mM) al tubo de incubación. Después de 5-40 minutos, se retiraron las puntas de los sensores y se colocaron en 50  $\mu$ l de etanolamina 1 M, pH 8,5 para detener rápidamente la reacción. Después de 20 minutos en la disolución de etanolamina, se transfirieron las puntas de los sensores a una disolución de PBS, en la que se dejaron asentar durante al menos 8 horas a la vez que se eliminaba mediante difusión la proteína sin reaccionar. A continuación se transfirieron los sensores a PBS reciente y se almacenaron en la oscuridad hasta que estuvieron listos para el uso.

En una prueba del ejemplo anteriormente descrito, la señal de la fluorescencia se leyó usando un sistema óptico según la configuración mostrada en la Fig. 2A. Se usó para la excitación un LED de 470 nm (LS-450), y se usaron dos únicos tubos fotomultiplicadores con recuento de fotones como detectores de energía electromagnética. Se usó un divisor de haz dicróico comercial para reflejar la luz de 470 nm desde el emisor de energía electromagnética hacia la fibra y para transmitir las señales de luminiscencia de los grupos indicador y de referencia hacia los detectores. Se usó un segundo divisor de haz dicróico para separar las señales de luminiscencia de los grupos indicador y de referencia que dirigen la emisión desde NBD-E149C/A213R/L238S hacia un detector y la emisión desde TR-E149C GGBP hacia el otro detector. Se usaron un filtro de paso de banda de 550 nm en la parte frontal de un detector y un filtro de paso de banda de 610 nm en la parte frontal del otro detector para conseguir una resolución espectral adicional para NBD-E149C/A213R/L238S y TR-E149C GGBP, respectivamente.

En una prueba, se insertaron el extremo distal y el elemento de detección de un biosensor formado de esta manera en disoluciones de tampón PBS que contenían diferentes niveles de glucosa. Se midieron los niveles de glucosa en las disoluciones en un analizador clínico. La Fig. 8 muestra la respuesta del sensor a niveles de glucosa cambiante. La señal a 550 nm procedente del grupo indicador IANBD rastrea niveles cambiantes de glucosa. La emisión a 610 nm procedente del grupo indicador Texas Red® no cambia sustancialmente a medida que varían los niveles de glucosa. Sin embargo, en este ejemplo, una porción de la emisión del grupo indicador se produce también a 610 nm. El detector del sistema óptico que rastrea la señal de luminiscencia a 610 nm detecta la emisión del grupo de referencia y también la porción de la emisión del grupo indicador (IANBD) que se produce en la región de esta longitud de onda. Debido a que la contribución a la señal de 610 nm procedente del grupo indicador es una fracción constante de la señal a 550 nm, esta contribución se puede sustraer matemáticamente de la señal a 610 nm para generar la señal debida solo al grupo de referencia. Cuando se llevó a cabo esta manipulación matemática, la señal a 610 nm no cambió sustancialmente con la concentración de glucosa, tal como se muestra en la Fig. 8.

### **Ejemplo 5**

En otro ejemplo, se formó un biosensor mediante enlace covalente de una delgada película sobre la superficie de una fibra óptica. Se acopló un extremo de la fibra óptica a un dispositivo de detección de la fluorescencia, mientras que el otro extremo contenía una película de aproximadamente 50 micrómetros de una matriz de alginato unida covalentemente a la superficie de la fibra óptica.

El acoplamiento de la matriz de alginato a la fibra óptica se llevó a cabo revistiendo en primer lugar la fibra con APTMS mediante un procedimiento de tratamiento por plasma. Se colocó la fibra óptica en el plano medio de una cámara de vacío cilíndrica con un diámetro de 12 pulgadas (30,48 cm) por 18 pulgadas (45,72 cm) de altura. Se colocó un vial abierto de 1 pulgada (2,54 cm) de diámetro por 2 pulgadas (5,08 cm) de altura que contenía aproximadamente 5 centímetros cúbicos de APTMS sobre un electrodo en la cámara. Se evacuó inicialmente el sistema mediante una bomba turbomolecular, respaldado por una bomba de desbaste de álabe rotatorio, a una presión de aproximadamente 8 miliTorr (1,07 kPa). A continuación, la válvula en la línea de bombeo se volvió a regular para aumentar la presión de vaporización del monómero a unos 85 militorr (11,3 kPa) constantes. A continuación el electrodo se excitó mediante un generador de energía de radiofrecuencia de 13,56 MHz, en serie con una red emparejada para liberar 22 vatios de energía eléctrica. El plasma producido de esta manera funcionó durante 60 segundos para polimerizar el vapor del monómero en una película sobre la superficie de la fibra.

A continuación se acopló una matriz de hidrogel basada en alginato al revestimiento de APTMS. La matriz de hidrogel basada en alginato se preparó mediante química de la carbodiimida a través de los carboxilos usando dihidrazida de ácido adípico (AAD) con alginato Pronova™ UP LVG con reticulación covalente. Se seleccionó Pronova™ UP LVG.

Se seleccionó Pronova™ UP LVG por su baja viscosidad y su elevada relación gulurónico a manurónico. Se preparó una disolución de alginato al 2% disolviendo 1 gramo de alginato en 50 ml de tampón MES 0,1 M (pH 6,0) y añadiendo 110 mg de AAD y 79 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt). La disolución se puede almacenar a 4°C hasta que se necesite. A la disolución de alginato se añadieron 196 mg de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC) por 10 ml de disolución, usando una técnica de mezcla de jeringuilla doble. A continuación la mezcla de alginato/AAD/HOBt/EDC se dispensó en un vial, y las puntas tratadas con APTMS del sensor de fibra óptica se sumergieron en la mezcla de alginato para formar un revestimiento de aproximadamente 50 micrómetros de espesor. A continuación se dejó reticular la mezcla de alginato durante aproximadamente 2 h en una cámara de hidratación. A continuación se colocaron las puntas de detección en etanolamina en exceso pH 8,5 durante 15 minutos, para detener rápidamente la reacción y se almacenaron en MES 0,1 M en exceso pH 6,6.

Para unirse a la proteína de unión, se incubaron las puntas en una disolución de una proteína de unión a glucosa-galactosa marcada (GGBP) en tampón MES 0,1 M pH 6,5 (100 µM, 50 µl) durante aproximadamente 2 horas. La GGBP usada en este biosensor fue una GGBP mutante, en la que se sustituyó una cisteína por un ácido glutámico en la posición 149, se sustituyó una arginina por una alanina en la posición 213 y se sustituyó una serina por leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S). La proteína GGBP mutante se marcó en la posición 149 con N-((2-yodoacetoxi)etil)-N-metil amino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), como se hace referencia en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 20030134346A1, debe señalarse, sin embargo, que se pueden usar otras proteínas marcadas. Los sensores se protegieron de la luz ambiente durante la incubación. Después de 2 horas de incubación, se añadieron a continuación 50 µl de una disolución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida 20mM (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida 5 mM/50 mM (sulfo-NHS- Sigma/Fluka) al tubo de incubación. Después de 4 horas, se retiraron las puntas de los sensores y se colocaron en 50 µl de etanolamina 1 M pH 8,5 para detener rápidamente la reacción. Después de 20 minutos en la disolución de etanolamina, se transfirieron las puntas de los sensores a una disolución de PBS en exceso, en la que se dejaron asentar durante al menos 8 horas a la vez que se eliminaba por difusión cualquier proteína sin reaccionar. A continuación se transfirieron los sensores a PBS reciente y se almacenaron en la oscuridad hasta que estuvieron listos para el uso.

La Fig. 9 muestra la respuesta del biosensor de glucosa a los cambios en las concentraciones de glucosa en sangre de cerdo. El extremo de detección de la fibra se secó para el eliminar el exceso de agua fuera de la matriz que contiene la proteína, y a continuación el sensor de fibra óptica seco se sumergió en una muestra de 1 microlitro de sangre de cerdo que contenía 3,6 mg/dl de glucosa. La fluorescencia del sensor aumentó en respuesta a los niveles de glucosa en la muestra de sangre, alcanzando su respuesta de fluorescencia completa en aproximadamente 2,4 segundos.

### **Ejemplo 6**

En otro ejemplo, que se muestra en la Fig. 10, se usó un tubo de acero inoxidable 100 para unir una punta del biosensor 102 a un conducto óptico 104. La punta de biosensor 102 estaba constituida por una pieza pequeña de fibra óptica (de aproximadamente 3 cm), montada en el interior de una aguja de acero inoxidable 106. Un extremo (el "extremo de detección") de la fibra óptica se revistió con la química de detección de la glucosa, y el otro extremo se pulió para proporcionar una buena transmisión óptica. El extremo de detección de la fibra óptica estaba completamente contenido en el interior de la aguja y se extendía aproximadamente de 200 – 400 micrómetros pasado el extremo inferior del biselado de la aguja en el extremo distal de la punta del biosensor 102.

La fibra usada en este ejemplo comprendía un núcleo de sílice, un revestimiento de sílice, y un tampón poliimida. El diámetro de la fibra era de 400/440/470 +/- ~ 3 micrómetros, en el que las líneas inclinadas denotan los diámetros medidos de las zonas exteriores del núcleo/revestimiento/tampón. El extremo de detección de la fibra estaba funcionalizado con amina usando deposición por plasma de APTMS, tal como se describe en el Ejemplo 5 anterior. Se aplicaron también la matriz de alginato y la proteína de unión tal como se describe en el Ejemplo 5 con una excepción, se aplicó la matriz de alginato durante la reticulación al biselado de la aguja usando una de las jeringuillas de mezcla con una pequeña aguja enromada montada. La proteína de unión usada en este biosensor era una proteína de unión a glucosa-galactosa mutante (GGBP), en la que se sustituyó una cisteína por un ácido glutámico en la posición 149, se sustituyó una arginina por una alanina en la posición 213 y se sustituyó una serina por leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S). La proteína GGBP mutante se marcó en la posición 149 con N-((2-yodoacetoxi)etil)-N-metilamino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD).

El extremo proximal de la punta del biosensor 102 se desconectó de manera reproducible y se volvió a conectar desde/a el conducto óptico 104 llevando a que la instrumentación óptica usara un tubo conector de acero inoxidable 100. En referencia a la Fig. 10, en el ejemplo dado, el tubo conector 100 se dimensionó de tal manera que el diámetro interno del tubo era aproximadamente de 20-26 micrómetros más que el diámetro externo de la fibra óptica/aguja y los conjuntos del conducto óptico (Óptimamente, éste sería más pequeño, es decir, con una diferencia de tamaño de aproximadamente 1-12 micrómetros). El extremo proximal de la punta del biosensor 102 y el extremo distal del conducto óptico 104 se pulieron planos y se unieron bajo presión en el interior del tubo conector de acero inoxidable 100 para facilitar la transmisión óptica desde el sensor a la instrumentación óptica. La punta del biosensor 102 podría

tratarse a continuación como desechable liberando ésta del conector de acero inoxidable y del conducto óptico 104.

### **Ejemplo 7**

En otro ejemplo, se formó un biosensor mediante enlace covalente de una matriz de alginato a la superficie de una fibra óptica contenida en el interior de una aguja de calibre 21. La fibra óptica usada comprendía un núcleo de sílice, un revestimiento de sílice, y un tampón poliimida. El diámetro de la fibra era de 400/440/470 micrómetros, en el que las secciones denotan los diámetros medidos desde las zonas exteriores del núcleo/revestimiento/tampón. El extremo proximal de la fibra óptica se pulió y montó en un conector de fibra óptica SMA normalizado para la conexión aun instrumento de fluorescencia óptica. El extremo distal de la fibra se insertó a continuación en una aguja de acero inoxidable de calibre 21, extendiéndose la punta de la fibra aproximadamente 200 – 500 micrómetros pasado el extremo inferior del biselado de la aguja.

La fibra óptica, el conjunto de la aguja, se colocaron a continuación en una cámara de vacío para el tratamiento por plasma. La fibra óptica se colocó en el plano medio de una cámara de vacío cilíndrica con un diámetro de 12 pulgadas (30,48 cm) y una altura de 18 pulgadas (45,72 cm). Se colocó un vial abierto de 1 pulgada (2,54 cm) de diámetro por 2 pulgadas (5,08 cm) de altura que contenía aproximadamente 5 centímetros cúbicos de APTMS sobre un electrodo en la cámara. Se evacuó el sistema inicialmente mediante una bomba turbomolecular, respaldada con una bomba de desbaste con álabe rotatorio, a una presión de aproximadamente 8 miliTorr. A continuación, la válvula en la línea de bombeo se volvió a regular para dejar aumentar la presión de vaporización del monómero a unos 85 militorr constantes. A continuación se excitó el electrodo mediante un generador de energía de radiofrecuencia de 13,56 MHz, en serie con una red emparejada para liberar 22 vatios de energía eléctrica. El plasma producido de esta manera funcionó durante 60 segundos para polimerizar el vapor del monómero en una película sobre la superficie de la fibra.

A continuación se acopló al revestimiento de APTMS una matriz de hidrogel basada en alginato. La matriz de hidrogel basada en alginato se preparó mediante química de la carbodiimida a través de los carboxilos usando dihidrazida de ácido adípico (AAD) con alginato Pronova™ UP LVG con reticulación covalente. Se seleccionó Pronova™ UP LVG por su baja viscosidad y su elevada relación gularónico a manurónico. Se preparó una disolución de alginato al 2% disolviendo 1 gramo de alginato en 50 ml de tampón MES 0,1 M (pH 6,0) y añadiendo 110 mg de AAD y 79 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt). La disolución se puede almacenar a 4°C hasta que se necesite. A la disolución de alginato se añadieron 145 mg de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC) por 10 ml de disolución, usando una técnica de mezcla de jeringuilla doble. A continuación la mezcla de alginato, AAD, HOBt, EDC se aspiró en una jeringuilla de 1 ml y se montó en la jeringuilla una aguja de calibre 30 enromada. Se cebó la aguja, y a continuación se insertó la punta en el biselado de la aguja que contenía la fibra óptica. Se rellenó el biselado de la aguja, asegurando un buen contacto entre la punta de la fibra óptica y la matriz de alginato. Se dejó reticular la matriz durante 15 minutos, y a continuación, la punta y el conjunto de la matriz se transfirieron a una disolución de MES 0,1 M, pH 6,5, en la que se almacenaron durante 2 horas. Al final de las dos horas, las puntas de detección se colocaron en disolución de tampón fosfato en exceso (PBS, cloruro de potasio 0,0027 M, cloruro de sodio 0,137 M, pH 7,4, en la que se almacenaron un mínimo de 30 minutos para detener rápidamente la reacción.

Para unirse a la proteína de unión, se incubaron las puntas en una disolución de GGBP marcada en tampón PBS [NBDE149C/A213R/L238S GGBP] (53 uM, 50 ul) durante aproximadamente 8 horas. Se protegieron los sensores de la luz ambiente durante la incubación. Después de 8-24 horas de incubación, se añadieron a continuación 50 µl de EDC/NHS (200 mM/50/0 mM) al tubo de incubación. Después de 40 minutos, se retiraron las puntas de los sensores y se colocaron en 50 ul de etanolamina 1 M, pH 8,5 para detener rápidamente la reacción. Después de 20 minutos en la disolución de etanolamina, las puntas de los sensores se transfirieron a una disolución de PBS, en la que se dejaron asentar durante al menos 24 horas eliminándose a la vez mediante difusión la proteína sin reaccionar. A continuación se transfirieron los sensores a PBS reciente y se almacenaron en la oscuridad hasta que estuvieron listos para el uso.

En una prueba, la punta del biosensor, incluyendo la aguja, la fibra, y el elemento de detección, se insertaron a una profundidad de aproximadamente 1 – 2 mm en el costado de un cerdo de Yucatán diabético despierto. El cerdo se había vuelto diabético mediante la administración del fármaco estreptozotocina. Durante la prueba, se trató alternativamente el cerdo con insulina y alimento para ajustar los niveles de glucosa. Se tomaron muestras de sangre a intervalos a través de un catéter de cuello y se probaron las lecturas del azúcar en sangre en un medidor de glucosa en sangre manual. Se observó la intensidad de la fluorescencia del biosensor para rastrear niveles de glucosa cambiantes en el cerdo despierto, tal como se muestra en la Fig. 11. En la Fig. 11, la curva sólida representa la señal de fluorescencia procedente del biosensor, mostrándose las unidades en el eje y a mano izquierda. Los triángulos representan los niveles de glucosa en sangre determinados en el medidor manipulado manualmente, leyéndose los valores en el eje y a mano derecha.

## REIVINDICACIONES

1.- Un dispositivo biosensor para la detección de un analito diana en una muestra que comprende una pluralidad de agujas (21) que tienen un extremo proximal y un extremo distal y que están unidas a una única montura (24), y al menos una aguja (21) que comprende un elemento de detección (6) unido a la superficie interna de la aguja (21);

5 **caracterizado porque**

dicho elemento de detección (6) comprende al menos una proteína de unión periplásmica marcada luminiscente adaptada para unirse con al menos un analito diana y adaptada para experimentar un cambio de luminiscencia tras la unión de la proteína de unión periplásmica al analito diana, y dicho elemento de detección (6) está atrapado en o unido a una matriz polimérica (14) en la que una fibra óptica (4) que tiene un extremo proximal y un extremo distal se aloja al menos parcialmente en el interior de la aguja (21) y la matriz polimérica (14) está unida covalentemente al extremo distal de la fibra óptica (4) mediante grupos reactivos en la matriz polimérica (14).

2.- El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además un miembro de acoplamiento óptico para unir la fibra óptica (4) a un sistema óptico (2) y que está configurada y dimensionada para recibir un componente óptico que se puede unir a la anterior.

15 3.- El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además al menos un grupo de referencia asociado con la proteína de unión periplásmica, en el que el grupo de referencia produce una señal luminiscente que no cambia sustancialmente tras la unión del analito diana con la proteína de unión periplásmica y se usa para la referenciación y la calibración interna.

20 4.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la aguja (21) que contiene dicho elemento de detección (6) está adaptado además para insertarse en o a través de la piel de un paciente.

5.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la aguja (21) y el elemento de detección (6) son estériles.

6.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la matriz polimérica (14) se extiende desde el extremo distal de la fibra óptica (4) una distancia de entre 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ .

25 7.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la matriz polimérica (14) incluye una superficie proximal unida a la fibra óptica (4) y una superficie distal separada de la superficie proximal, en el que la superficie distal comprende una superficie reflectora o de dispersión (16).

8.- El dispositivo de la reivindicación 7, en el que la matriz polimérica (14) incluye partículas de dispersión de luz.

9.- El dispositivo de la reivindicación 8, en el que la fibra óptica (4) y el elemento de detección se alojan en el interior de la aguja (21).

30 10.- El dispositivo de la reivindicación 8, en el que la aguja se extiende desde un extremo proximal hasta un extremo distal y el elemento de detección se sitúa adyacente al extremo distal de la aguja.

11.- El dispositivo de la reivindicación 10, en el que el extremo distal incluye una punta biselada.

12.- El dispositivo de una de las reivindicaciones 1-11, en el que la aguja (21) tiene uno o más puertos.

35 13.- El dispositivo de la reivindicación 12, en el que dicho uno o más puertos se sitúan entre el extremo proximal y el extremo distal.

14.- El dispositivo de la reivindicación 12 o 13, en el que uno o más puertos permiten el acceso del analito al elemento de detección.

15.- El dispositivo de la reivindicación 12 o 13, en el que el uno o más puertos permiten la administración de un agente terapéutico a su través.

40 16.- El dispositivo de una de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un elemento de detección de la temperatura para la detección de la temperatura de la muestra.

17.- El dispositivo de la reivindicación 9, en el que el extremo distal de la aguja (21) incluye una porción de la punta flexada (29) que se extiende distalmente más allá y adyacente al elemento de detección (6).

45 18.- El dispositivo de la reivindicación 17, en el que la porción de la punta flexada (29) incluye una superficie reflectante de la luz (30) enfrentada a la fibra óptica (4).

19.- El dispositivo de una de las reivindicaciones 1-18, que se puede insertar en el cuerpo de un paciente para la

detección de un analito diana en una muestra.

- 5 20.- El dispositivo de una de las reivindicaciones 1-19, en el que al menos una porción del extremo proximal de la al menos una aguja (21) está configurada para permanecer en el exterior del cuerpo del paciente cuando se lleva puesto el dispositivo, y en el que al menos una porción del extremo distal de la aguja (21) está configurada para permanecer en el interior del cuerpo del paciente cuando se lleva puesto el dispositivo.
- 21.- El dispositivo de la reivindicación 20, que comprende además un dispositivo limitante de la profundidad unido a al menos una aguja (21), en el que el dispositivo limitante de la profundidad limita la profundidad a la que se puede insertar el extremo distal del cuerpo de la punta en el cuerpo del paciente.
- 10 22.- El dispositivo de la reivindicación 20, en el que el extremo proximal de al menos una aguja (21) está unido a un parche (24) y el parche está configurado y dimensionado para llevarse puesto en la parte externa de la piel del paciente.
- 23.- El dispositivo de la reivindicación 20, en el que el extremo proximal de la al menos una aguja (21) está unido a un reloj y el reloj está configurado y dimensionado para llevarse puesto en la zona externa de la muñeca del paciente.
- 15 24.- El dispositivo de una de las reivindicaciones 1-23, en el que el elemento de detección (6) está configurado para transmitir una señal óptica en respuesta a la detección de glucosa.
- 25.- El dispositivo de una de las reivindicaciones 1-24 en el que los grupos reactivos en la matriz polimérica (14) se unen covalentemente a la fibra óptica (4) mediante grupos amina en el extremo distal de la fibra óptica (4).
- 26.- Un procedimiento de fabricación de un dispositivo biosensor para la detección de un analito diana en una muestra que comprende:
- 20 proporcionar una aguja (21) que tiene un extremo proximal (28) y un extremo distal (19) que incluye una punta biselada (29);
- insertar un extremo distal de una fibra óptica (4) en la cánula de la aguja;
- proporcionar una matriz polimérica (14) que atrapa un elemento de detección (6) o a la cual se une un elemento de detección, y cuya matriz polimérica (14) se une covalentemente al extremo distal de la fibra óptica, en el que el
- 25 elemento de detección (6) comprende al menos una proteína de unión periplásmica marcada luminiscente adaptada para experimentar un cambio de luminiscencia tras la unión de la proteína de unión del analito diana.
- 27.- El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende además inmovilizar el elemento de detección (6) en la matriz polimérica (14).
- 30 28.- El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende además unir la matriz (14) a la cánula de la aguja adyacente al extremo distal de la aguja.
- 29.- El procedimiento de la reivindicación 26, en el que los grupos reactivos de la matriz polimérica (14) se unen covalentemente a la fibra óptica (4) mediante grupos amina en el extremo distal de la fibra óptica (4).

35

40

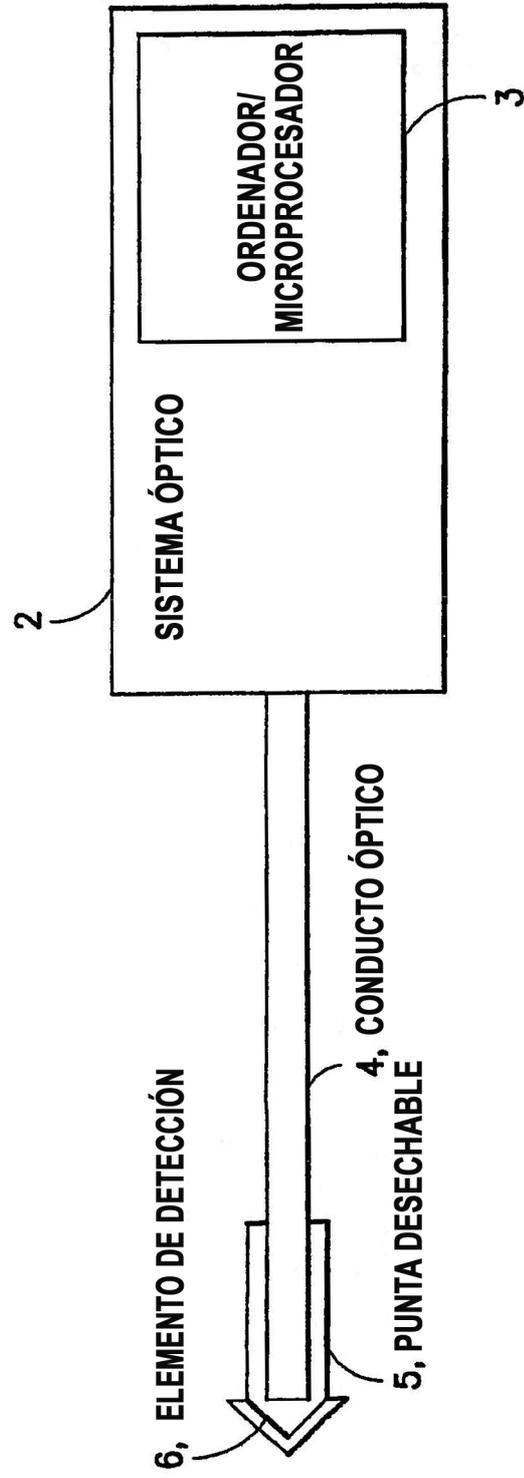


FIG.1

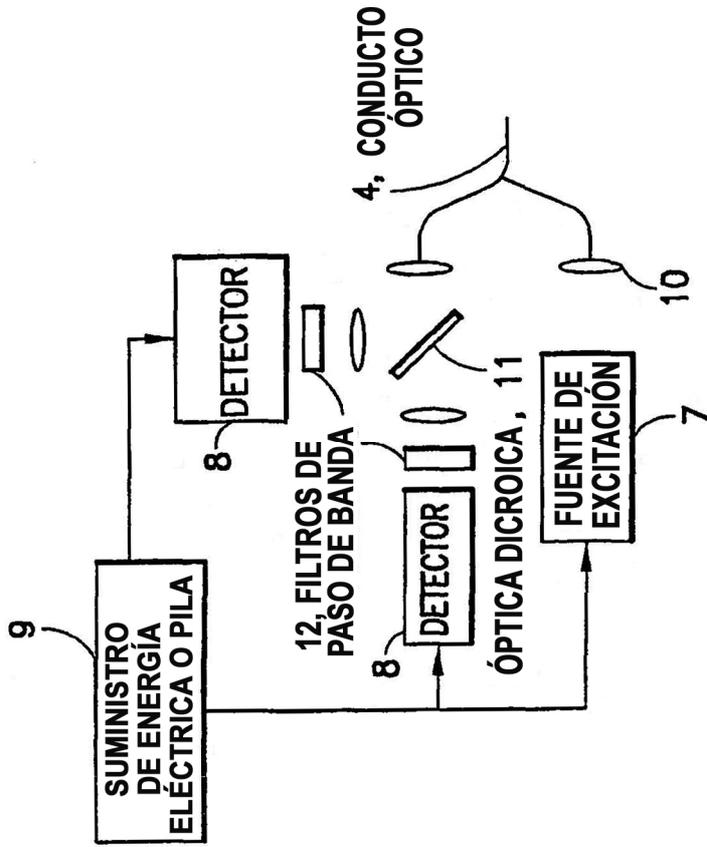


FIG.2A

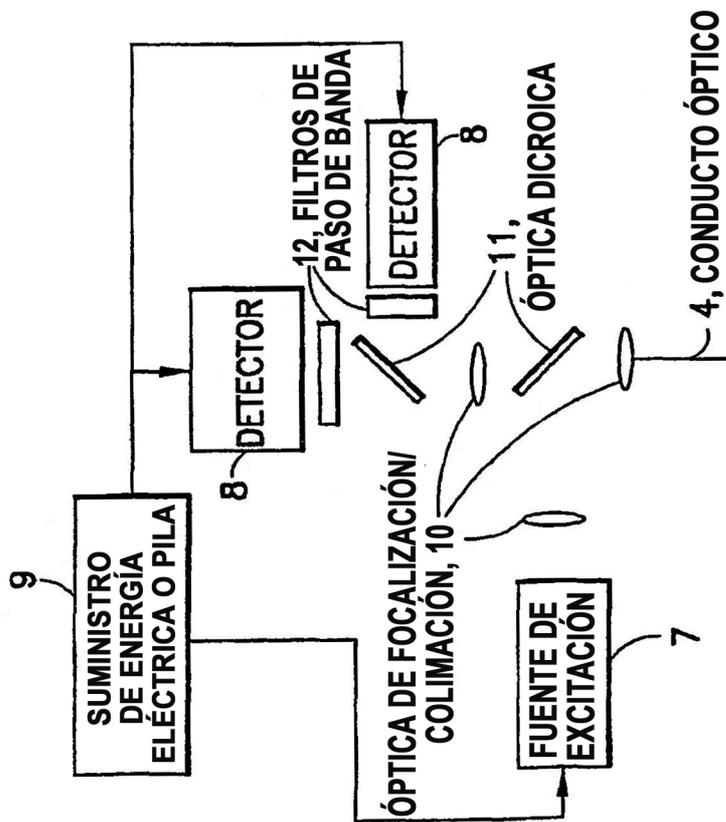
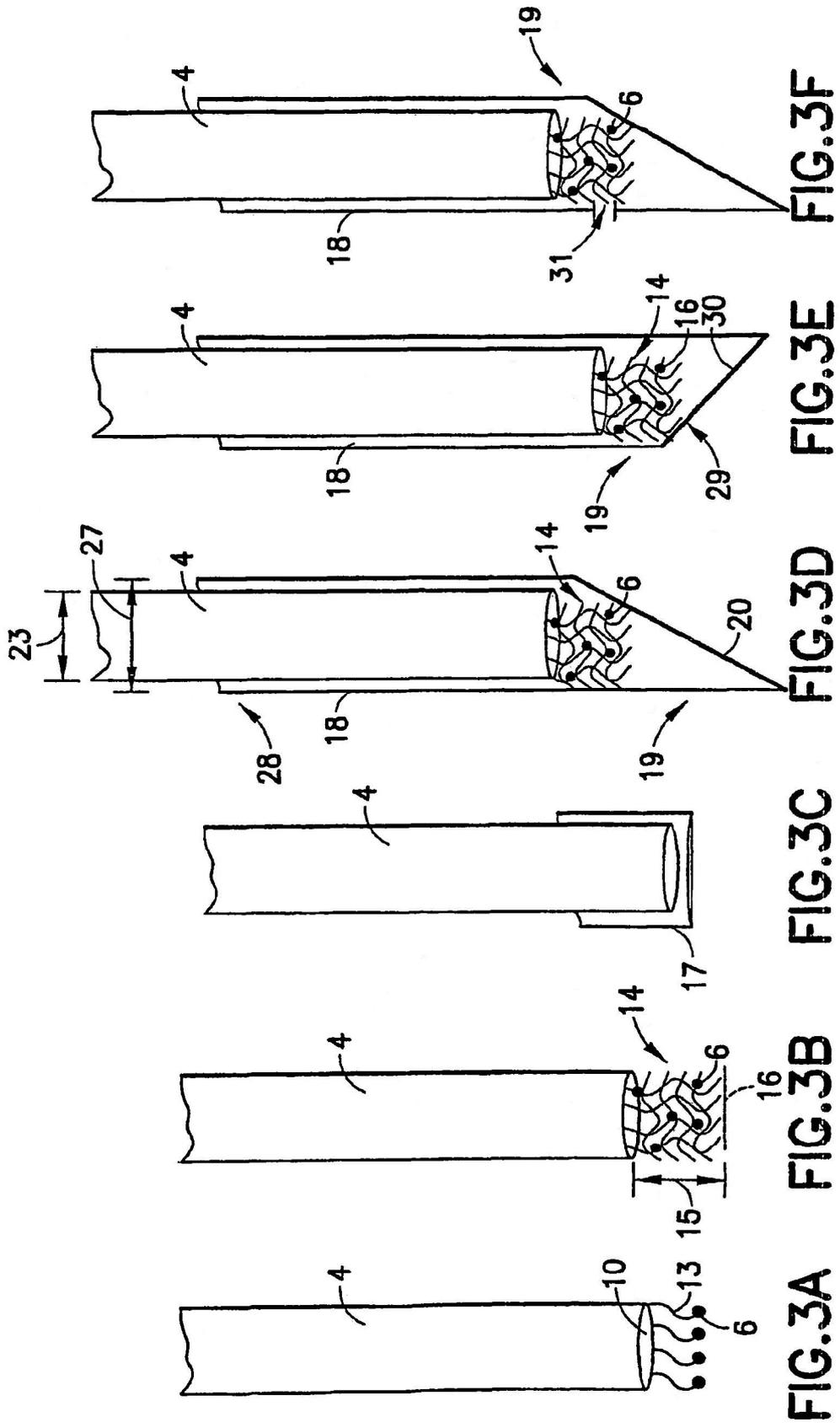


FIG.2B



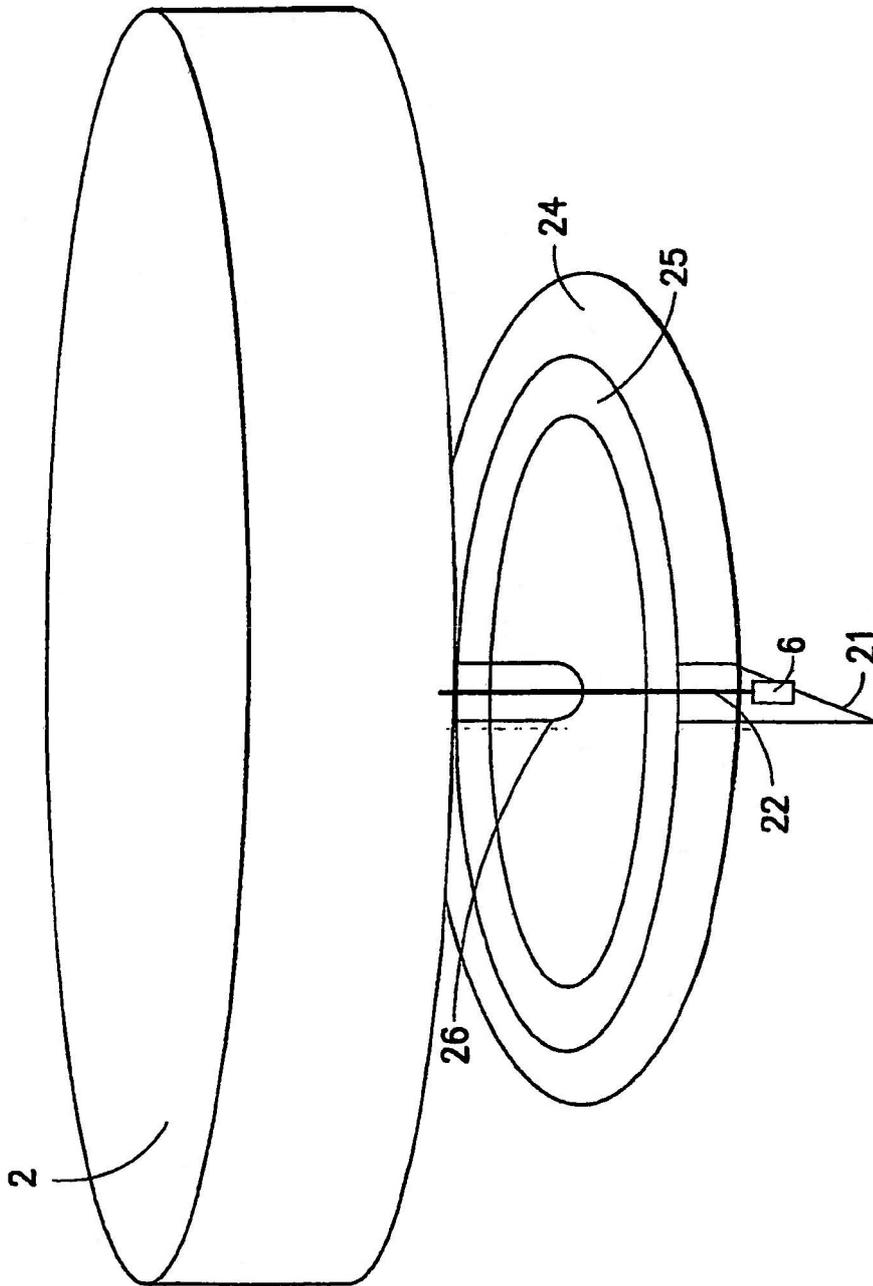
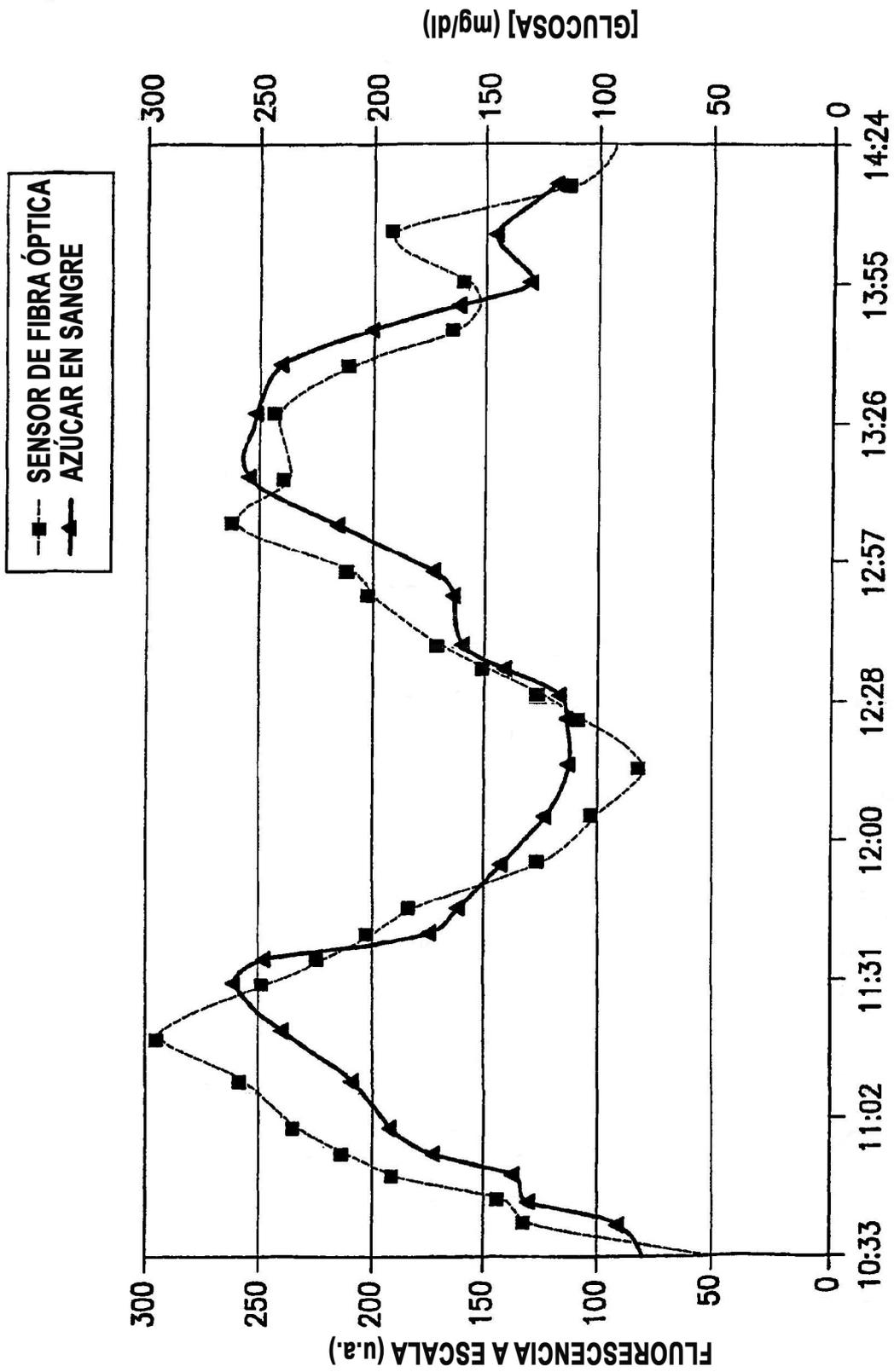


FIG.4



MOMENTO DEL DÍA

FIG.5

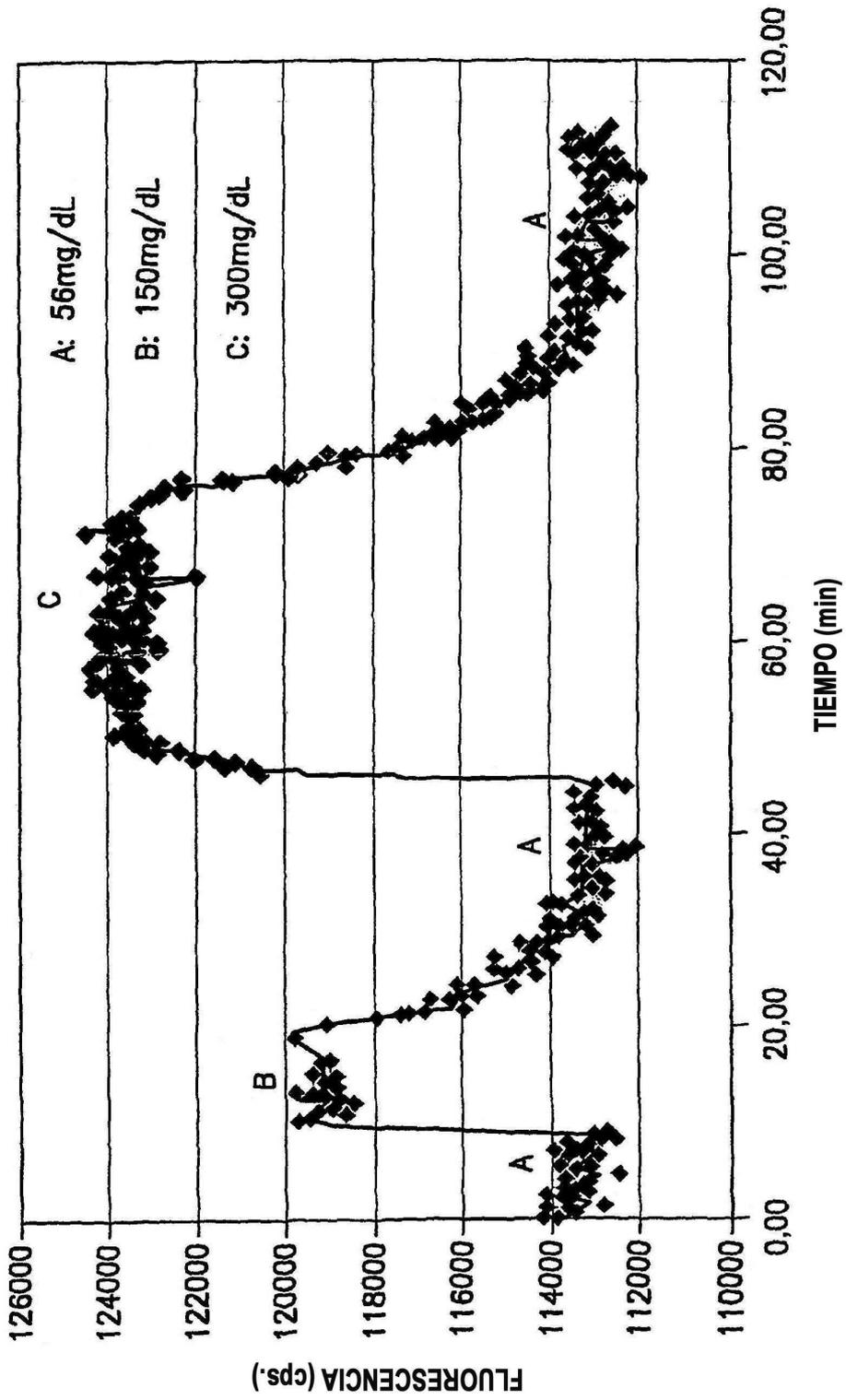


FIG.6

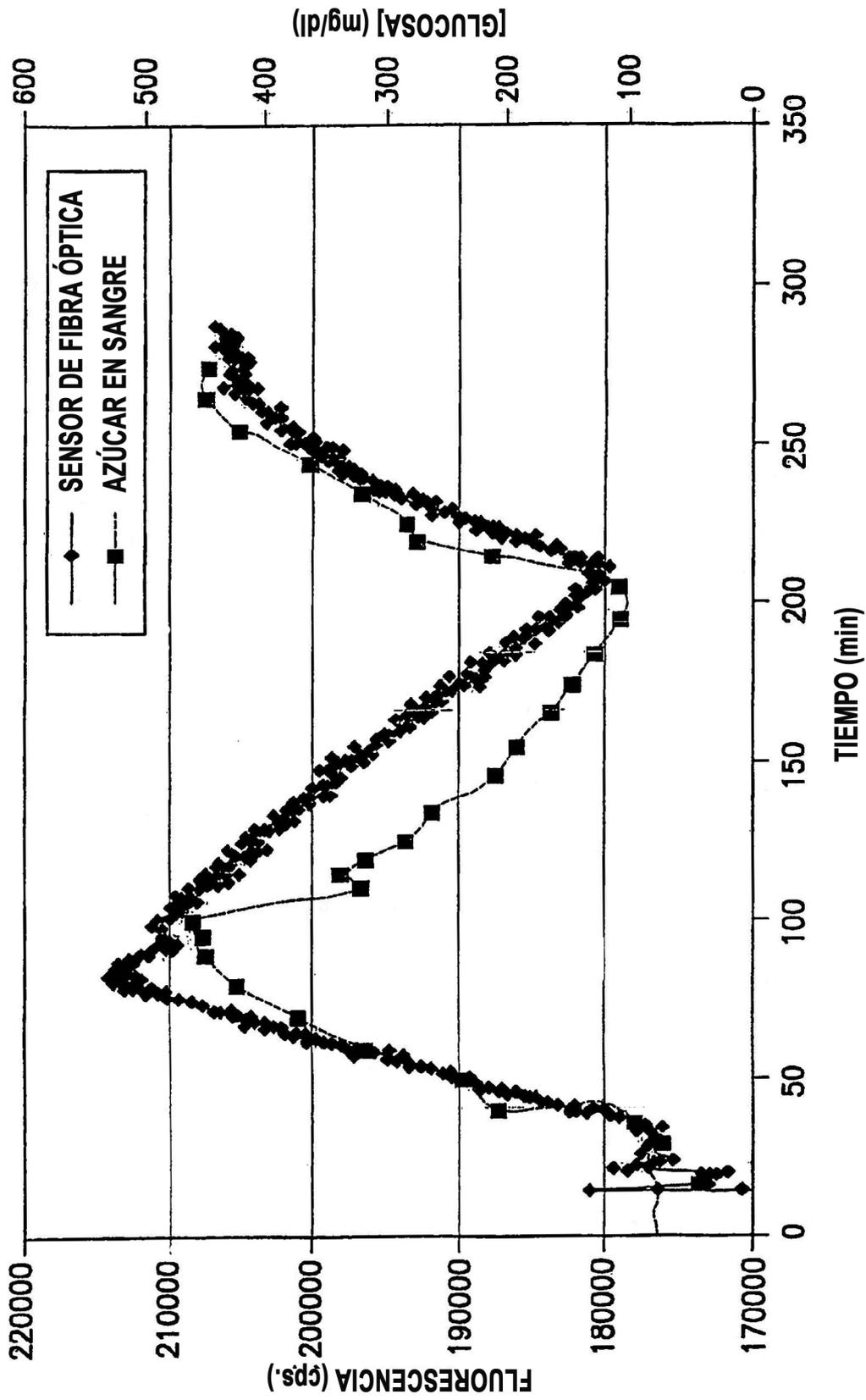
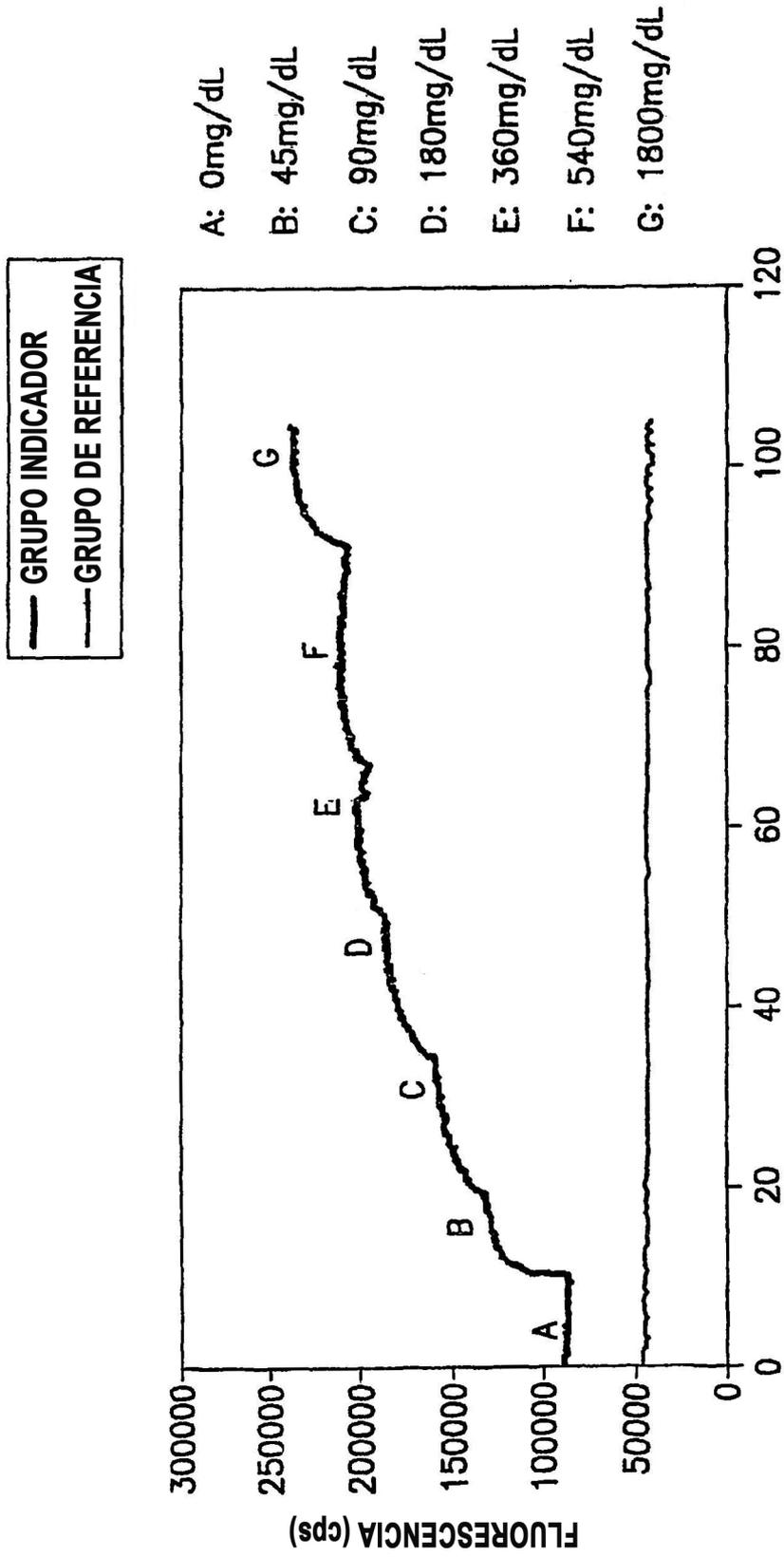
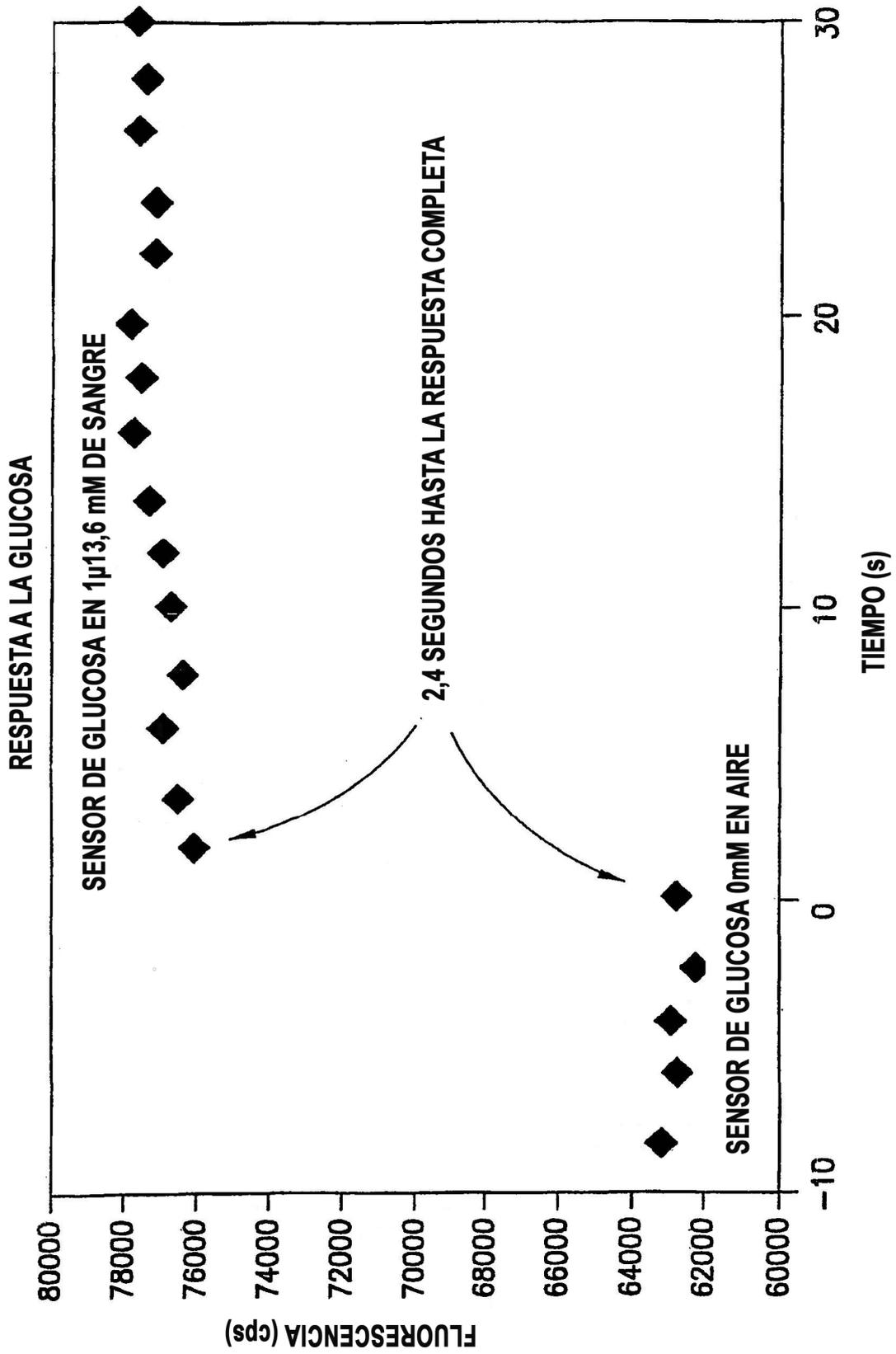


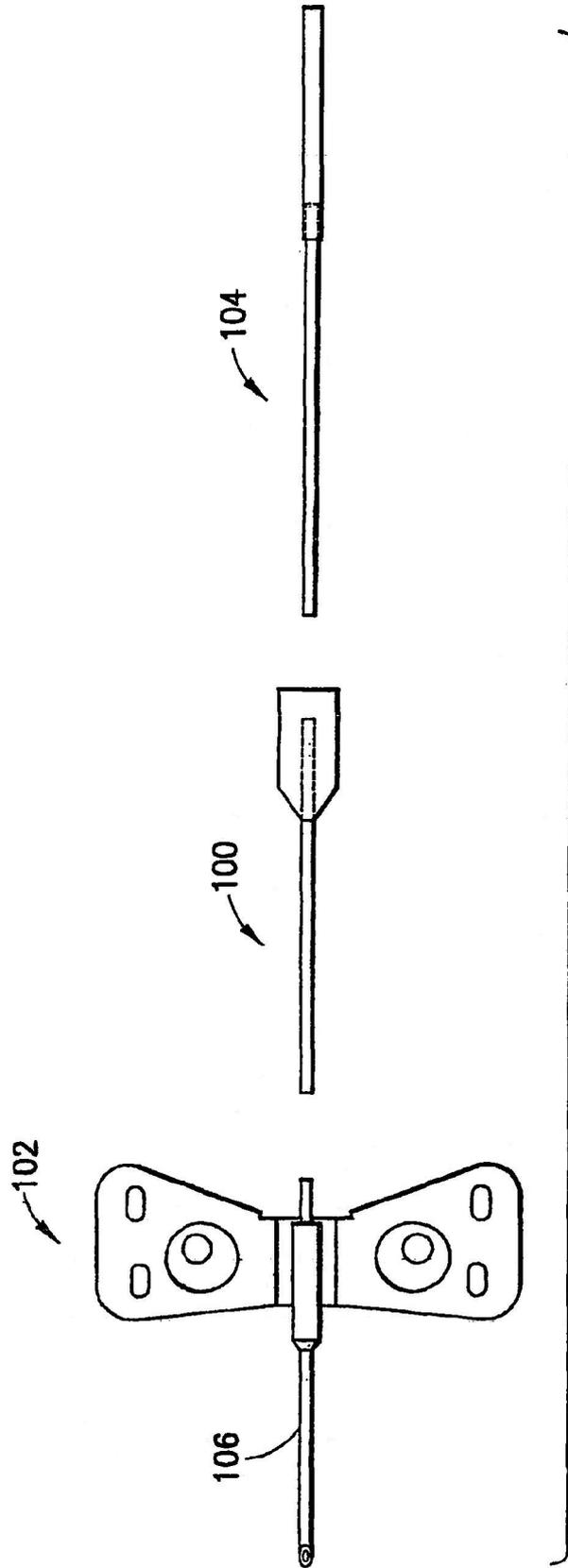
FIG.7



TIEMPO (min)  
**FIG.8**



**FIG.9**



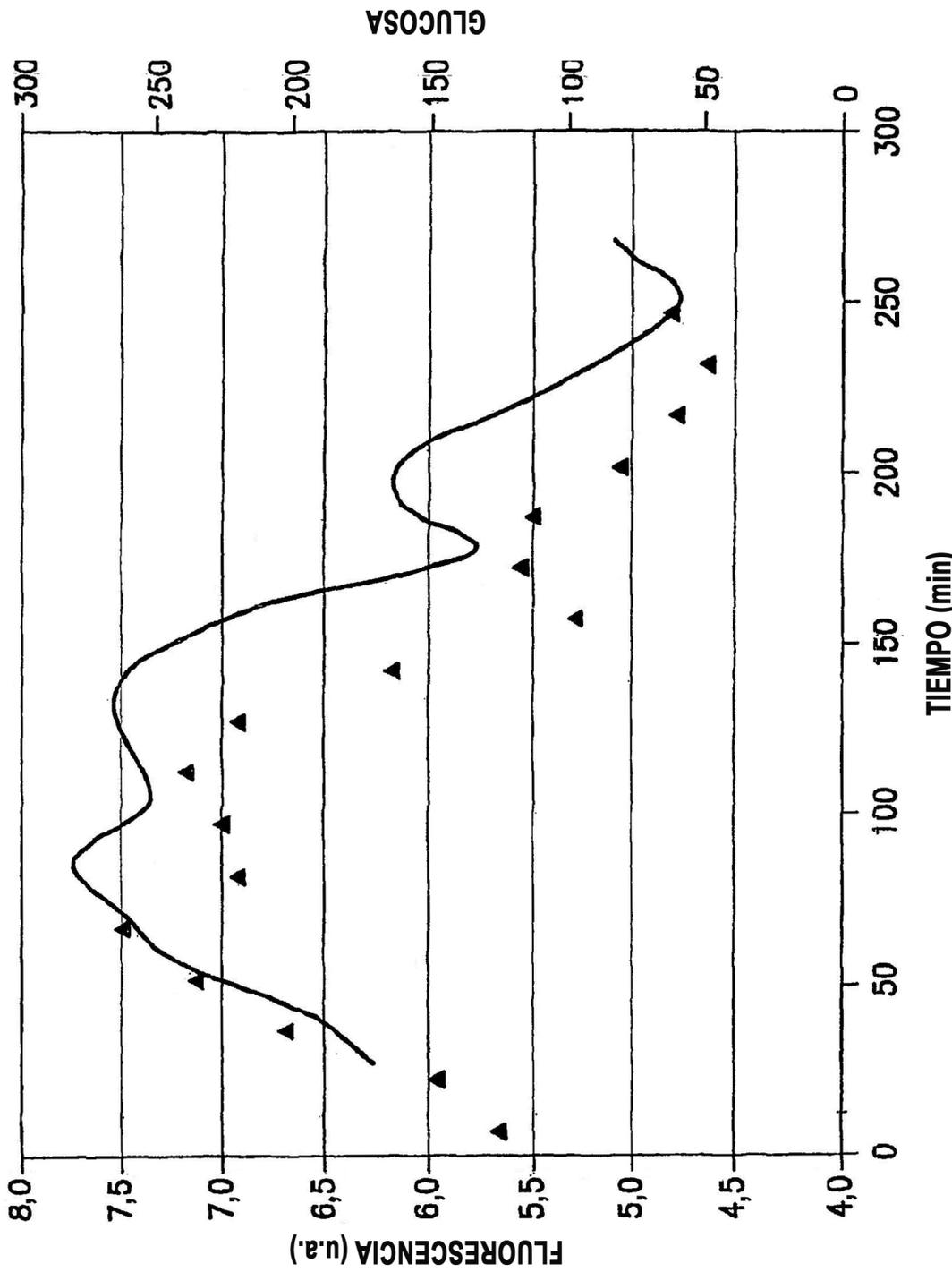


FIG.11