

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 077**

21 Número de solicitud: 201430899

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**12.06.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.12.2015**

Fecha de la concesión:

**13.09.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**20.09.2016**

73 Titular/es:

**DÍAZ MARTÍN, Juan Antonio (33.3%)**

**Colombia Nº 30 - 5º izda.**

**28016 Madrid (Madrid) ES;**

**MATILLA FUENTES, Joaquín (33.3%) y**

**SÁNCHEZ ARIAS, Juan Antonio (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DÍAZ MARTÍN, Juan Antonio;**

**MATILLA FUENTES, Joaquín y**

**SÁNCHEZ ARIAS, Juan Antonio**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **Microsensor químico polimérico con sonda molecular fluorogénica, proceso de fabricación y uso para la liberación controlada de sustancias bioactivas y otras aplicaciones**

57 Resumen:

Microsensor químico polimérico con sonda molecular fluorogénica, proceso de fabricación y uso para la liberación controlada de sustancias bioactivas y otras aplicaciones.

La presente invención se refiere a microsensors químicos poliméricos de bajo coste, así como a su método de obtención, que son dispositivos sensibles a las variaciones de la concentración oxígeno en muestras y que comprenden una o más sondas moleculares fluorogénicas que son derivados de metalofteralocianina y/o metaloporfirina ancladas en una matriz polimérica inerte y estable de un xerogel y depositada en forma de película homogénea sobre una placa de ensayo del tipo microplaca o placa microtituladora. Los microsensors son aptos para aquellas operaciones del laboratorio bioquímico que requieren el manejo de múltiples muestras de pequeño volumen, por ejemplo, técnicas inmunológicas o ensayos basados en células, como es la monitorización de estudios metabólicos relacionados con la proliferación celular de eucariotas y procariotas, la citotoxicidad y senescencia celular y la cadena de respiración mitocondrial, entre otras aplicaciones, y pueden además contener y liberar de forma controlada sustancias bioactivas.

ES 2 554 077 B1

## DESCRIPCIÓN

Microsensor químico polimérico con sonda molecular fluorogénica, proceso de fabricación y uso para la liberación controlada de sustancias bioactivas y otras aplicaciones

### Sector técnico de la invención

5 Esta invención se engloba en el campo de la Química, y concretamente en el campo de las tecnologías biomédicas, y se refiere al revestimiento de microplacas con una película sensible al oxígeno, pudiendo estar precargada con una variedad de sustancias bioactivas simultáneamente, o más concretamente, una película biofuncional y bioactiva, de un material biocompatible, químicamente inerte y estable, la cual contiene sustancias  
10 capaces de responder a señales provenientes del medio físico y/o fisiológico que la rodea, induciendo respuestas biológicas y físicas, tal como sería la variación en la concentración de oxígeno disuelta en dicho medio y de tal forma que no requiere la adición de reactivos adicionales, complejas manipulaciones o largos períodos de incubación como los requeridos en otras técnicas de preparación de este tipo de  
15 dispositivos, por lo que son de aplicación, de forma sencilla, eficaz, reproducible y económica, para estudios de laboratorio *in vitro* y *ex vivo*, de la variación de la concentración de oxígeno producida en los procesos biológicos, tanto en cinéticas ultrarrápidas como rápidas o lentas.

### Antecedentes de la invención

20 En los procesos de respiración aeróbica tanto de orgánulos subcelulares como de células vivas, tejidos y organismos completos, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, por lo que se consume continuamente y, consecuentemente, puede proporcionar información sobre su actividad, estado metabólico, viabilidad y/o respuesta fisiológica ante estímulos como la acción de un fármaco, el estrés ambiental, tóxicos o efectores.  
25 Por tanto, la medida de las variaciones en la concentración del oxígeno disuelto en un medio resulta de importancia capital en el seguimiento de multitud de procesos químicos y bioquímicos.

Existen varios métodos para la medición de oxígeno disuelto; entre ellos podríamos destacar métodos electroquímicos, métodos polarográficos (Celda Clark) y métodos  
30 químicos (determinación de oxígeno por Winckler). Sin embargo, la mayoría de estos procedimientos tienen serios problemas para la medida del consumo de oxígeno en procesos bioquímicos, ya que, a la complejidad técnica de muchos de ellos, se une su escasa o nula capacidad de miniaturización y de seguimiento continuo del proceso, sin mencionar la obligación, por parte del usuario, de realizar operaciones permanentes de  
35 mantenimiento (limpieza, calibración, cambio de membrana y electrolito, pulido del ánodo, etc.).

Por ello, cada día aumenta el interés en el uso de nuevos sensores ópticos para la medida de la concentración de oxígeno, empleando sustancias que son capaces de absorber luz en la región visible y desactivarse por emisión fluorescente (sondas  
40 moleculares fluorogénicas), a través del conocido efecto del “*quenching*” o atenuación fluorescente provocada por el oxígeno sobre una gran cantidad de sondas moleculares fluorogénicas (Mills, A.; *Platinum Metals Rev.*, 1997,41, (3), 115-126; LingLing X. y col., *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52 (2), 188-193). Por tanto, este tipo de compuestos son útiles para reconocer cuantitativamente la presencia de un determinado analito, mediante  
45 cambios en sus propiedades ópticas.

La fluorescencia se limita a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales determinadas (grupos con capacidad coordinante

de cationes, tales como los macrociclos de distintos tamaños conteniendo átomos dadores como nitrógeno, oxígeno y azufre, en los que la intensidad de fluorescencia depende del número de anillos y del grado de condensación) y en entornos químicos capaces de soportar y favorecer el proceso. Según diversos trabajos, parece demostrada la mejor sensibilidad para la detección de oxígeno molecular de las sondas fluorescentes derivadas de metaloporfirinas de platino, las cuales absorben y emiten en el espectro visible (típicamente a 540 y 655 nanómetros, respectivamente), con largos tiempos de estado excitado (>10 pseg) y, muchas de ellas, son accesibles comercialmente.

Resumiendo todo lo anterior, la tecnología conocida consiste en el uso de una sonda molecular fluorogénica capaz de ser excitada con un fotón hacia niveles altos (e inestables) de energía electrónica y vibracional, de forma que la molécula tiende a retornar a su estado fundamental de energía, liberando el exceso energético en forma de un fotón. Sin embargo, durante el proceso, parte de la energía se disipa, por lo que el fotón emitido por la sonda molecular fluorogénica es de menor energía, o lo que es lo mismo, de mayor longitud de onda que la absorbida inicialmente, según la ley de Stokes. Además, la intensidad y longitud de onda de la luz emitida depende tanto de la estructura química de la sonda molecular fluorogénica como del medio químico en el que se encuentra, pudiendo ser desactivada por un gran número de factores, siempre teniendo en cuenta que los procesos de “*quenching*” requieren contacto físico entre sonda molecular fluorogénica y “*quencher*” (< 2 Å).

En consecuencia, no todas las sondas moleculares fluorogénicas conocidas son ideales para las aplicaciones pretendidas, ya que no permiten un contacto íntimo entre su centro de coordinación y la molécula de oxígeno que actúa como “*quencher*”, lo que se creyó podría resolverse mediante el uso de sondas moleculares fluorogénicas capaces de disolverse en el medio de cultivo en el que se desarrolla el experimento. Sin embargo, ante esta posibilidad algunos autores ya han puesto de relieve los riesgos de la presencia de algunos iones metálicos a la hora de afectar directamente a las células sujeto del ensayo, dada la conocida citotoxicidad de algunos de los cationes metálicos presentes en la estructura de los complejos que se usan habitualmente como sondas moleculares fluorogénicas (rutenio, paladio, platino, etc.); este aspecto es muy relevante para el empleo de dichas sondas en estudios de larga duración, como son los estudios de linfoproliferación y los de citotoxicidad, independientemente de la demostración de su inocuidad a tiempos muy cortos (Papkovsky, D. B. y Fernandes, R., *EP1601955B1*). Además, diversas porfirinas se han usado para el tratamiento de tumores mediante la llamada terapia fotodinámica, que permite la destrucción selectiva de células tumorales con luz visible, combinando un fotosensibilizador (porfirina soluble en agua) y oxígeno, mediante la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Ko Y.-J. y cols., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17 2789–2794; Z. Hu y cols., *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2009, 63, 155-164). Del mismo modo, la hematoporfirina IX y sus derivados se han analizado frecuentemente como foto-insecticidas, es decir como moléculas fotoactivables para su uso como plaguicidas en el control de insectos (Pujol –Lereis, L.M. y cols., *Revista Química Viva* 2011, 10, 139-153), dada su capacidad, como consecuencia de la fotoactivación, para producir intermedios de oxígeno reactivos (ROI).

Consecuentemente, a la vista de la creciente bibliografía científica sobre el tema en cuestión se deduce el extremado interés por el desarrollo de nuevos sensores químicamente inertes, como son los dispositivos miniaturizados de alto rendimiento basados en materiales poliméricos con una estructura basada en silicio, obtenidos con tecnología sol-gel (Young, S.K., *Material Matters* 2006, 1.3, 8), que usan métodos de detección no destructivos, sobre una mínima cantidad de muestra, con medidas *in situ* y en tiempo real, usando una instrumentación simple y asequible en cualquier laboratorio.

El método conocido más simple de fijación de la sonda molecular fluorogénica a la matriz aprovecha el fenómeno de adsorción (Wodnicka M. y cols., *J Biomol Screen* 2000, 5, 141), basado en la atracción intermolecular mediante fuerzas iónicas, hidrofóbicas o de Van der Waal, según la naturaleza de las moléculas involucradas. Aunque es un método muy simple, carece de especificidad y es de esperar la pérdida paulatina de la sonda molecular fluorogénica por desorción, la cual influye en la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de la medida (por la posible pérdida de emisión fluorescente) y en su fiabilidad (por la posible interacción entre la sonda y el material biológico usado). Esto nos indica que no se conoce aún un método de fijación permanente, económicamente rentable y sin residuos potencialmente tóxicos, de la sonda fluorogénica a la matriz de silicio, lo que sería altamente recomendable para lograr sensores químicamente inertes, para la medida de variaciones en la concentración de oxígeno presente en los medios biológicos.

El método de fijación más seguro descrito hasta ahora consiste en la formación previa de uno (o varios) enlaces fuertes, como son los enlaces covalentes, entre una sonda molecular fluorogénica, convenientemente sustituida y la matriz sílicea (Figueira, F. y cols., *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2011; 15: 517–533). Como fruto de esta necesidad se pueden citar varios trabajos en los que se crea un enlace amida entre la tetracarboxifenilporfirina y la 3-aminopropil sílica gel (Benedito, F.L. y cols., *Applied Catalysis A: General* 2003, 250, 1–11; Rahimi, R y cols., *ECSOC* 14, 2010), la creación de un enlace covalente entre tetracarboxifenil- y tetrapropil- metaloporfirinas de platino y biomoléculas (Sagner, G. y cols., 1999, US006004530A), la formación de un enlace amida entre diversas tetracarboxifenil metaloporfirinas y un alcóxido funcionalizado (3-aminopropiltriétoxosilano) (Cohauila, M.I., *Tesis Doctoral*, 2011) y tetrasulfoftalocianinas (Cohauila M. I., *J. Sol-Gel Science and Technology*, 2006, 37, 117-120) que, posteriormente, se incluyen en la red de sílice.

Evidentemente, aunque con buenos resultados, desde un punto de vista químico y técnico, los procedimientos anteriores presentan algunas dificultades, tales como el empleo de reactivos, subproductos y disolventes difíciles de retirar del medio de reacción, el uso de derivados de silicio funcionalizados de alto precio, altas temperaturas de reacción y disolventes que no resultan compatibles con los polímeros con los que se fabrican las microplacas (poliestireno, policarbonato, polipropileno, polivinil-cloruro, politetrafluoretileno, polietileno, polímeros de ciclo-olefina, etc.).

Una de las principales dificultades a las que se enfrenta el personal de laboratorio en el campo de los ensayos biológicos consiste en la creciente sofisticación de las técnicas experimentales y de *screening* llevadas a cabo en microplacas. Entre las posibles aplicaciones del empleo de las sondas moleculares fluorogénicas, para la medida de variaciones en la concentración de oxígeno, debidas al metabolismo celular, se puede citar, por ejemplo, la proliferación de los linfocitos T (responsables de coordinar la respuesta inmune celular y de facilitar la cooperación necesaria para desarrollar la producción de anticuerpos por los linfocitos B y todas las formas de inmunidad mediada por células) es uno de los primeros eventos que tiene lugar en una respuesta inmune. La técnica de linfoproliferación permite evaluar dicha capacidad funcional y consiste en el cultivo de sangre periférica, con y sin estímulo proliferativo. La proliferación de las células se expresa como Índice de Estimulación, o, lo que es lo mismo, el cociente entre los valores obtenidos en los cultivos estimulados y no estimulados. Por tanto, la técnica de la linfoproliferación o de transformación linfoblástica permite detectar inmunodeficiencias de tipo celular, mediante la medición del impacto inmunológico y, en consecuencia, la evaluación del impacto inmunológico sobre el sistema inmune adaptativo o adquirido de los vertebrados. Dicho sistema inmune se puede ver influido por numerosas

circunstancias como son: sustancias químicas, fármacos, aditivos de alimentos, características del medio ambiente, condiciones de manejo, selección y genética, etc.

Es por ello que la investigación dentro del campo de la inmunología y en estudios de laboratorio de la estimulación del crecimiento *in vitro* de linfocitos, tanto en primates como en otras especies animales (bovinos, equinos, porcinos, ovinos, etc.), nos da idea de la proporción de linfocitos presentes en el individuo, la cual se asocia directamente con su capacidad de respuesta inmunológica. Según el estado de la técnica actual, para llevarlo a cabo, se necesitan 2 ml de sangre entera con heparina, conservada en la misma jeringa de extracción. Debe asegurarse la rápida y correcta mezcla de la sangre con el anticoagulante mediante suaves inversiones de la jeringa, y se deben mantener condiciones de esterilidad en la extracción y conservación de la muestra, sin refrigerar, para mantener a temperatura ambiente.

Requiere además analizar lo antes posible la muestra después de extraída y no más allá de las 12 horas, teniendo en cuenta que, para la toma de dicha muestra, el sujeto debe estar en ayunas. El método actual, más comúnmente usado es aquel en el que los linfocitos sensibilizados se ponen en contacto frente al antígeno, para que proliferen y se dividan, midiendo el grado de proliferación con timidina tritiada (previamente añadida al medio de cultivo) unida a los nucleótidos que se van a usar para la síntesis de DNA. El protocolo estándar consistiría en:

- Aislamiento de linfocitos, a partir de sangre total, previa separación en gradiente de Ficoll-isopaque.
- Lavado varias veces con medio de cultivo celular y ajuste de la concentración a 5 millones de células/ml.
- Distribución en placas de microtitulación de 96 pocillos, a las que se le añade la disolución del antígeno problema a la concentración adecuada. A algunos pocillos no se les añade antígeno y se usan como controles negativos.
- Incubación durante 72 horas a 37°C y en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.
- Recolección de las células sobre filtros de fibra de vidrio y trasvase a viales, conteniendo un líquido de centelleo. Posteriormente se determina la radiación beta emitida, la cual será directamente proporcional al número de células en mitosis.
- La tasa de proliferación se establece por comparación entre la radiactividad de los pocillos problema y los controles.

Consecuentemente, sería muy útil una invención técnicamente factible que permitiese la aplicación de un procedimiento alternativo para la investigación *in vitro*, dentro del campo de la inmunología y estudios bioquímicos relacionados, que sea capaz de dar información no sólo de punto final, como los actuales, sino de tiempo real y que además sea rápido, sencillo, eficaz, reproducible, económico, medible con aparatos estándar en cualquier laboratorio, dentro de unos límites de detección y cuantificación adecuados, sin residuos tóxicos o peligrosos, y, consecuentemente, que supere todos los inconvenientes antes mencionados y evite las limitaciones técnicas de las que adolecen los actuales métodos bioquímicos (mantenimiento permanente de equipos costosos e instalaciones sofisticadas, que necesitan de personal autorizado y altamente preparado, aislamiento previo de células, a partir de sangre total, varios procesos intermedios de lavado entre las diferentes reacciones y tratamientos, posibilidad de contaminaciones residuales entre lavados, lentitud en la velocidad de procesado, uso de reactivos radiactivos caros, peligrosos y de difícil destrucción, etc.). Además, en este campo sería de extremada utilidad técnica un dispositivo capaz de medir la transformación linfoblástica, inducida por

mitógenos y/o por antígenos específicos, directamente en sangre completa sin necesidad del aislamiento previo de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), lo que resulta imposible con los actuales métodos colorimétricos.

5 Además de su mayor simplicidad de procesamiento y de evitar la pérdida de poblaciones  
 5 linfocitarias y de células no linfoides, debidas al gradiente de centrifugación, el uso de  
 sangre entera permitiría reproducir de modo ventajoso las condiciones que se dan *in vivo*  
 (Shifrine M y cols., *Am. J. Vet. Res.*, 1978, 39 (4), 687-690), pudiéndose estudiar la  
 potencial influencia sobre la proliferación linfocitaria de otras células sanguíneas  
 10 presentes en la sangre, como los eritrocitos, a través de mecanismos como la producción  
 de citoquinas que acelerarían la proliferación celular.

Es por ello que se puede afirmar que ninguno de los métodos actuales, manuales o  
 automáticos, en tubos o microplacas, patentados o no, son capaces de dar respuesta al  
 conjunto de problemas técnicos que se han planteado más arriba: mantenimiento costoso  
 15 y permanente de equipos e instalaciones altamente sofisticadas, experimentos llevados a  
 cabo exclusivamente por personal preparado específicamente y oficialmente autorizado,  
 necesidad de aislamiento previo de células (a partir de sangre completa), lentitud en la  
 velocidad de procesado por la exigencia en los actuales protocolos de diversos procesos  
 intermedios de lavados y adiciones de reactivos específicos entre las diferentes etapas  
 de test, el uso de un elevado número de pipetas y accesorios, o sistemas robotizados,  
 20 con el consiguiente gasto económico y de tiempo, períodos muy largos de incubación y  
 medida (entre 5 y 7 días), obtención exclusiva de información de punto final, sin datos  
 intermedios de seguimiento de las distintas variables que intervienen en el proceso, alta  
 probabilidad de contaminaciones residuales entre lavados, con el empleo de reactivos  
 radiactivos caros, peligrosos y de difícil destrucción, etc.

25 En vista de los problemas detectados en el campo técnico y aquí comentados, la  
 presente invención ofrece un nuevo dispositivo de medición de variaciones en la  
 concentración de oxígeno disuelto de una muestra y de detección y seguimiento de los  
 procesos biológicos que las producen, que es una microplaca con sensor óptico de bajo  
 coste para ensayos biológicos, constituida de modo que resuelva el problema expuesto y  
 30 apropiada para todo tipo de estudios de quimiosensibilidad relacionados con la  
 proliferación celular de eucariotas (por ejemplo, el test de transformación linfoblástica) y  
 procariotas (por ejemplo, antibiogramas para la selección de antimicrobianos en estudios  
 de susceptibilidad *in vitro*), la citotoxicidad y la cadena de respiración mitocondrial, tanto  
 en fracciones subcelulares, en células aisladas, en tejidos y en fluidos biológicos  
 35 completos, preferentemente sangre y orina, mediante el uso de un lector de placas capaz  
 de medir la fluorescencia o fluorescencia en tiempo resuelto, tanto en modo de lectura  
 inferior como superior. El microsensar químico polimérico aquí descrito consta de una  
 matriz en forma de xerogel dopada con una o varias sondas moleculares fluorogénicas  
 (fluorescentes) portadoras de grupos con una reactividad adecuada a los fines que se  
 40 buscan, de procedencia comercial o no, en una cantidad adecuada para que, por una  
 parte, sean útiles en la medida de variaciones en la concentración de oxígeno disuelto,  
 durante la detección y seguimiento de procesos biológicos y, por otra, de unirse de forma  
 permanente a la matriz gracias a las características químicas específicas que presentan  
 las diversas fases del proceso de sol-gel con el que se prepara el xerogel, evitando  
 45 posibles efectos indeseados, inherentes a la sonda libre. La presente invención, en una  
 de las realizaciones más preferidas, puede incorporar una o varias sustancias bioactivas  
 con distinta afinidad específica para establecer una interacción fisico-química con la  
 superficie de la matriz sólida, capaces de ser adsorbidas en la superficie de dicha matriz y,  
 por tanto, liberarse gradualmente al medio de reacción en una cantidad efectiva para  
 50 producir los efectos pretendidos.

**Definiciones**

Salvo que el contexto indique claramente lo contrario, en la presente memoria, se usan los siguientes términos, con los significados que se proporcionan a continuación:

5 - El término "adsorción" se refiere a la acumulación de sustancias sobre una superficie o interfase, por ejemplo gas-sólido. La matriz sobre la que se produce dicha adsorción se llama adsorbente mientras que el material que se acumula sobre la superficie se llama adsorbato.

10 - El término "adecuado" se refiere a una sustancia, sustituyente, proceso o cantidad apropiados y compatibles con los compuestos, productos, composiciones y dispositivos útiles en el campo de aplicación de la presente invención, según puede ser determinado por un experto en la materia usando únicamente métodos rutinarios de experimentación, y sin necesidad de una destreza inventiva encubierta.

15 - El término "afinidad" se refiere a la capacidad de un adsorbato para fijarse a la superficie de un adsorbente determinado y formar una unión mediante interacciones iónicas, atracción de van der Waals o enlaces de tipo químico, lo que determina la capacidad de retención del adsorbato por el adsorbente.

- El término "alcoxilo" se refiere a cualquier radical orgánico derivado de un alcohol por pérdida del hidrógeno hidroxílico, de fórmula RO-, siendo R un grupo alquilo, tal como se define más abajo.

20 - El término "alquilo" se usa para referirse a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales, ramificadas o cíclicas, que tienen de 1 a 20 átomos de carbono y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos independientemente por 1 a 3  
25 grupos seleccionados independientemente de entre halógeno, hidroxilo, amino, aminoalquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitro, ciano, isocianato, isotiocianato, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -O-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -S-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)OAlquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -CH<sub>2</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, piridinilo, -CH<sub>2</sub>-piridinilo, tienilo, CH<sub>2</sub>-tienilo, furanilo, CH<sub>2</sub>-furanilo,  
30 oxazolilo, CH<sub>2</sub>-oxazolilo, fenilo, bencilo, fenoxi, en el que el grupo alquilo y los anillos de los grupos cicloalquilo, piridinilo, tienilo, furanilo, oxazolilo, fenilo, bencilo, fenetilo y fenoxi pueden estar opcionalmente sustituidos por 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de entre entre halógeno, hidroxilo, amino, aminoalquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitro, ciano, isocianato, isotiocianato, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>,  
35 O-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, -S-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, -CN, -COOH, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)Oalquilo, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

40 - El término "alqueno" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenos pueden estar opcionalmente sustituidos independientemente por 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de entre halógeno, hidroxilo, amino, aminoalquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitro, ciano, isocianato, isotiocianato, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -O-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>,  
45 -S-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)OAlquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, -CH<sub>2</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, piridinilo, -CH<sub>2</sub>-piridinilo, tienilo, CH<sub>2</sub>-tienilo, furanilo, CH<sub>2</sub>-furanilo, oxazolilo, CH<sub>2</sub>-oxazolilo, fenilo, bencilo, fenoxi, en el que el grupo alquilo y los anillos de los grupos cicloalquilo, piridinilo, tienilo, furanilo, oxazolilo, fenilo, bencilo, fenetilo y fenoxi pueden estar opcionalmente sustituidos por 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de entre entre halógeno, hidroxilo, amino,

aminoalquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, nitro, ciano, isocianato, isotiocianato, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, -O-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, -S-perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, -CN, -COOH, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)Oalquilo, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

5 - El término “analito” se refiere a una especie química de naturaleza inorgánica, orgánica o bioquímica y que se determina en una muestra, mediante un conjunto de operaciones y técnicas aplicadas al análisis de dicha muestra.

10 - El término “antibiograma” se refiere a un método de estudio fenotípico de sensibilidad a los antimicrobianos, que consiste en enfrentar un inóculo bacteriano estandarizado a una única o a diferentes concentraciones de antibiótico, permitiendo clasificar a los microorganismos en varias categorías clínicas, como sensibles, intermedios o resistentes y permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

15 - Los términos “antibiótico” y “antimicrobiano” se refieren a sustancias de origen biológico o sintético y se pueden categorizar como bactericidas, si matan a las bacterias susceptibles, o bacteriostáticos, si sólo inhiben reversiblemente el crecimiento de las bacterias. Entre ellos podemos seleccionar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a los siguientes: fosfomicina, vancomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftolozana, tazobactam, avibactam, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, cefpodoxima, cefditoren, cefotetan, ceftazidima, ceftazidima/ácido clavulánico, cefotaxima, cefotaxima/ácido clavulánico, cefepima cefepima/ácido clavulánico, ceftarolina fosamil, aztreonam, imipenem, meropenem, faropenem medoxomil, tebipenem pivoxil, ertapenem, nitrofurantoína, polimixina, estreptomina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, neomicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, nemonoxacino, moxifloxacino, ozenoxacino, finafloxacino, prulifloxacino, ulifloxacino, zafloxacin, delafloxacino, quinupristina, dalfopristina, linopristina, flopristina, pristinamicina, colistina, ácido oxolínico, isoniazida, rifamicina, rifampicina, tetraciclina, minociclina, tigeciclina, amadaciclina, dalbavancina, teicoplanina, daptomicina, pleuromutilina, ácido pipemídico, cotrimoxazol, linezolid, radezolid, tedizolid, fosfomicina, mupirocina, cloranfenicol, ácido fusídico, doxiciclina, lincomicina, clindamicina, eritromicina, oleandomicina, espiromicina, josamicina, diritromicina, fluritromicina, claritromicina, midecamicina, telitromicina, azitromicina, cetromicina, oritavancina, moditromicina, solitromicina, trimetoprim, metotrexato, sulfacetamida, sulfisoxazol, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfamoxol, sulfadimetoxina, sulfametoxipiridazina, sulfametoxidiazina, ftalilsulfatiazol, succinilsulfatiazol, mafenida, sulfadoxina, sulfaguanidina, sulfacetamida y futuros miembros de cualquiera de estas familias.

40 - El término “antifúngico” se refiere a sustancias de origen biológico o sintético que actúan frente a hongos patógenos, entre las que podemos seleccionar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a los siguientes: anfotericina B, nistatina, natamicina, griseofulvina, miconazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, flutrimazol, omoconazol, sulconazol, tioconazol, terconazol, flucitosina, caspofungina, micafungina, anidulafungina, terbinafina, naftifina, ciclopirox, tolnaftato o futuros miembros de cualquiera de estas familias.

45 - El término “antineoplásico” se refiere a sustancias citostáticas y citotóxicas de origen biológico o sintético que son sustancias que actúan sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación de las células tumorales de forma característica, inhibiendo su crecimiento celular, entre las que



podemos seleccionar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a los siguientes: ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, melfalán, trofosfamida, carmustina, estramustina, fotemustina, dacarbacina, temozolomida, bleomicina, mitomicina, doxorubicina, daunorubicina, 4-epirubicina, citarabina, gemcitabina, 5-fluorouracilo, fludarabina, pentostatina, metotrexato, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, topotecán, irinotecán, trastuzumab, rituximab, mitoxantrona, etoposido, teniposido, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, tamoxifeno, ciproterona, flutamida, leuprolida o futuros miembros de cualquiera de estas familias.

5  
10 - El término “antígeno” se refiere a sustancias capaces de inducir una respuesta inmune específica que desencadenan eventos que se pueden manifestar como reacciones alérgicas, inmunológicas y pirógenas.

15 - El término “antiprotozoario” se refiere a sustancias de origen biológico o sintético que actúan frente a parásitos protozoarios, entre las que podemos seleccionar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a los siguientes: metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol, benzinidazol, nifurtimox, furoato de diloxanida, iodoquinol, sulfametoxazol, trimetoprim, paromomicina, dehidroemetina, pirimetamina, quinina, quinidina, etofamida, teclozán, clefamida, antimonio de meglumina, estibogluconato sódico, isetionato de pentamidina, isetionato de propamidina, hexamidina, clorhexidina, suramina sódica, cloroquina, amodiaquina, mefloquina, artemisina, artemeter, artesunato, sulfadoxina, pirimetamina, lumefantrina, doxicilina, proguanil, polihexametilenbiguanida, furazolidona, albendazol, nimorazol, melarsoprol, salinomicina, lasalocida o futuros miembros de cualquiera de estas familias.

20  
25 - El término “arilo” se refiere a un grupo fenilo, furilo, tienilo o piridilo, sustituido o no sustituido, o un sistema de anillo condensado de cualquiera de estos grupos, tal como naftilo.

- Los términos sinónimos “atenuación de la fluorescencia” o “*quenching*” se refieren a un proceso capaz de disminuir la intensidad de fluorescencia de una determinada sonda molecular fluorogénica, sin cambiar el espectro de emisión.

30 - El término “calibración” se refiere al conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia;

35 - El término “cantidad efectiva” de un compuesto, producto o composición se refiere a una cantidad suficiente del compuesto, producto o composición para generar los resultados deseados, ya que, aunque la cantidad exacta requerida podría variar ligeramente de lote a lote, del modo en que será administrada posteriormente, de los resultados específicos buscados, etc., siempre puede ser determinada por un experto en la materia usando únicamente métodos rutinarios de experimentación.

40 - El término “coloide” se refiere a partículas sólidas con diámetro de 1-100 nanómetros donde la fuerza gravitacional es despreciable y la interacción es dominada por fuerzas de corto rango, tales como, atracción de van der Waals y carga superficial.

45 - El término “concentración mínima inhibitoria” se refiere a la concentración más baja del antibiótico que da como resultado la inhibición de crecimiento visible bajo condiciones estándar. y el término “concentración mínima bactericida” se refiere a la concentración más baja del antibiótico que es capaz de matar el 99.9% del inóculo original en un periodo de tiempo determinado.

- El término “*crosstalk*” se refiere a la interferencia entre pocillos, debida a una contaminación cruzada lumínica entre dichos pocillos durante los ensayos de fluorescencia.

5 - El término “curva de calibración” se refiere al conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.

- El término “especificidad” se refiere a la capacidad del método para identificar los pocillos donde no hay una variación significativa del analito y se calcula como la proporción de pocillos sin carga biológica que dan negativo en el test:  $\text{Especificidad} = \frac{\text{Falsos Positivos}}{[\text{Falsos Positivos} + \text{Verdaderos Negativos}]}$ .

10 - El término “estable” se refiere a que no reacciona, no modifica sus características o no sufre cambios en su estructura, por la acción de agentes externos, bien físicos (temperatura, radiación, etc.), bien químicos (disolventes, ácidos, etc.), o bien biológicos (fluídos, enzimas, etc.), manteniendo invariables o inalterables su posición, distribución, forma, composición, estado o situación, al menos, durante el tiempo  
15 requerido para llevar a cabo los estudios deseados.

- El término “fiabilidad” se refiere a la probabilidad de que el dispositivo realice las funciones para las que ha sido diseñado bajo unas especificaciones dadas y durante un período de tiempo determinado.

20 - El término “gel” se usa para referirse a una red rígida interconectada con poros de dimensiones menores a un micrómetro y con cadenas poliméricas las cuales tienen longitud mucho mayor que un micrómetro. Un gel puede ser formado por el crecimiento de una red debido a un arreglo discreto de partículas coloidales o por una red tridimensional interconectada por hidrólisis y policondensación simultánea de un precursor organometálico.

25 - Los términos sinónimos “inmunodepresión” y “trastorno por inmunodeficiencia” se refieren a la disminución o ausencia de la respuesta inmunitaria de un organismo, al no producirse anticuerpos suficientes o por una disfunción de cualquier parte del sistema inmunitario, tal como los linfocitos T o B y derivados de inmunodeficiencias hereditarias, adquiridas, inmunosenescencia, o como efecto secundario de algunos tratamientos.

30 - El término “lector de placas” se refiere a cualquier aparato capaz de realizar los análisis pretendidos de muestras contenidas en “placas de microtitulación”, también llamadas “placa de pocillos”, “placa microtituladora” o “microplaca”, desde 6 a 3456 pocillos, mediante la detección de señales producidas como consecuencia de eventos biológicos, físicos y químicos, bien pocillo a pocillo, bien de manera conjunta, tal como los  
35 lectores de fluorescencia basados en la detección de placas mediante un primer sistema óptico capaz de iluminar la muestra con una longitud de onda específica y un segundo sistema encargado de recoger la luz emitida y separarla (constituidos básicamente por monocromadores, tubos fotomultiplicadores, filtros y un software analítico adecuado).

40 - El término “liberación controlada” se refiere a un sistema de administración de sustancias bioactivas de una forma lenta y continua durante períodos dilatados de tiempo, en el cual, la sustancia bioactiva se incorpora a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios, de modo que la velocidad de liberación de la sustancia bioactiva desde dicho sistema al medio que la rodea, viene determinada por las propiedades del propio polímero y, en menor medida, depende de  
45 los factores ambientales, como pueden ser el pH, la temperatura, etc.

- El término “límite de cuantificación” se refiere a la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

5 - El término “límite de detección” se refiere a la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

10 - El término “lixiviación” se refiere al proceso en el cual se extrae uno o varios solutos de un sólido, mediante la utilización de un disolvente líquido, cuando ambas fases entran en contacto íntimo, permitiéndole que el soluto o los solutos puedan difundirse desde el sólido a la fase líquida.

- El término “matriz biológica” se refiere al conjunto del medio y muestra biológica, de origen procariota o eucariota (p. ej., bacterias, protozoos, plantas, insectos, aves, peces, reptiles, mamíferos, etc), en el cual se genera y/o se encuentra la sustancia de interés, para su estudio *in vitro* o *ex vivo*.

15 - El término “matriz polimérica” se refiere a un material polimérico sólido que contiene múltiples unidades enlazadas químicamente y que están unidas entre sí para formar un sólido, mediante un proceso de polimerización, de modo que moléculas pequeñas se unen para crear otras moléculas y agregados mucho mayores, bien de naturaleza inorgánica, con macromoléculas formadas a partir de enlaces covalentes, sin  
20 la intervención de moléculas de hidrocarburos en su composición, bien de naturaleza orgánica, formados a partir de hidrocarburos o sus derivados, o bien mixtos.

- El término “medio biológico” se refiere a sistemas y mezclas, como pueden ser agua (incluyendo aguas potables, residuales, de torre de enfriamiento y de  
25 procesamiento), disoluciones salinas, medios de cultivo (entendido como una mezcla de componentes que puede incluir, aunque no está limitado a, sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y otros nutrientes disueltos en agua), fluidos biológicos y cualquier otro compatible con la vida de diversos agentes biológicos como son organismos superiores (animales y vegetales), microorganismos (virus, bacterias, levaduras, microalgas, etc.), células vegetales, células de animales, genéticamente  
30 modificados, o no, y partes derivadas de cualquiera de ellos.

- Los términos “metalofalocianina” y “metaloporfirina” se usan para referirse a dos grupos de compuestos que son sondas fluorogénicas, capaces de detectar un analito de forma selectiva, reversible y en tiempo real e informar de su reconocimiento mediante la  
35 emisión de una señal óptica, constituidas por un macrociclo central formado por un sistema cerrado de 16 átomos de carbono y nitrógeno, enlazados a través de un ciclo o de una cadena hidrocarbonada mediante enlaces sencillos y dobles, formando un sistema resonante, capaz de albergar un átomo o ión metálico, elegido entre cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, antimonio, níquel, vanadio, europio, terbio, gadolinio, samario y más preferiblemente, paladio, platino y rutenio, que, generalmente,  
40 forma cuatro enlaces metal-nitrógeno, covalentes y covalentes coordinados. En el caso de la presente invención, la metalofalocianina y la metaloporfirina siempre portan de dos a cuatro grupos polares carboxilato, sulfonato, fosfato o fenol y que se hallan unidos a través de un ciclo o de una cadena hidrocarbonada.

- Los términos sinónimos “microplaca, placa de microtitulación, placa de pocillos o  
45 placa microtituladora” se refiere a una placa de ensayo que presenta una pluralidad de pocillos en forma de receptáculos abiertos por su cara superior, fabricados de un material rígido seleccionado entre vidrio, poliestireno, policarbonato, polipropileno, polivinil-cloruro, polietileno, politetrafluoretileno, polímeros de ciclo-olefina, o similares, en colores

adecuados a cada estudio (normalmente, transparente, blanco y negro) y con distinta geometría (fondo en forma de C, F, U o V), capacidad del pocillo (desde 1 microlitro a 16 mililitros) y con un formato estándar de 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 y 3456 pocillos, en función del experimento a realizar con la placa, la cantidad de material biológico, los medios usados en el experimento (manuales, semiautomáticos o automáticos), etc.

- El término “mitógeno” se refiere a sustancias que estimulan la mitosis y la proliferación celular y, de forma más específica, la transformación de los linfocitos en linfoblastos indiferenciados con capacidad para dividirse. Hay mitógenos inespecíficos, como el mitógeno de fitolaca (PWM), que es mitógeno tanto de linfocitos T como de B y mitógenos específicos, de linfocitos T como la concanavalina A (conA) y la fitohemaglutinina (PHA) y otros de linfocitos B como el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas.

- El término “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra fisiológica o patológica obtenida de un sujeto biológico, incluidos líquidos, secreciones, etc. que forman parte o son producidos a partir de un organismo vivo: fluidos biológicos (incluyendo, pero no limitados a, suero, plasma, sangre, orina, saliva, sudor, leche, exudado vaginal, semen, jugos gástricos, líquido duodenal, líquido cístico, líquido ascítico, líquido intraocular, líquido pericárdico, líquido sinovial, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido peritoneal, exudados provenientes de lesiones, extractos de heces o estiércol, o alguno de sus componentes aislados), órganos, tejidos, incluyendo muestras de tejido de biopsias o porciones en secciones de un órgano o tejido, fracciones subcelulares, células aisladas, incluidas las de seres humanos y extractos de una muestra biológica, incluyendo, pero no limitados a antígenos, anticuerpos, metabolitos, etc. aislados de un fluido biológico. La muestra puede, por tanto, comprender una muestra de fluido, un fluido de una muestra, una muestra fluidizada o una preparación a partir de una muestra quefluido. La muestra puede comprender asimismo organismos acuáticos completos, como algas (por ej. las del género *Tetraselmis*), invertebrados (por ej. los del género *Artemia* o los del género *Caenorhabditis*), o peces (por ej. los del género *Danio*).

- Los términos sinónimos “muestras control” y “controles” se refieren a las muestras de concentración conocida que se cuantifican durante el análisis para corroborar la validez del método.

- El término “oligómero” se refiere a especies moleculares constituidas por unidades repetitivas que tienen un tamaño intermedio entre la unidad básica del monómero que las forma y un polímero, es decir, contiene monómeros en un número finito (denominado grado de oligomerización) y, por tanto, su masa molecular no ha logrado alcanzar un valor tan alto como para ser considerado un polímero.

- El término “one-pot” se refiere a una estrategia para incrementar la eficiencia de procesos químicos, tanto desde el punto de vista económico, como desde el técnico, según el cual dicho proceso se lleva a cabo en un único reactor, mediante adiciones sucesivas de los reactivos, sin etapas intermedias de aislamiento, ni de purificación.

- El término “paciente” se refiere a cualquier ser vivo que padece o puede padecer una enfermedad, caracterizada por una alteración perjudicial, real o potencial, de su estado de salud.

- El término “porfirina” se usa para referirse a un macrociclo heterocíclico formado por cuatro subunidades de pirrol unidas por las caras opuestas (posición□) mediante cuatro puentes metino (=CH-), pudiendo estar mono- o polisustituidas con diversos grupos funcionales (alquilo, alquenilo, carboxilato, sulfonato, fosfato, amino, etc.). A veces

se usan, de modo intercambiable, los términos porfin y porfina, con el mismo significado que el especificado anteriormente.

5 - El término "protocolo" se refiere al documento que establece los objetivos, procedimientos y métodos que se utilizan para realizar un estudio y analizar los datos obtenidos.

- El término "rango" se refiere al intervalo de validez del método analítico, definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del analito, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

10 - El término "reproducibilidad" se refiere a la precisión de un método analítico y expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas con el mismo sistema analítico de medida, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, o analistas.

15 - El término "sensibilidad" se refiere a la capacidad del método para identificar los pocillos donde hay una variación significativa del analito, calculada como la proporción de pocillos con carga biológica que dan positivo en el test:  $\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{[\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}]}$ .

- El término "significativo" se refiere a una expresión estadística que depende del tamaño de la muestra y nos indica la probabilidad de que una serie de resultados obtenidos se hayan debido al azar.

20 - El término "sol" se refiere a una suspensión coloidal de partículas dispersas en un líquido.

25 - El término "sol-gel" se refiere a un proceso de síntesis y fabricación, generalmente en disolución y a una temperatura por debajo de los 100°C, de un material sólido polimérico, preparado mediante la hidrólisis de monómeros de alcóxidos de metales o de metaloides, seleccionados dentro del grupo compuesto por silicio, aluminio, zirconio, titanio, estaño, vanadio, hierro y cualquiera de sus combinaciones, que forman una red porosa con enlaces metal/metaloides y oxígeno, a la que se pueden añadir otros derivados, como el polidimetilsiloxano hidroxil terminado (PDMS), que también contiene una cadena principal de átomos alternos de silicio y de oxígeno, pero con radicales de naturaleza orgánica, con lo que se obtiene una matriz polimérica de naturaleza híbrida (orgánica-inorgánica); de esta forma, en ambos casos, cuando el líquido del poro es removido a presión y temperatura cercana a la ambiental, se produce una contracción de la red y el producto resultante se denomina xerogel.

35 - Los términos sinónimos "sonda molecular fluorogénica", "sonda fluorogénica" y "sensor fluorogénico" se refieren a sistemas que contienen un centro de coordinación unido a una unidad indicadora, que transforma la información química en una señal medible y se caracterizan por su alta sensibilidad y por su elevada especificidad, al reconocer específicamente al analito de interés mediante la selección adecuada de las longitudes de onda de excitación y de emisión.

40 - El término "sustancia bioactiva" se refiere a un compuesto químico o biológico que puede ejercer "una interacción con" o "producir efectos sobre" cualquier ser vivo (animal o vegetal) o alguna de sus partes, produciendo, generalmente, una mejora en su salud y bienestar, o reduciendo un riesgo de enfermedad por inhibición del crecimiento y supervivencia de agentes biológicos patógenos, e incluye términos como antibióticos, antifúngicos, antiprotozoarios, antineoplásicos, mitógenos o antígenos específicos.

- El término "sustituido" se usa para referirse, generalmente, a un átomo de carbono o a un heteroátomo adecuado en el que un átomo de hidrógeno se reemplaza por otro átomo o un grupo químico tal como arilo, ciano, carboxilato, sulfonato, fosfato, amino, (C<sub>1-10</sub>)alquil, nitro, mercapto, (C<sub>1-10</sub>)alquiltio, halo, (C<sub>1-6</sub>)alquilamino, (C<sub>1-6</sub>)dialquilamino, (C<sub>1-6</sub>)alcoxi, tri(C<sub>1-4</sub>)alcoxisilil, amino(C<sub>1-4</sub>)alquiltrialquiloxisilano, etc., y sus posibles combinaciones dentro de la molécula, que le confieren nuevas propiedades físico-químicas, las cuales mejoran las utilidades fundamentales y de novedad de los compuestos, productos o composiciones de la presente invención.

- Los términos sinónimos "tensioactivo no iónico" y "surfactante" se refieren a una serie de compuestos químicos con una estructura polar-no polar, pero con grupos no disociables, que son capaces de disminuir el valor de la tensión superficial de una interfase, como son Triton X-100, Brij 30, Brij 35, Brij 56, Brij 58, Brij 700 y Tween 20.

- El término "validación" se refiere a la evidencia experimental documentada de que un método cumple con el propósito para el que fue diseñado, por comparación o no, con otros métodos establecidos y conocidos en el estado de la técnica.

-El término "xerogel" se refiere al material rígido formado por una red tridimensional interconectada de un óxido inorgánico, habitualmente conteniendo silicio y opcionalmente de un material híbrido que puede ser sintetizado a través de la formación *in situ* de la matriz polimérica con especies orgánicas o inorgánicas, consistente en poros submicrométricos y cadenas poliméricas, que generalmente, usan como monómeros adecuados uno o varios alcóxidos, los cuales mezclados con agua y otros disolventes, son capaces de hidrolizarse para formar grupos intermedios silanol (Si—OH), que se condensan para producir enlaces siloxano (Si—O—Si). Tras un proceso de secado a presión atmosférica, se eliminan los disolventes y subproductos volátiles líquidos, lo que conduce a una contracción del volumen final del material polimérico.

### **Descripción general de la invención**

Es objeto de la presente invención un dispositivo de detección (óptica) de oxígeno y medición de sus variaciones de concentración en una muestra, siendo dicho dispositivo un microsensar químico polimérico (homopolimérico y/o copolimérico), de bajo coste, que comprende:

- un soporte que es una placa de ensayo, también denominada microplaca o placa microtituladora, que presenta una pluralidad de pocillos en forma de receptáculos abiertos por su cara superior y cuyo número varía comúnmente entre 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 ó 3456 pocillos, y de geometría y capacidad de pocillo variables; recubierto de
- una matriz polimérica inerte y estable que comprende un xerogel de estructura porosa, formado por polímeros inorgánicos constituidos por una cadena principal de átomos alternos de silicio y de oxígeno, seleccionados entre una red tridimensional de sílice, desarrollada a partir de monómeros con grupos alcóxido hidrolizables, y/o un polisiloxano, dicha matriz estando depositada en forma de película homogénea sobre la pared interior de los pocillos del soporte, y siendo sensible al oxígeno, según se define en el apartado anterior, gracias a
- una o varias sondas fluorogénicas ancladas a la matriz, solubles en agua y seleccionadas entre derivados de metaloftalocianina y/o metaloporfirina.

Las placas de ensayo son también denominadas en el ámbito de la presente invención "placa de pocillos", "placa microtituladora", "placa de microtitulación" o "microplaca", refiriéndose todos estos términos a una placa que puede estar fabricada a partir de diversos materiales rígidos, típicamente vidrio o plástico (poliestireno, policarbonato,

polipropileno, polivinilcloruro, politetrafluoretileno, polietileno, polímeros de ciclo-olefina, o similares) y que presenta múltiples pocillos, normalmente 6, 12, 24, 96, 384, 1536 o incluso 3456, dispuestos en una matriz rectangular de formato 2:3, que se utilizan rutinariamente en el laboratorio para aplicaciones de investigación, descubrimiento de fármacos, validación de ensayos, controles de calidad y monitorización de diversos procesos biológicos, entre otras. En estas microplacas tienen lugar reacciones biológicas y químicas entre los agentes biológicos que se encuentran inmovilizados sobre el sustrato de la placa, o dispersos en el medio biológico, y los analitos producidos o consumidos en la matriz biológica que contiene dicha placa. Los pocillos pueden presentar distinta geometría en su base, y están dispuestos en un patrón geométrico que simplifica la organización y realización de operaciones. Por ello, es importante destacar que el dispositivo objeto de la presente invención puede presentar diversas formas, geometrías, capacidades, materiales de fabricación, espesores de la película sensora depositada, etc., para poder adaptarse a las especificaciones técnicas necesarias en cada estudio bioquímico, en el que sean usadas y para el que sean específicamente diseñadas.

Al seleccionar la microplaca, el experto debe adecuar por una parte los materiales de los que está fabricada (poliestireno, policarbonato, polipropileno, polivinil-cloruro, polietileno, politetrafluoretileno, polímeros de ciclo-olefina, o similares y en colores adecuados a cada estudio transparente, blanco y, preferentemente, negro), por otra la geometría y capacidad del pocillo (fondo en forma de C, F, U o V y capacidad desde 10 microlitos a 16 mililitros) y finalmente el formato idóneo, en función del experimento, cantidad de material biológico, medios manuales, semiautomáticos o automáticos, con 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 y 3456 pocillos todo ello sin necesidad de la adición de reactivos suplementarios, complejas manipulaciones o largos períodos de incubación requeridos en otras metodologías, lo que supone una clara ventaja técnica frente a los actuales sistemas comercializados.

Por su parte, la sonda molecular fluorogénica, también conocida como “fluoróforo” o “generador de señal fluorescente” es el término que denomina comúnmente una molécula que, en base a sus propiedades fluorescentes, es capaz de convertir una determinada señal o estímulo químico exterior, en otra señal o respuesta macroscópica específica medible y puede presentar estructuras químicas diversas, tales como productos naturales (triptófano), compuestos monocíclicos (piridoxal fosfato), bicíclicos (cloruro de dansilo), tricíclicos (fluoresceína, rodamina B, BODIPY) y policíclicos (fenantrolinas, porfirinas y ftalocianinas). Algunas de estas sondas conocidas son solubles en agua, pero lógicamente dicha solubilidad varía y depende en mayor o menor medida del grupo funcional, su número y su distribución en la periferia de la molécula.

Los (micro)sensores descritos en su forma esencial actúan como dispositivos miniaturizados de alto rendimiento basados en procesos de transducción óptica, para lo que se utilizan materiales poliméricos en forma de xerogel para configurar la película que recubre la placa de ensayo que contiene una cadena principal de átomos alternos de silicio y de oxígeno, pudiendo contener otros grupos orgánicos funcionales, que preferentemente es obtenido mediante tecnología sol-gel, al cual se le añade un aditivo sensible al oxígeno como es la sonda molecular fluorogénica. De este modo, el conjunto matriz polimérica/aditivo sensible al oxígeno (sonda) es capaz de medir cinéticas, ultrarrápidas, rápidas o lentas, de la concentración de oxígeno presente en una matriz biológica, como puede ser agua, disoluciones salinas, medios de cultivo, suero, sangre, orina y otros definidos en el apartado anterior. La sonda fluorogénica permite medir variaciones en la concentración del analito, al convertir una determinada señal o estímulo químico exterior, más concretamente la concentración de oxígeno disuelto, en otra señal

o respuesta macroscópica específica medible, más concretamente una señal fluorescente.

5 La película homogénea químicamente inerte y estable que recubre la placa es convenientemente una matriz polimérica de un material biocompatible, concretamente con una estructura basada en silicio, ya que las microestructuras de dicho material pueden ser fácilmente desarrolladas utilizando diferentes técnicas de fabricación tal como se describen en la presente memoria. De esta forma, se produce una situación ideal en cuanto a la fijación de las sondas a la película o matriz polimérica que recubre la placa: se forman enlaces fuertes entre la sonda y la matriz derivada de silicio. Así, teniendo en cuenta que la sensibilidad del microsensor óptico de oxígeno depende de la capacidad para que el oxígeno alcance a la molécula que actúa como transductor, lo que viene determinado por la permeabilidad de la matriz encapsuladora hacia el oxígeno, el dispositivo propuesto permite la difusión y contacto físico adecuado para que se produzca el “*quenching*” de la sonda.

15 La introducción en la matriz polimérica de sondas moleculares fluorogénicas, portadoras de grupos polares mediante los cuales se anclan a los grupos funcionales existentes en el polímero de la matriz, creados por hidrólisis de cada grupo alcoxilo (entendido como cualquier radical orgánico derivado de un alcohol por pérdida del hidrógeno hidroxílico, según se define en el apartado anterior) presente en los monómeros usados, mostraron una alta resistencia frente a los fenómenos de lixiviación por el medio líquido sujeto a estudio, adecuada para evitar su disolución en dicho medio y, por consiguiente, minimizar los posibles efectos nocivos de la sonda que se comentan en el apartado relativo al estado de la técnica. De este modo, los enlaces fuertes que se forman entre los grupos polares de la sonda y los grupos funcionales de la matriz mantienen dicha sonda unida a la película de tal forma que se reduce su citotoxicidad (ya que está probado que estas sondas son citotóxicas cuando se adicionan sin anclaje, por ejemplo en disolución al medio biológico dentro de una placa), y lo que no es menos importante: mantiene constante la concentración de sonda fluorogénica en el tiempo. Esta inmovilización de las sondas de interés aquí descritas, que como se verá más adelante se incrementa cuando la matriz polimérica se obtiene mediante un proceso sol-gel, no disminuyen su fluorescencia, lo que se explicaría postulando la posible reacción de los grupos periféricos (Trytek M. y cols., *Biomimetic Based Applications*, 2011, Prof. Marko Cvrak (Ed.); Trytek M. y cols., *J. Catalysis*, 2012, 286, 193-205), como en el presente caso serían los grupos polares presentes en la sonda, tal como los carboxilatos, con los restos silanol de la matriz, formando enlaces covalentes.

40 Los poros de la matriz polimérica depositada sobre la placa en forma de película juegan un papel esencial en el proceso de medida e interacción entre la sonda molecular fluorogénica y el medio en el que se producen los fenómenos biológicos sujetos del estudio (García-Sánchez, M.A. y cols., *J. Non-Crystalline Solids* 2009, 355(2), 120-125) y por ende, resulta esencial el control de muchas de las variables que intervienen en la hidrólisis y la condensación durante el proceso de sol-gel, para lograr un equilibrio adecuado entre la no lixiviación de la sonda adsorbida en la matriz y su accesibilidad a los reactivos. La configuración de la matriz polimérica permite las siguientes ventajas a) que el oxígeno que contiene el disolvente o disolventes se difunda a través de los poros, ya que estos son lo suficientemente amplios para permitir su paso, o el de la disolución que lo contiene; b) retener la sonda por anclaje y evitar su liberación al medio; c) que la película formada sea homogénea a nivel macroscópico, estando además los poros interconectados entre sí y con el exterior; y d) dejar salir los disolventes en la etapa de secado (y las sustancias bioactivas durante el ensayo cuando el microsensor las comprenda, como se verá más adelante).



Dichos sensores ópticos de atenuación de la fluorescencia muestran una serie de ventajas técnicas sobre otros métodos conocidos de medida de la concentración de oxígeno disuelto, entre las que se pueden destacar aquellas que se refieren a la mínima cantidad de trabajo de mantenimiento necesario y a la calidad de los valores medidos; en este sentido, hay que subrayar que la sensibilidad del efecto de la medición (cambio de la duración de la luminiscencia/cambio de la concentración de oxígeno) aumenta a medida que la concentración de oxígeno disminuye; de ahí que el principio de medición ofrezca una resolución sumamente buena incluso en el rango bajo de medida, con amplios límites de detección y de cuantificación.

También es objeto de la presente invención el procedimiento de fabricación del microsensor aquí descrito que, aunque apoyado en las técnicas genéricas de sol-gel para la preparación de la película o matriz polimérica que recubre la placa, incluye ciertas modificaciones esenciales que permiten conseguir mejoras tanto en las propiedades genéricas (resistencia química y mecánica, prevención de su degradación ambiental, tamaño adecuado de poro, etc.) como en las propiedades específicas para su uso como microsensores en este tipo de dispositivos (formación de enlaces fuertes con la sonda, capacidad de adsorción y de liberación selectiva y controlada de las sustancias bioactivas añadidas, biocompatibilidad con las matrices biológicas sujetas a estudio, etc.), dicho proceso estando caracterizado por obtener una matriz polimérica de estructura porosa formada por cadenas de átomos alternos de silicio y de oxígeno seleccionadas entre sílice y polisiloxanos a partir de un proceso sol-gel, que comprende las siguientes etapas:

(a) formar un sol precursor de compuestos de silicio seleccionados entre un polisiloxano y/o sílice, a partir de la mezcla de al menos un monómero consistente en al menos un alcóxido de silicio de fórmula

$$\text{Si}(\text{OR})_n(\text{R}')_{4-n},$$

donde n varía entre 2 y 4; R es un alquilo, tal como se define en el apartado anterior, y cada R' es seleccionado independientemente entre alquilo o alqueno, tal como se definen en el apartado anterior, junto a una proporción comprendida entre 2 y 30 moles de agua por mol de alcóxido; dicha agua siendo usada como reactivo de hidrólisis, junto a un catalizador promotor de la reacción que es un ácido orgánico, un ácido inorgánico o una base en una razón molar catalizador:alcóxido comprendida entre 0,00001:99,99999 y 0,0001:99,9999;

(b) adicionar al sol precursor resultante de la etapa (a) al menos un aditivo sensible al oxígeno que consiste en la sonda molecular fluorogénica antes descrita, en una razón molar sonda:alcóxido entre 0,00001:99,99999 y 0,001:99,9999;

(c) depositar una película del sol precursor obtenido en la etapa (b) sobre la superficie interior de los pocillos de la microplaca que hace de soporte de forma homogénea, en un volumen comprendido entre el 0,25% y el 25% del volumen total del pocillo a recubrir;

(d) gelificar el sol precursor resultante de la etapa (c) mediante policondensación del alcóxido a una temperatura comprendida entre 15°C y 70°C durante un tiempo comprendido entre 1 y 72 horas, dando lugar a una matriz porosa de xerogel, la cual se somete a

(e) sinéresis o envejecimiento para evaporar el medio de disolución del sol precursor, mediante procesos conocidos en el estado de la técnica como de curado y secado, durante un período de 2 a 5 días.

El término “xerogel” se refiere al material rígido formado por una red tridimensional interconectada formada por cadenas de átomos alternos de silicio y de oxígeno, y, opcionalmente, de un material híbrido que puede ser sintetizado a través de la formación *in situ* de la matriz polimérica con especies orgánicas o inorgánicas, consistente en poros submicrométricos y cadenas poliméricas, que generalmente, usan como monómeros adecuados uno o varios alcóxidos, los cuales mezclados con agua y otros disolventes, establecidos y conocidos en el estado de la técnica, son capaces de hidrolizarse para formar grupos intermedios silanol (Si—OH), que se condensan para producir enlaces siloxano (Si—O—Si). Tras un proceso de secado a presión atmosférica, se eliminan los disolventes y subproductos volátiles líquidos, lo que conduce a una contracción del volumen final del material polimérico, resultando una humedad típicamente de menos de un 1% en peso de la composición total de polímero y preferiblemente menos de un 0,1% en peso.

La técnica de sol-gel se utiliza comúnmente para la fabricación de óxidos de metales y metaloides a partir de una suspensión estable en un medio líquido (normalmente acuoso o hidroalcohólico), de partículas sólidas coloidales entre 2 y 200 nanómetros, con unos 103-109 átomos por partícula, la cual, a través de una serie de reacciones químicas, actúa como precursora de un gel tridimensional formado por interconexión de partículas sólidas en el medio líquido; dicho gel tiene la propiedad de crear una película con la forma deseada al depositarse sobre la superficie a recubrir, formándose una red porosa de partículas o polímeros discretos, todo ello dependiendo de las condiciones de reacción (pH, proporción de agua, temperatura, etc.). Dicha red está formada por micro-, meso- y macroporos, con tamaños que van desde los 17 hasta los 3000 ångströms. Por lo tanto, no sólo es posible el alojamiento físico de las metalofteralocianinas y metaloporfirinas empleadas como sondas moleculares fluorogénicas (incluso de sus agregados H y J), lo que favorece la interacción entre el analito y la sonda, sino también su posible lixiviación desde la matriz silícea hacia la disolución en la que se lleva a cabo el experimento.

El empleo de una estrategia de síntesis “*one-pot*” se mostró aquí técnica y económicamente más factible que los demás procesos secuenciales ya conocidos de formación de enlaces fuertes, como son los enlaces covalentes, haciendo uso de las propiedades que presentan algunas porfirinas sustituidas con grupos cargados en la periferia del anillo de porfirina, tales como ácidos carboxílicos y sulfónicos, los cuales les otorgan, por una parte, una solubilidad en agua que permita obtener disoluciones acuosas con una concentración de, al menos, 10 micromolar (evitando el empleo de disolventes orgánicos como, el cloroformo o la N,N-dimetilformamida, incompatibles con la mayoría de plásticos) y, por otra, les confieren una reactividad y características electrostáticas capaces de anclarse de forma más potente en la matriz porosa del xerogel, evitando de ese modo la desorción de la sonda molecular fluorescente a lo largo del proceso biológico estudiado.

En definitiva, el proceso de fabricación de dispositivos objeto de la presente invención se aprovecha de las propiedades de la sílice amorfa, la cual conjuga una excelente estabilidad química con unas buenas propiedades mecánicas y de resistencia al desgaste, conjuntamente con una gran capacidad de adsorción sobre su superficie porosa de numerosas moléculas, mediante atracciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o enlaces covalentes con algunos de los grupos reactivos que presenta en su superficie, lo que la convierte en el material de elección para el recubrimiento de diferentes tipos de componentes, tanto plásticos como metálicos.

Además, a diferencia de otras sustancias de naturaleza cerámica, en las que resulta muy difícil su deposición utilizando procesos físicos y sin emplear temperaturas que superen el

punto de fusión de los sustratos a recubrir, se pueden usar procesos sol-gel que consisten en el uso de una vía química para la deposición del recubrimiento de modo homogéneo y usando en todo momento temperaturas de procesamiento inferiores a los puntos de fusión de la mayoría de los plásticos de interés estructural y de las temperaturas de descomposición de un gran número de moléculas orgánicas. A ello, habría que unir la ventaja de los procesos sol-gel, para tener bajo control, en función de los materiales y condiciones del proceso de fabricación, posibles modificaciones de las propiedades estructurales, texturales, electrónicas y morfológicas en la microestructura de la capa depositada, modificando, en función de nuestras necesidades técnicas, su inercia o su reactividad, su resistencia al choque térmico o su capacidad para la retención por adsorción sobre su superficie de moléculas de interés, etc.

La presente invención se dirige también a los múltiples usos de los microsensors descritos, que además permiten la adición de sustancias bioactivas tales como antibióticos, antifúngicos, antiprotozoarios, antineoplásicos, mitógenos, antígenos específicos, etc., ofreciendo múltiples usos en aplicaciones ópticas útiles en ensayos relacionados con la proliferación celular de eucariotas (tal como el test de transformación linfoblástica) y procariotas (tal como antibiogramas para la selección de antimicrobianos en estudios de susceptibilidad *in vitro*), en la citotoxicidad y senescencia celular y en procesos ligados a la cadena de respiración mitocondrial. Los microsensors son aptos en general para aquellas operaciones del laboratorio bioquímico que requieren el manejo de múltiples muestras de pequeño volumen, por ejemplo, técnicas inmunológicas o ensayos basados en células, como los mencionados aquí entre otras aplicaciones, y puede además contener y liberar de forma controlada sustancias bioactivas.

### **Breve descripción de las Figuras**

Figura 1. Detección y medida en el tiempo del crecimiento de células *E. coli* en los pocillos del microsensor preparado según el Ejemplo 1, con 0,002 ml/pocillo, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 5, con diferentes diluciones: ● (sin células), ■ (dilución 1/1024), ▲ (dilución 1/254), ▼ (dilución 1/64), ◆ (dilución 1/16), ● (dilución 1/4), ■ (sin dilución). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 2. Detección y medida en el tiempo del crecimiento de células *E. coli* en los pocillos del microsensor preparado según el Ejemplo 1, con 0,005 ml/pocillo, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 6, con diferentes diluciones: ● (sin células), ■ (dilución 1/1024), ▲ (dilución 1/254), ▼ (dilución 1/64), ◆ (dilución 1/16), ● (dilución 1/4), ■ (sin dilución). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 3. Detección y medida en el tiempo del crecimiento de células *E. coli* en los pocillos del microsensor preparado según el Ejemplo 1, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 7, con diferentes diluciones: ● (sin células), ■ (dilución 1/1024), ▲ (dilución 1/254), ▼ (dilución 1/64), ◆ (dilución 1/16), ● (dilución 1/4), ■ (sin dilución). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 4. Detección y medida en el tiempo del crecimiento de células *E. coli* en los pocillos del microsensor preparado según el Ejemplo 2 con antibióticos como sustancias bioactivas, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 8: ● (sin células), ■ (sin células+antibióticos), ▲ (con células a dilución 1/16), ▼ (con células a dilución 1/16+antibióticos). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 5. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 9: ● (dilución 1:4 con vehículo), ■ (dilución 1:4 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 6. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 10: ● (dilución 1:5 con vehículo), ■ (dilución 1:5 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 7. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 11: ● (dilución 1:8 con vehículo), ■ (dilución 1:8 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 8. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 12: ● (dilución 1:10 con vehículo), ■ (dilución 1:10 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 9. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 13: ● (dilución 1:20 con vehículo), ■ (dilución 1:20 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 10. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 14: ● (dilución 1:30 con vehículo), ■ (dilución 1:30 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 11. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 15: ● (dilución 1:40 con vehículo), ■ (dilución 1:40 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 12. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra in vitro de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 16: ● (dilución 1:50 con vehículo), ■ (dilución 1:50 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 13. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra *in vitro* de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 17: ● (dilución 1:100 con vehículo), ■ (dilución 1:100 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 14. Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra *in vitro* de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 18: ● (dilución 1:200 con vehículo), ■ (dilución 1:200 con vehículo+fitohemaglutinina). La gráfica muestra el valor medio de medida de cuatro pocillos de la misma placa.

Figura 15. Detección y medida en el tiempo de la citotoxicidad en una muestra *in vitro* de células humanas THLE-2 extraídas de tejidos y depositadas en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 19. La gráfica muestra el valor medio de medida y su desviación típica de seis pocillos de la misma placa.

Figura 16: Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra *in vitro* de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 20. La gráfica muestra el valor medio de medida y su desviación típica de cuatro pocillos de la misma placa, con vehículo y con fitohemaglutinina (PHA), medidos con su tapa, sin adición de aceite mineral.

Figura 17: Detección y medida en el tiempo de la linfoproliferación en una muestra *in vitro* de sangre humana depositada en los pocillos del microsensor preparado según la presente invención, en función del consumo de oxígeno medido, tal como se describe en el Ejemplo 20. La gráfica muestra el valor medio de medida y su desviación típica de cuatro pocillos de la misma placa, con vehículo y con fitohemaglutinina (PHA), medidos con su tapa y con adición de 0,1 ml de aceite mineral.

### **Descripción detallada de la invención**

El dispositivo descrito anteriormente puede presentar diversas formas, geometrías, capacidades, materiales de fabricación, espesores de la película sensora depositada, número de capas de películas sensoras y reflectantes, etc., para poder adaptarse a las especificaciones técnicas necesarias en cada estudio bioquímico, en el que sean usadas y para el que puedan ser específicamente diseñadas.

Cada pocillo en el que se deposita la película sensora (que es la matriz polimérica con las sondas fluorogénicas ancladas, tal como se describe más arriba) está constituido por un receptáculo cuyas paredes y fondo son aptos y adecuados para el experimento *in vitro* de laboratorio a realizar. Son especialmente y preferentemente adecuados los pocillos en los que las paredes son opacas, de color negro y el fondo es plano y transparente y dentro de estos, más preferentemente, los denominados con forma de F, que son útiles para mediciones ópticas precisas, tales como las determinaciones fluorimétricas y colorimétricas y para cultivos celulares. Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de pocillos con fondo plano con la película sensora depositada, que permiten que sobre los mismos puedan inmovilizarse o adherirse sustratos biológicos, permitiendo su uso en ensayos en los que se use material biológico anclado o adherido al fondo plano o base del pocillo, así como para ensayos en los que el material biológico y/o los analitos se encuentran en disolución y/o en suspensión.

Se debe observar que sin apartarse de la invención, la placa sobre la que se deposita la película de xerogel puede ser elegida entre materiales inorgánicos que incluyen, sin limitarlos, vidrio y cuarzo, o entre materiales orgánicos tales como por ejemplo polímeros que pueden incluir, pero no limitarse a, poliestireno, policarbonato, polipropileno, polivinilcloruro, politetrafluoretileno, polietileno, polímeros de ciclo-olefina, o similares.

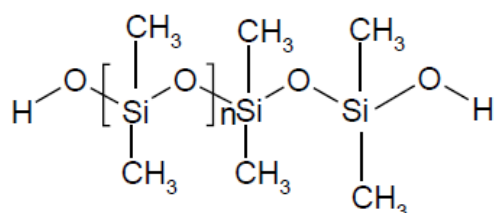
5

Aparte del silicio, la matriz polimérica puede incluir en su estructura otros átomos diferentes como son preferentemente metales o metaloides seleccionados del grupo compuesto por aluminio, zirconio, titanio, estaño, vanadio, hierro y cualquiera de sus combinaciones. Normalmente, en estos casos el polímero se forma a partir de alcóxidos de estos metales y/o metaloides, que se encuentran rodeados por varios ligandos reactivos que presentan una alta reactividad hacia el agua, seleccionados preferiblemente entre los alcóxidos metálicos, tales como los de aluminio y de titanio, y los alcóxidos no metálicos como son los alcoxilanos, con grupos alcoxilo elegidos preferiblemente entre metoxi, etoxi, propoxi, butoxi u otros grupos alcoxilo de cadena larga, más preferiblemente el tetrametoxisilano y el tetraetoxisilano.

10

15

Entre los polisiloxanos más preferidos para formar parte de la estructura del polímero de la matriz, se encuentra el polidimetilsiloxano hidroxilado terminado de fórmula I



I

que es un compuesto también formado por cadenas de átomos alternos de silicio y de oxígeno pero con radicales de naturaleza orgánica, donde n describe el grado de oligomerización, el cual indica el número de unidades de silicio por molécula de oligómero; de esta forma, se obtienen matrices inertes estables de un xerogel que es de naturaleza híbrida (orgánica-inorgánica) en cuanto a sus radicales.

20

En definitiva, existen tres tipos de matriz polimérica que puede contener el dispositivo sensor y que son de especial interés: una matriz polimérica totalmente inorgánica (de silanos "puros" como precursores), con lo que se forma una película de dióxido de silicio "puro" (es decir, es una película de matriz polimérica cuya estructura está compuesta 100% de sílice); una segunda matriz polimérica, de naturaleza híbrida orgánica-inorgánica, cuya estructura, del tipo de las conocidas como materiales híbridos, contiene de forma combinada sílice y polisiloxanos, como es preferiblemente el polidimetilsiloxano hidroxilado-terminado de fórmula I y que puede aparecer muy preferiblemente entre un 10% y un 99% del total de matriz. Y dado que es posible que el polisiloxano, como es el polidimetilsiloxano hidroxilado-terminado de fórmula I aparezca hasta en un 100% del total del peso de la matriz polimérica, entonces esta matriz también puede ser de polisiloxano "pura", es decir, una matriz porosa formada por cadenas de átomos alternos de silicio y de oxígeno pero con radicales de naturaleza orgánica, con grupos orgánicos, también unidos a los átomos de metal o metaloide, preferiblemente a los átomos de silicio que componen dicha cadena de átomos alternos de silicio y de oxígeno.

25

30

35

Por su parte, cuando la sonda molecular fluorogénica es una porfirina metalada, ésta puede seleccionarse dentro del grupo compuesto por hematoporfirina, coproporfirina, uroporfirina, clorofilina, sulfonatoporfirinas y todos sus isómeros posicionales; hidroxifenil porfirinas y todos sus isómeros posicionales; carboxifenil porfirinas y todos sus isómeros

posicionales; sulfonatofenil porfirinas y todos sus isómeros posicionales; y fosfatofenil porfirinas y todos sus isómeros posicionales; y cualquier combinación de los mismas. Cuando dicha sonda es una metalofteralocianina, ésta puede seleccionarse dentro del grupo compuesto por sulfonatofteralocianinas, carboxiofteralocianinas y cualquier combinación de las mismas. En el caso más preferido, la sonda fluorogénica es al menos una metaloporfirina que comprende un ciclo nitrogenado central conteniendo un átomo o ión metálico elegido preferentemente del grupo que consiste en paladio, platino y rutenio, sustituido en su periferia con uno, dos, tres o cuatro grupos del tipo carboxilato. Más preferentemente todavía, la sonda es la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II). En el caso más preferido de todos, la sonda 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II) está presente en la matriz polimérica en una proporción comprendida entre el 10% y el 100% en peso del total de la mezcla de metaloporfirinas y/o metalofteralocianinas presentes en el dispositivo; es decir, la sonda 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II) puede estar presente en al menos un 10% en peso del total de sonda presente, combinada con otras sondas, o puede llegar a ser la única presente.

Adicionalmente, en un caso muy preferido los polímeros que constituyen la matriz o película del microsensado pueden contener una o varias sustancias bioactivas adsorbidas sobre la superficie porosa del xerogel que, mediante un proceso de desorción paulatina y lixiviación, se va liberando lentamente desde el xerogel que lo contiene hacia la matriz biológica sujeto del estudio. Estas sustancias bioactivas pueden ser antibióticos, antifúngicos, antiprotozoarios, antineoplásicos, mitógenos o antígenos específicos, etc., o cualquiera de sus combinaciones de modo que las placas o microplacas pueden ser apropiadas para todo tipo de estudios *in vitro* y *ex-vivo* de quimiosensibilidad relacionados con la proliferación celular de eucariotas (por ejemplo, el test de transformación linfoblástica) y procariotas (por ejemplo, antibiogramas para la selección de antimicrobianos en estudios de susceptibilidad *in vitro*), la citotoxicidad y la cadena de respiración mitocondrial, tanto de punto final, como de tiempo real, mediante el uso de un lector de placas/microplacas capaz de medir la fluorescencia o fluorescencia en tiempo resuelto, tanto en modo de lectura inferior como superior, adecuando, por una parte la geometría y capacidad del pocillo y, por otra, el formato en 6, 12, 24, 48 ó 96 pocillos (útiles para análisis estándar de inmunología y cultivos celulares), o en formato de 384, 1536 y 3456 pocillos (necesarias para estudios miniaturizados de alta capacidad), todo ello sin necesidad de la adición de reactivos suplementarios, complejas manipulaciones o largos períodos de incubación requeridos en otras metodologías, lo que supone una clara ventaja técnica frente a los actuales sistemas comercializados.

Dado que una sustancia bioactiva, como es un fármaco disuelto, embebido o adsorbido sobre los poros de un polímero sólido, tiende a difundirse hacia su superficie, liberándose de forma continua en el medio líquido que lo rodea, el dispositivo propuesto presenta diversas ventajas desde el punto de vista de la biodisponibilidad (Sáez, V., Hernández E. y Sanz-Angulo, L.; *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2004, 5(1), 55-70), como serían: la protección de sustancias bioactivas susceptibles de degradación en disolución, una mayor eficacia en el aprovechamiento de la sustancia bioactiva y, por tanto, con un coste inferior, lo que resulta importante cuando se trata de un agente activo de alto precio, etc. La cinética de liberación de la sustancia bioactiva viene determinada por sus propiedades físicas, particularmente por su peso molecular y su coeficiente de reparto entre la matriz polimérica y el medio biológico acuoso contenido en el pocillo, junto a otras características particulares como las propiedades físicas de la matriz y su geometría y, en último término, por la cantidad de fármaco incorporado. La cantidad de sustancia bioactiva liberada y la velocidad de liberación desde el film polimérico es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (Roseman, T. y Higuchi, W.I., *J. Pharm. Sci.*, 1970, **59**, 353) y su velocidad de difusión depende de diversos factores como son el área superficial y de la

densidad de la membrana, así como de la solubilidad y del coeficiente de difusión de la sustancia bioactiva, aunque, si hay suficiente fármaco para mantener una concentración interna mayor que la del medio externo, la velocidad de difusión del fármaco a través de la membrana se mantiene constante (Sáez, V., Hernáez E. y Sanz-Angulo, L.; *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2002, 3(3), 1-20).

Sus aplicaciones y ventajas frente a los sensores actualmente conocidos en el estado de la técnica para la monitorización de estudios metabólicos relacionados con la proliferación y quimiosensibilidad celular de eucariotas y procariotas, con la citotoxicidad y senescencia celular y con la cadena de respiración mitocondrial, se basan en la distinta afinidad por la matriz, entre la sonda molecular fluorescente (una metalofalocianina y/o una metaloporfirina sustituida con al menos un grupo polar del tipo fenol, carboxilato, sulfonato y/o fosfato, incluyendo todos sus isómeros posicionales) y la sustancia bioactiva a utilizar en el ensayo (preferentemente antibióticos, antifúngicos, antiprotzoarios, antineoplásicos, mitógenos, antígenos específicos y sus posibles combinaciones).

Preferentemente, la cantidad de sustancia bioactiva en el microsensor está comprendida entre el 0,001% y el 50% en peso respecto del peso total de la película depositada de xerogel.

En una realización particular de la invención, el dispositivo comprende en su composición al menos una segunda película o matriz polimérica que contiene un material inerte adecuado para reflejar y dispersar la luz emitida por la sonda. Este material inerte es preferiblemente un óxido metálico como dióxido de estaño, óxido de zinc, dióxido de titanio o sus mezclas, más preferiblemente el dióxido de titanio, para aprovechar las propiedades que presentan estos óxidos para reflejar y dispersar ("scattering") la luz. Esta segunda película, colocada por debajo de la película sensora (es decir, depositada en primer lugar directamente sobre la placa de ensayo, y antes que la primera matriz que es depositada en forma de capa posteriormente), actúa como una capa reflectora de la luz emitida por la sonda, de modo que, cuando actúa dicha película que contiene el óxido metálico elegido se incrementa la intensidad de la luminiscencia emitida por la película principal sensora (que contiene la sonda fluorogénica), al proceder a la lectura superior de la emisión fluorescente. Del mismo modo, en los dispositivos de lectura inferior, cuando la capa inerte de óxido metálico se coloca por encima del xerogel sensor, se puede conseguir que la capa óxido metálico refleje la emisión de energía radiante, impidiendo la pérdida de luz, dando lugar a un aumento de la sensibilidad del dispositivo.

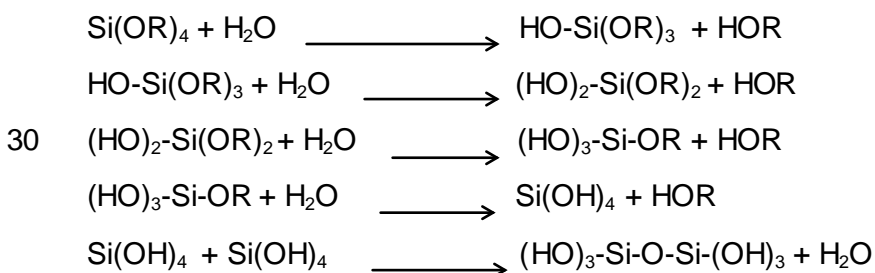
En cuanto al proceso sol-gel de preparación de los dispositivos objeto de patente, dicho proceso es bien conocido por cualquier experto en la materia, que puede llevarlo a cabo usando únicamente métodos rutinarios de experimentación, usando al menos un alcóxido de silicio en presencia de agua como reactivo de hidrólisis y catalizadores adecuados, preferiblemente ácidos. La cantidad de agua puede variar desde 1 hasta 30 moles por mol de alcóxido, siendo preferiblemente entre 2 y 4 moles de agua por mol de alcóxido, y la cantidad de catalizador típicamente añadido a la mezcla de reacción varía desde 1 a 0,0000001 moles por mol de alcóxido, preferiblemente entre 0,000001 y 0,0001 moles de catalizador por mol de alcóxido, todo ello a una temperatura típicamente comprendida entre los 15°C hasta los 70°C, preferentemente entre 20°C y 40°C, durante un periodo de reacción que puede variar entre 1 hora y 4 días, hasta que la reacción se completa. En una realización preferida, la mezcla de alcóxido y agua se realiza en un medio de disolución seleccionado entre un alcohol, un hexano y un éter cíclico para llevar a cabo la reacción en un medio homogéneo; más preferentemente todavía se emplean entre 2 y 20 moles adicionales de este medio, como cosolvente. Durante la etapa a) de mezcla de los componentes se puede añadir opcionalmente un agente de secado y retardo, preferiblemente n-butanol en una razón molar de alcóxido/medio de disolución



(preferiblemente agua)/butanol de 1/1-30/>4. Tras haber incorporado las sondas fluorogénicas, en la etapa b), la suspensión (sol) se distribuye mediante deposición en los pocillos de la microplaca en cantidades que pueden variar en función del volumen del pocillo y de la película sensora que se quiere depositar, preferiblemente volúmenes de la disolución precursora (sol) que van desde, el 0,25% y el 25% del volumen total del pocillo a recubrir (más preferiblemente entre 0,5% y 20%) y, más preferiblemente, desde 0,001 mililitro, hasta 0,020 mililitros en cada pocillo de las placas de 96 pocillos (y manteniéndose esta proporción en función del número de pocillos que integran la placa), tras lo cual se produce una evolución de la red sólida y el secado del disolvente hidroalcohólico, junto con todos los volátiles producidos en el proceso, con una velocidad apropiada para conseguir un gel, en forma de sólido o semisólido con una porosidad idónea que permita la posterior liberación de la sustancia bioactiva a los fines para los que se prepara, preferiblemente entre 1 y 20 días y más preferiblemente entre 3 y 7 días.

El proceso sol-gel se inicia con la mezcla de precursores, catalizadores y medios de reacción, en disolución y en sus primeras etapas forman dispersiones coloidales (sol) que posteriormente gelifican. Este proceso depende de la velocidad de formación de los componentes actuando como precursores del gel y se basa en la hidrólisis de los alcóxidos anteriormente definidos que contiene el monómero precursor y la policondensación de los productos de dicha hidrólisis.

La hidrólisis del alcóxido o de la mezcla de varios alcóxidos, usualmente se lleva a cabo en una disolución de agua con un segundo cosolvente, lo que permite generar una estructura polimérica, mediante un mecanismo simple de hidrólisis-policondensación, preferentemente en presencia de ácidos, tanto inorgánicos (que son más preferidos, como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, etc.) como orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido cítrico ácido oxálico, etc.) o bases, actuando éstos como catalizadores de dicha reacción, y que, a título ilustrativo y nunca limitativo del alcance de la presente invención, se esquematiza a continuación:



En el caso de llevar a cabo la hidrólisis de la mezcla de dos o más alcóxidos, se puede formar un alcóxido doble antes de producirse la hidrólisis, lo que, generalmente, da lugar a un compuesto más estable que los alcóxidos por separado y, por tanto, se deben observar tiempos de hidrólisis más largos. Del mismo modo, uno o varios de los radicales alcóxilo (entendido como cualquier radical orgánico derivado de un alcohol por pérdida del hidrógeno hidroxílico), representados en el esquema anterior como -OR, donde R es un grupo alquilo según se definió anteriormente, pueden ser sustituidos por otro tipo de radical, preferentemente un alcóxilo sustituido ramificado o no, un arilo sustituido o no, un alquilo sustituido o no, o un alquenilo sustituido o no.

La reacción de hidrólisis-condensación entre los alcóxidos en la etapa a) de mezcla conduce a una disolución homogénea, lo que conlleva, a escala molecular, a una distribución homogénea de varias partículas y por tanto una distribución estequiométrica homogénea final.

Consecuentemente, para la obtención de un óxido policristalino es necesaria una polimerización lenta de una solución de alcóxido con trazas de agua disuelta en un cosolvente, como es un alcohol, lo que supone una hidrólisis lenta, para que el gel se forme por una reacción de dos etapas: una de hidrólisis y una posterior de policondensación, aprovechando que en general los alcóxidos usados son muy sensibles a la humedad, por lo que la hidrólisis para la formación del gel se puede llevar a cabo usando un cosolvente, que es seleccionado entre un alcohol (preferentemente metanol, etanol, propanol), un hexano (preferentemente ciclohexano) o un éter cíclico que es preferentemente tetrahidrofurano o dioxano, en una proporción que varía entre 1 y 20 moles de disolvente por mol de alcóxido, que se sumarían a los moles de agua.

En cuanto a la etapa concreta de aplicación de la disolución sol-gel sobre la placa de ensayo de la etapa (c), puede elegirse a voluntad entre recubrimiento por centrifugación ("*spin-coating*"), recubrimiento por inmersión ("*dip coating*"), o cualquier otro adecuado a las características de los materiales usados y más preferiblemente por centrifugación, a una velocidad de rotación de entre 300 y 2000 rpm, durante un tiempo que puede variar desde 1 minuto a 1 hora, pudiendo usarse otras velocidades y tiempos de centrifugación para controlar la calidad y el espesor de capa deseado.

Las condiciones del proceso de gelación o gelificación del sol previamente formado influyen en la estructura, en el volumen y el tamaño de poro de gel, por lo que estas propiedades dependen de factores como la razón agua/alcóxido, pH, concentración y naturaleza química de los alcóxidos, siendo las condiciones generales más adecuadas las que se han indicado en el apartado anterior y tal como se ilustran más concretamente en los ejemplos, a título ilustrativo y nunca limitativo del alcance de la invención.

El proceso de formación de geles y su deposición sobre la microplaca descrito de forma esencial en el anterior apartado de la presente memoria conlleva así las siguientes etapas:

a) Etapa de mezclado: consiste en la incorporación de los monómeros elegidos, cuya mezcla dará lugar a la estructura de la matriz polimérica, formada por cadenas de átomos alternos de silicio y de oxígeno, sobre la mezcla de disolventes en la que se llevarán a cabo todas las etapas posteriores y que contiene, al menos, agua, que actúa como reactivo y como disolvente, junto a un catalizador, ácido o básico, y más preferentemente otros cosolventes, tal como se han definido más arriba, creándose un medio de reacción homogéneo.

En una realización particular, además de los alcóxidos de silicio hasta aquí comentados, de fórmula  $\text{Si}(\text{OR})_n\text{R}'_{4-n}$ , donde  $n$  varía entre 2 y 4;  $\text{R}$  es un alquilo, tal como se define en los apartados anteriores, y cada  $\text{R}'$  es seleccionado independientemente entre alquilo o alqueno, tal como se definen en los apartados anteriores, se pueden añadir a la mezcla otros alcóxidos de metales y/o metaloides, que son alcóxidos de fórmula



y cualquiera de sus mezclas binarias y ternarias con estequiometría en una razón molar comprendida entre 0,1 y 0,9 de cada uno de los alcóxidos de la mezcla; donde  $\text{M}$  es seleccionado del grupo que consiste en aluminio, zirconio, titanio, estaño, vanadio y hierro;  $(\text{RO}-)$  representa un grupo alcóxido, entendido como cualquier radical orgánico derivado de un alcohol por pérdida del hidrógeno hidroxílico, según se define en los apartados anteriores, donde  $\text{R}$  es más preferiblemente un grupo alquilo y más preferentemente aún metilo, etilo, propilo, butilo u otros alquilos de cadena larga; y  $n$  varía entre 2 y 4. En los casos más preferidos, estos alcóxidos de metales y/o metaloides

son seleccionados del grupo que consiste en alcóxidos de aluminio, de titanio y de silicio, siendo estos alcoxis más preferiblemente tetrametoxisilano o tetraetoxisilano.

Preferentemente, los alcóxidos son seleccionados del grupo que consiste en:  
 5 tetrametoxisilano, tetraetoxisilano, octiltriethoxisilano, etiltrimetoxisilano, hexiltriethoxisilano, hexiltrimetoxisilano, ciclohexiltrimetoxisilano, feniltriethoxisilano, feniltrimetoxisilano, benziltriethoxisilano, dimetildimetoxisilano, clorometiltriethoxisilano, tetra(1,1,1,3,3,3-  
 10 hexafluoroisopropoxi)silano, polifluorooctiltriethoxisilano, tetra-n-propoxisilano, tetra-n-butoxisilano, tetrakis(2-metoxietoxi)silano, metiltriethoxisilano, dodeciltriethoxisilano, dodeciltrimetoxisilano, hexadeciltrimetoxisilano, octadeciltriethoxisilano, octadeciltrimetoxisilano, metiltrimetoxisilano, (3-aminopropil)triethoxisilano, (3-  
 15 aminopropil)trimetoxisilano, aliltrimetoxisilano, aliltriethoxisilano, trietoxivinilsilano, [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilano, (3-chloropropil)trimetoxisilano, (3-bromopropil)trimetoxisilano, 3-cloropropildimetoximetilsilano, 3-cloropropiltriethoxisilano, 2-cianoetiltriethoxisilano, (3-mercaptopropil)triethoxisilano, (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, ciclohexil(dimetoxi)metilsilano, dietoxidimetilsilano, dietoxidifenilsilano, dietoxi(3-glicidiloxipropil)metilsilano, dietoximetilvinilsilano, dimetoximetilfenilsilano, trimetoxi(2-feniletil)silano, N-[3-(trimetoxisilil)propil]anilina, tetraetiltitanato, tetraisopropiltitanato y tetrabutiltitanato y sus posibles mezclas binarias y ternarias, con estequiometría variable, en una razón molar desde 0,1 a 0,9 de cada uno de sus componentes y más  
 20 preferiblemente mezclas binarias con estequiometría 1:1, que pueden estar disueltos en el medio de disolución que es agua y un segundo cosolvente, de naturaleza orgánica, preferentemente seleccionado dentro del grupo compuesto por metanol, etanol, propanol, ciclohexano, tetrahidrofurano, dioxano o sus mezclas, para formar las disoluciones coloidales o soles precursores.

25 Los monómeros anteriores útiles en la presente invención tienen uno o más grupos alcoxis de fórmula -OR, pudiendo sustituirse alguno de sus átomos de hidrógeno por otro tipo de radical, tal como se define en los apartados anteriores, preferiblemente cuando no está sustituido el grupo -OR representa metoxilo y etoxilo. Se prefiere que los monómeros tengan dos o más grupos alcoxis, con el fin de proporcionar una reticulación adecuada al  
 30 xerogel resultante, aumentando de manera eficaz el control de la liberación de las sustancias bioactivas usadas en la presente invención; además las mezclas de monómeros de alcóxidos que contienen diferentes números de grupos alcoxis son de utilidad en la presente invención, ya que, de este modo, se pueden obtener tasas variables de liberación de las sustancias bioactivas.

35 En un caso particular, el 100% de alcóxidos que se añaden a la mezcla de obtención del polímero son alcóxidos de fórmula  $\text{Si}(\text{OR})_n(\text{R}')_{4-n}$ , de tal forma que son todos precursores de polímeros inorgánicos constituidos por una cadena principal de átomos alternos de silicio y de oxígeno, dando lugar a una red tridimensional de átomos alternos de silicio y de oxígeno. En otro caso particular, como se ha explicado al definir la  
 40 estructura y composición del dispositivo, los polisiloxanos se añaden a la mezcla en una cantidad del 100% de la mezcla, preferiblemente el polidimetilsiloxano hidroxil terminado. Entre un caso particular y otro, se da aquel en el que la cadena de átomos alternos de silicio y de oxígeno se obtiene por la mezcla de alcóxidos y de agregados de los segmentos de polisiloxanos, en una proporción comprendida entre el 10% y el 99% de  
 45 polisiloxanos, preferiblemente del polidimetilsiloxano hidroxil terminado de fórmula I, respecto al peso total de la película de matriz polimérica depositada. La combinación híbrida mejora las propiedades físicas, reológicas o de biocompatibilidad de los recubrimientos obtenidos. Un proceso más preferente todavía de fabricación del dispositivo en cuestión lo constituye aquel en el que en la etapa a) se añade a la  
 50 disolución como precursor un polisiloxano que consiste en polidimetilsiloxano hidroxil terminado, en cuyo caso se añade adicionalmente al menos un tensioactivo no iónico,

según se definió anteriormente. Este proceso, y el dispositivo obtenido a partir de él, resulta de gran importancia y supone una ventaja en el campo de aplicación del dispositivo, gracias a que se favorece la adherencia de la muestra biológica en estudio a la superficie del pocillo recubierta por la matriz polimérica, concretamente en el caso de  
5 medios formados por células, siendo esta cualidad del dispositivo muy ventajosa en estudios con células adherentes, que son adecuados para la mayoría de los tipos de células, incluyendo los cultivos primarios.

b) adicionar al sol precursor resultante de la etapa (a) al menos un aditivo sensible al oxígeno que consiste en la sonda molecular fluorogénica antes descrita, en una razón  
10 molar sonda:alcóxido entre 0,00001:99,99999 y 0,001:99,999.

c) Etapa de distribución mediante deposición: consiste en la distribución de alícuotas del sol obtenido en las etapa anterior en un molde adecuado, que es la placa de ensayo, aprovechando su textura líquida de baja viscosidad, una vez mezclado en la etapa (b) con la sonda fluorogénica elegida (y las sustancias bioactivas opcionales, en el  
15 caso más preferido), en un volumen comprendido entre el 0,25% y el 25% del volumen total del pocillo a recubrir, solidificando el gel a partir de la disolución coloidal (sol), resultante de las etapas a) y b). El molde en el que se deposita el sol es el fondo de cada uno de los pocillos de la microplaca elegida en función del ensayo al que se vaya a someter, permitiendo que, una vez seco, se adapte perfectamente a la forma del pocillo  
20 que lo contiene. El método de aplicación de la disolución puede elegirse a voluntad, entre recubrimiento por inmersión, por impresión a chorro o por centrifugación a una velocidad de rotación de entre 300 y 2000 rpm durante de 1 a 3 minutos, pudiendo usarse otras velocidades y tiempos de recubrimiento por centrifugación para controlar la calidad y el espesor de capa deseado.

d) Etapa de gelificación o de gelación: consiste en la producción de partículas coloidales que se unen entre sí para formar una estructura tridimensional, a medida que se va produciendo la policondensación del alcóxido de silicio y/o los segmentos del polisiloxano, preferiblemente del polidimetilsiloxano hidroxil terminado. En este proceso, el catalizador, incluyendo ácidos tanto inorgánicos (ácido clorhídico, ácido nítrico, ácido  
30 sulfúrico, etc.) como orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido cítrico ácido oxálico, etc.) o bases juega un papel de extrema importancia, por su influencia directa en la velocidad de policondensación y, por tanto, del tamaño de la partícula y del número de enlaces.

e) Etapa de sinéresis o envejecimiento: engloba el tiempo de evolución de la red  
35 sólida, aún inmersa en el disolvente, usado tanto para la solubilización de los alcóxidos, como de los aditivos útiles en la presente invención (sonda fluorogénica, sustancias bioactivas o precursores orgánicos, en el caso de obtención de geles híbridos orgánicos-inorgánicos), durante el cual, por un lado, prosigue la polimerización de los grupos hidroxilo libres, por lo que aumenta la conectividad de la red y, por otro, se observa una  
40 reducción irreversible del volumen del gel (sinéresis), debido a la expulsión progresiva del líquido almacenado en los poros. Finalmente, a nivel macroscópico, se observa un fortalecimiento del gel y un secado progresivo. En esta etapa existe un riesgo no menor de fractura del gel, debido a las tensiones provocadas por las fuerzas capilares asociadas a las interfaces líquido-vapor. Por ello, hay que llevar a cabo muy lentamente la  
45 evaporación del disolvente, conjugando los buenos resultados obtenidos mediante esta práctica, con los inconvenientes técnicos que plantean los tiempos de secado excesivamente largos (desde semanas a meses, para formar un xerogel monolítico seco). Por ello, en el ámbito de la presente invención, se propone opcionalmente el uso de al menos un aditivo químico que modifica la tensión superficial del disolvente englobado en  
50 los poros, permitiendo su más rápida evaporación; puede ser tanto ácido, como el ácido

oxálico, o básico, como la formamida, que favorece la nucleación y crecimiento de agregados, incrementando la microdureza del gel húmedo y el correspondiente tamaño de poro del gel seco, mientras que ayuda a mantener una distribución homogénea de tamaño de poro. Finalmente durante esta etapa se produce una estabilización que  
5 consiste en la reducción de la concentración de grupos silanol (-SiOH) en la superficie del xerogel mediante la formación de enlaces fuertes con otros silanoles o grupos reactivos presentes en el medio, tales como los fenoles, ácidos carboxílicos, sulfónicos y/o fosfónicos presentes en la estructura de ftalocianina y de porfirina añadida previamente.

En una realización preferida, el método comprende la deposición de una segunda  
10 película o matriz polimérica como la descrita al definir las realizaciones detalladas del microsensor. Preferentemente, esta segunda capa se deposita sobre la superficie interior de los pocillos que conforman la placa de ensayo que sirve de soporte, antes de depositar la primera capa de matriz polimérica en la etapa (c). Esta segunda película, de composición descrita anteriormente, se puede depositar bien por adición del óxido  
15 metálico a la mezcla de alcóxidos, durante el proceso de sol-gel de la etapa (a), por formación de un xerogel híbrido o mixto, preferiblemente a partir de alcóxidos de silicio, como el tetraetoxisilano y de titanio, como el tetrabutiltitanato o por dispersión del óxido metálico en una silicona, preferentemente de procedencia comercial tal como Loctite®  
5091™ Nuva-Sil®.

Independientemente del número de películas poliméricas que se depositan en la  
20 microplaca en cuestión, una realización preferente y particular del método de fabricación comprende adicionar, preferiblemente en la etapa (b), una o varias sustancias bioactivas tales como antibióticos, antifúngicos, antiprotozoarios, antineoplásicos, mitógenos o  
25 antígenos específicos, etc., o en una combinación de las mismas en la misma etapa b) en la que se adicionan las sondas fluorogénicas al sol precursor que va a formar la matriz polimérica. En el caso de usar una combinación adecuada de más de una sustancia bioactiva, dichas sustancias se mezclan en cualquier proporción, como es en una razón en peso entre ambas que puede variar entre 0,1:99,9 a 99,9:0,1, de modo que las placas  
30 sensoras resultantes son apropiadas directamente para todo tipo de estudios de quimiosensibilidad relacionados con la proliferación celular de eucariotas (por ejemplo, el test de transformación linfoblástica) y procariotas (por ejemplo, antibiogramas para la selección de antimicrobianos en estudios de susceptibilidad *in vitro*), la citotoxicidad y la cadena de respiración mitocondrial, mediante el uso de un lector de placas capaz de medir la fluorescencia o fluorescencia en tiempo resuelto, tanto en modo de lectura  
35 inferior como superior, todo ello sin necesidad de la adición de reactivos suplementarios, complejas manipulaciones o largos períodos de incubación requeridos en otras metodologías, lo que supone una clara ventaja técnica frente a los actuales sistemas comercializados.

La cantidad de sustancia bioactiva útil en la presente invención se sitúa entre el 0,001% y  
40 el 50% en peso, basados en el peso total de la película polimérica depositada sobre el pocillo, preferiblemente una cantidad de sustancia bioactiva entre el 0,01 y el 30% en peso.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso del dispositivo objeto de interés para la medida *in vitro* directa de cinéticas, ultrarrápidas, rápidas o lentas, de la  
45 concentración de oxígeno presente en cualquier medio biológico, tal como se define en apartados anteriores y de modo preferido en fluidos biológicos, incluyendo, pero no limitados a: suero, plasma, sangre, orina, saliva, sudor, leche, exudado vaginal, semen, líquido pericárdico, líquido sinovial, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y líquido peritoneal, preferiblemente orina y sangre, completas o, más  
50 preferiblemente diluidas con agua, suero fisiológico, suero de ternera, suero bovino fetal,

suero de caballo, suero humano, solución salina equilibrada de Hank, RPMI 1640, medio basal de Eagle (BME), medio mínimo esencial de Eagle (MEM), medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM), modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM), McCoy 5A, medio L-15 de Leibovitz, medio F-10 de Ham, medio F-12 de Ham, medio 199 y cualquiera de sus variantes, conocidas en el estado de la técnica.

De forma particular y preferida, el uso en laboratorio del dispositivo resultante, tal como se recoge en la presente memoria de invención, se dirige a la investigación, detección y monitorización *in vitro* y *ex vivo* en ensayos con enzimas y sistemas enzimáticos dependientes de oxígeno; o cultivos de células adherentes o cultivos celulares en suspensión de orgánulos celulares y de tejidos de animales, modificados genéticamente o no, o de organismos eucariotas formados por una sola célula, o por una colonia de células iguales entre sí, sin diferenciación de tejidos y que viven en medios acuosos o en líquidos internos de organismos superiores, como los protozoos, que incluyen, pero no se limitan a los géneros *Giardia*, *Enteromonas*, *Nosema*, *Naegleria*, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Plasmodium*, *Balantidium*, *Acanthamoeba*, *Entamoeba*, u otros géneros de los mismos órdenes, y organismos acuáticos completos, como algas (por ej. las del género *Tetraselmis*), invertebrados (por ej. los del género *Artemia* o los del género *Caenorhabditis*), o peces (por ej. los del género *Danio*). El uso del microsensor en investigación incluye, pero no se circunscribe exclusivamente a campos de investigación *in vitro* y *ex vivo* en estimulación de la transformación linfoblástica con mitógenos inespecíficos; la respuesta inmune celular provocada, por tratamientos inmunológicos, farmacológicos, quirúrgicos, nutricionales, hormonales, ambientales, etc., incluyendo la respuesta inmune celular a vacunas o inmunógenos, con o sin adyuvantes, en desarrollo o ya existentes en el mercado; el perfil inmunológico y el estado del sistema inmune del sujeto para el control de rutina de grupos de riesgo; la sospecha de enfermedades inmunomediadas, incluyendo la inmunosenescencia; las inmunodeficiencias que pueden sospecharse frente a cuadros infecciosos recurrentes o refractarios al tratamiento, incluyendo, pero no limitadas a enfermedades infecciosas, como las que presentan formas latentes con alto riesgo de progresar hacia la enfermedad; el déficit de la capacidad inmunológica en estados patológicos autoinmunes, como la mielopatía degenerativa, o genéticos, como la agammaglobulinemia; las consecuencias de terapias inmunosupresoras o terapia de realce inmunitaria, de reacciones de hipersensibilidad celular reaccionando contra los alérgenos del medio ambiente o antígenos; la respuesta a mitógenos, incluyendo los desórdenes que muestran una respuesta blastogénica variable hacia los mitógenos selectivos de células B; la candidiasis mucocutáneas y otras infecciones fúngicas crónicas; la blastogénesis inducida por berilio, la detección de la exposición previa a diversos agentes patógenos, por ejemplo malaria, hepatitis u otras infecciones incluyendo *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium africanum*; enfermedades periodontales y ciertas infecciones virales, por ejemplo dengue o enfermedades linfoproliferativas asociadas al virus de Epstein-Barr; la detección de exposición previa al antígeno correspondiente en individuos sin respuesta a anticuerpos; la presencia de antígenos responsables de alergias que también estimulan *in vitro* reacciones específicas linfoproliferativas (reacciones alérgicas inmediatas, reacciones por contacto y la hipersensibilidad por drogas); los estados alérgicos; las reacciones inmunológicas hacia agentes patógenos, alérgenos y autoantígenos; las condiciones autoinmunes en las que los antígenos estimulan específicamente la transformación linfoblástica sólo en pacientes que padecen dicho estado; los estados de inmunodeficiencia genética y adquirida, con una función linfocitaria deprimida (aún en ausencia de linfocitopenia); los efectos terapéuticos, incluyendo, pero no limitados, a los resultantes de terapias antibióticas, antiprotozoarias, antifúngicas, antineoplásicas, inmunoestimulantes o inmunosupresoras, así como los métodos para optimizar fármacos,

para identificar dosis eficaces de la quimioterapia y métodos de caracterización fenotípica; el seguimiento del grado de deterioro/mejoría de la reactividad linfocitaria en pacientes con cáncer; el comportamiento celular en desórdenes mitocondriales; el seguimiento del grado de deterioro y/o mejoría de la reactividad linfocitaria en pacientes con cáncer; el comportamiento celular en desórdenes mitocondriales; el estudio *in vitro* de reacciones enzimáticas de consumo o producción de oxígeno y de modelos de enfermedades asociadas al estrés oxidativo; el vínculo funcional entre desórdenes neurológicos (Alzheimer, esquizofrenia, autismo, ELA, etc.) y los mecanismos de regulación bioenergética de células periféricas; las complicaciones diabéticas e inflamación; las técnicas de manipulación para la terapia celular reproductiva, regenerativa y terapéutica; el efecto de formulaciones conteniendo nanopartículas y otros sistemas teranósticos sobre la función inmunológica básica de linfocitos animales y otras aplicaciones para la investigación en la industria alimentaria, láctea y de microalgas, o usos *in vitro* y *ex vivo* en el campo toxicológico, diagnóstico, pronóstico y terapéutico de cualquiera de las aplicaciones mencionadas, teniendo en cuenta que aunque, por sí mismo, el microsensor de la presente invención no genera los resultados de un método de diagnóstico *in vitro*, para la detección de enfermedades, condiciones o infecciones, puede ser útil como un componente clave de un sistema para el diagnóstico, al usarse en combinación con otros procedimientos, que validen el dispositivo y determinen su idoneidad, optimización y estandarización, con otros materiales y con otros sistemas que pueden ser diseñados por un experto en la materia.

Debe tenerse en cuenta que la presente memoria, al contemplar estos usos del dispositivo, y que se realizan siempre *in vitro* y/o *ex vivo*, cubre asimismo los correspondientes métodos para llevar a cabo las tareas comentadas anteriormente (monitorización de la transformación linfoblástica *in vitro* con mitógenos inespecíficos, de la posible optimización de sustancias con potencial terapéutico y la identificación de dosis eficaces de la quimioterapia y métodos de caracterización fenotípica, etc.) utilizando el dispositivo aquí descrito, mediante sistemas miniaturizados tipo microplaca, que pueden tener formatos de 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 ó 3456 pocillos y geometría y capacidad de los pocillos variable, lo cual permite reducir el volumen de reactivos y medio a emplear en los ensayos, así como estudiar en un formato manejable el efecto de un compuesto sobre un gran número de aislados o el de una serie de compuestos sobre un aislado determinado; dichos métodos consistiendo generalmente en depositar una muestra de una o más matrices biológicas, que se refieren al conjunto formado por un medio y muestra biológica, de origen procariota o eucariota (p. ej., bacterias, protozoos, plantas, insectos, aves, peces, reptiles, mamíferos, genéticamente modificados o no, etc.) tal como se definieron anteriormente, en uno o varios pocillos del dispositivo, y así medir mediante espectroscopía de fluorescencia y de fluorescencia en tiempo resuelto (TRF), las variaciones en tiempo real en la concentración de oxígeno producidas en dicha matriz biológica a lo largo del experimento.

De forma general, el uso del dispositivo descrito en la presente memoria se lleva a cabo en cualquier plataforma estándar disponible comercialmente de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF), de uso común en análisis bioquímicos, médicos, químicos o de investigación y capaz de aceptar cualquier tipo de microplacas estándar (incluyendo formatos de 96, 384 pocillos o superiores),

De esta manera, la lectura de cada pocillo puede tomarse varias veces e implica excitar el marcador fluorescente con un pulso corto de luz, a continuación, esperar un cierto tiempo (desde 50 a 200 microsegundos) después de la excitación y antes de medir la señal fluorescente restante de larga vida. De este modo, se eliminan las señales de fondo fluorescentes de vida corta y la dispersión de la radiación.

Para una mejor comprensión de esta memoria descriptiva, a continuación se dan, a título ilustrativo y nunca limitativo del alcance de la invención, algunos ejemplos de la esencialidad de la misma.

### **Ejemplos**

5 Ejemplo 1: fabricación de una película sensora y deposición sobre la microplaca para obtener el dispositivo de detección de oxígeno y de medición de la variación en sus concentraciones objeto de la presente invención

10 Se mezclan 32 milimoles (mmoles) de tetraetoxisilano y 32 mmoles de octiltrietoxisilano en 12,5 mililitros (ml) de etanol absoluto y sobre esa disolución se añaden 4 ml (0,0004 mmoles) de ácido clorhídrico 0,1N.

La mezcla se agita vigorosamente durante 1 hora y se le añaden 34 ml de etanol, agitándose durante 30 minutos adicionales. Tras ese tiempo, se le adicionan gota a gota, 6 ml de una disolución 0,01 milimolar (mM) hidroalcohólica (100 etanol:10 agua v/v) de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II) (0,06 mmoles).

15 La disolución resultante se pipetea y se depositan 0,010 ml/pocillo sobre una placa negra de poliestireno, con 96 pocillos y fondo plano transparente, para permitir una buena visualización del contenido del pocillo, y, por tanto, la posibilidad de mediciones por transmisión de luz, junto a un "crosstalk" reducido entre pocillos.

20 Finalmente, la placa resultante se deja gelificar, secar y estabilizarse a temperatura ambiente de 5 a 7 días.

Ejemplo 2: fabricación de una película sensora con antibióticos y deposición sobre la microplaca de acuerdo con una realización particular de la presente invención

25 Las placas se fabrican siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, en la cual en algunos pocillos se deposita la disolución sensora como la descrita en el ejemplo 1, los cuales se usan como blanco, junto a otros pocillos conteniendo una disolución en la que los 6 ml de disolución hidroalcohólica 0,01 mM (100 etanol:10 agua v/v) conteniendo 0,06 mmoles de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), se forman a partir de 0,4 ml de sonda 10mM en dimetilsulfóxido, diluida con el volumen correspondiente de agua en la que se han disuelto penicilina y estreptomina en cantidad adecuada para contener las concentraciones finales en la película sensora de 100 U/ml y 0,1 mg/ml, respectivamente y completada con etanol para obtener 1/10 de la disolución base de sonda. Finalmente, la placa generada con ambos tipos de pocillos (película sensora y película sensora con antibióticos) se deja gelificar, secar y estabilizarse a temperatura ambiente de 5 a 7 días.

35 De este modo, es de esperar que cuando se siembran bacterias en un medio biológico adecuado para su crecimiento, en los pocillos de una placa sin antibiótico (fabricada según el ejemplo 1) se producirá un crecimiento bacteriano logarítmico, que irá agotando el oxígeno disuelto en el medio; a medida que disminuye adicionalmente el nivel de oxígeno, el crecimiento bacteriano podría dificultarse y la presión parcial de oxígeno puede volverse limitante, hasta que la presión parcial de oxígeno alcance casi cero, punto en el cual puede cesar el crecimiento celular y dicho patrón de crecimiento se reflejará en una curva sigmoidea. Por el contrario, al añadir un agente antibiótico al xerogel que recubre el pocillo resultante del proceso anterior se suprimirá el crecimiento bacteriano, no se consumirá oxígeno y las mediciones de emisión de fluorescencia darán una línea constante, próxima al valor de los pocillos con un medio biológico sin bacterias.

45



Ejemplo 3: fabricación de una película sensora con un mitógeno y deposición sobre la microplaca

Las placas se fabrican siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, en la cual en algunos pocillos se deposita la disolución sensora como la descrita en el ejemplo 1, los cuales se usan como blanco, junto a otros pocillos conteniendo una disolución en la que los 6 ml de disolución hidroalcohólica 0,01 mM (100 etanol:10 agua v/v) conteniendo 0,06 mmoles de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), se forman a partir de 0,4 ml de sonda 10 mM en dimetilsulfóxido, diluida con el volumen correspondiente de agua en la que se ha disuelto fitohemaglutinina en cantidad adecuada para contener las concentraciones finales en la película sensora de 0,02 mg/ml y completada con etanol para obtener 1/10 de la disolución base de sonda. Finalmente, la placa generada con ambos tipos de pocillos (película sensora y película sensora con mitógeno) se deja gelificar, secar y estabilizarse a temperatura ambiente de 5 a 7 días.

De este modo, es de esperar que cuando se siembran células mononucleadas de sangre periférica o se añaden muestras biológicas que las contengan, en los pocillos de una placa sin mitógeno (fabricada según el ejemplo 1), no se observará crecimiento celular, no se consumirá oxígeno y las mediciones de emisión de fluorescencia darán una línea constante, próxima al valor de los pocillos con un medio biológico sin células mononucleadas de sangre periférica. Por el contrario, al añadir un mitógeno adecuado al xerogel que recubre el pocillo resultante del proceso anterior se producirá un crecimiento celular logarítmico, que irá agotando el oxígeno disuelto en el medio; a medida que disminuye adicionalmente el nivel de oxígeno, el crecimiento celular podría dificultarse y la presión parcial de oxígeno puede volverse limitante, hasta que la presión parcial de oxígeno alcance casi cero, punto en el cual puede cesar el crecimiento celular y dicho patrón de crecimiento se reflejará en una curva sigmoidea.

Ejemplo 4: fabricación de una película sensora híbrida y deposición sobre la microplaca

Sobre una disolución de 44 mmoles (10 ml) de tetraetoxisilano en 40 ml de etanol absoluto y 37 ml de agua, se añaden gota a gota 0,4 ml (0,38 g) de poli(dimetilsiloxano) hidroxil terminado y 0,02 ml de polioxietileno(23)lauril éter (Brij-35).

La mezcla se agita vigorosamente durante 1 hora y se le adicionan, gota a gota, 4 ml (0,06 mmoles) de una disolución hidroalcohólica 0,01 mM (100 etanol:10 agua v/v) de 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II).

La disolución resultante se sonica durante 30 minutos, en un baño de ultrasonidos, al cabo de los cuales se agita durante otros 30 minutos adicionales y se depositan con una pipeta 0,04ml/pocillo sobre una placa negra de poliestireno, con 96 pocillos y fondo plano transparente. Finalmente, la placa resultante se deja gelificar, secar y estabilizarse a temperatura ambiente durante un período de 2 días.

Ejemplo 5: protocolo de detección E. Coli con 0,002 ml de película sensora/pocillo

A cada pocillo de una microplaca obtenida según el ejemplo 1, en la que se han depositado 0,002 ml de disolución precursora de la película sensora, se le añaden 0,1 ml de una suspensión de medio de cultivo estándar (Difco Laboratories), al que se le ha transferido una colonia bacteriana de E. Coli. De este modo, la placa resultante, bien se congela a -20°C, para su posterior uso, bien se coloca, cubierta con 0,1 ml/pocillo de aceite mineral, en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer), de forma que el lector captura dos señales: una primera señal de excitación a 340 nanómetros y una emisión a 615 nanómetros, tras un tiempo de demora de 70 microsegundos y una segunda señal a las mismas longitudes de excitación y emisión, pero con una demora de 30

microsegundos. La relación entre la primera y la segunda lectura, se considera la señal final que aparece en la gráfica, lo cual establece una ventaja comparativa frente a las medidas de fluorescencia tradicionales, al eliminar algunos problemas metodológicos, como la autofluorescencia.

- 5 Tras la lectura continua (entre 40 y 80 lecturas cada 15 minutos) de la placa a 37°C y 5% de dióxido de carbono en el incubador de células, se obtiene un gráfico del crecimiento bacteriano en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 1).

Ejemplo 6: protocolo de detección E. Coli con 0,005 ml de película sensora/pocillo

- 10 A cada pocillo de una microplaca obtenida según el ejemplo 1, en la que se han depositado 0,005 ml de disolución precursora de la película sensora, se le añaden 0,1 ml de una suspensión de medio de cultivo estándar (Difco Laboratories), al que se le ha transferido una colonia bacteriana de E. Coli. De este modo, la placa resultante, bien se congela a -20°C, para su posterior uso, bien se coloca, cubierta con 0,1 ml/pocillo de  
15 aceite mineral, en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer), de forma que el lector captura dos señales: una primera señal de excitación a 340 nanómetros y una emisión a 615 nanómetros, tras un tiempo de demora de 70 microsegundos y una segunda señal a las mismas longitudes de excitación y emisión, pero con una demora de 30  
20 microsegundos. La relación entre la primera y la segunda lectura, se considera la señal final que aparece en la gráfica, lo cual establece una ventaja comparativa frente a las medidas de fluorescencia tradicionales, al eliminar algunos problemas metodológicos, como la autofluorescencia.

- 25 Tras la lectura continua (entre 40 y 80 lecturas cada 15 minutos) de la placa a 37°C y 5% de dióxido de carbono en el incubador de células, se obtiene un gráfico del crecimiento bacteriano en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 2).

Ejemplo 7: protocolo de detección E. Coli con 0,01 ml de película sensora/pocillo

- 30 A cada pocillo de una microplaca obtenida según el ejemplo 1, en la que se han depositado 0,01 ml de disolución precursora de la película sensora, se le añaden 0,1 ml de una suspensión de medio de cultivo estándar (Difco Laboratories), al que se le ha transferido una colonia bacteriana de E. Coli. De este modo, la placa resultante, bien se congela a -20°C, para su posterior uso, bien se coloca, cubierta con 0,1 ml/pocillo de  
35 aceite mineral, en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer), de forma que el lector captura dos señales: una primera señal de excitación a 340 nanómetros y una emisión a 615 nanómetros, tras un tiempo de demora de 70 microsegundos y una segunda señal a las mismas longitudes de excitación y emisión, pero con una demora de 30  
40 microsegundos. La relación entre la primera y la segunda lectura, se considera la señal final que aparece en la gráfica, lo cual establece una ventaja comparativa frente a las medidas de fluorescencia tradicionales, al eliminar algunos problemas metodológicos, como la autofluorescencia.

Tras la lectura continua (entre 40 y 80 lecturas cada 15 minutos) de la placa a 37°C y 5% de dióxido de carbono en el incubador de células, se obtiene un gráfico del crecimiento bacteriano en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 3).

- 45 Ejemplo 8: Protocolo de detección E. coli a 0,01 ml de película sensora+antibióticos/pocillo

A cada pocillo de una microplaca obtenida según el ejemplo 2, en la que se han depositado 0,01 ml de disolución precursora de la película sensora, se le añaden 0,1 ml de una suspensión de medio de cultivo estándar (Difco Laboratories), al que se le ha transferido una colonia bacteriana de *E. coli*. De este modo, la placa resultante, bien se congela a -20°C, para su posterior uso, bien se coloca, cubierta con 0,1 ml/pocillo de aceite mineral, en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer), de forma que el lector captura dos señales: una primera señal de excitación a 340 nanómetros y una emisión a 615 nanómetros, tras un tiempo de demora de 70 microsegundos y una segunda señal a las mismas longitudes de excitación y emisión, pero con una demora de 30 microsegundos. La relación entre la primera y la segunda lectura, se considera la señal final que aparece en la gráfica, lo cual establece una ventaja comparativa frente a las medidas de fluorescencia tradicionales, al eliminar algunos problemas metodológicos, como la autofluorescencia.

Tras la lectura continua (entre 40 y 80 lecturas cada 15 minutos) de la placa a 37°C y 5% de dióxido de carbono en el incubador de células, se obtiene un gráfico del crecimiento bacteriano en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 4).

Ejemplo 9: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:4) en presencia de fitohemaaglutinina

La sangre se recoge en tubos de 10 ml con heparina de sodio como anticoagulante y se diluye con medio de cultivo comercial RPMI 1604 suplementado, en una proporción v/v de sangre a medio de 1:4 y se distribuye en alícuotas de 0,180 ml/pocillo de dicha disolución de sangre en las placas multipocillo obtenidas según el Ejemplo 3.

La placa se incuba a 37°C y un 5% de dióxido de carbono en el incubador de células durante 72 horas, cubierta con 0,1 ml/pocillo de aceite mineral, en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer), de forma que el lector captura dos señales: una primera señal de excitación a 340 nanómetros y una emisión a 615 nanómetros, tras un tiempo de demora de 70 microsegundos y una segunda señal a las mismas longitudes de excitación y emisión, pero con una demora de 30 microsegundos. La relación entre la primera y la segunda lectura, se considera la señal final que aparece en la gráficas, lo cual establece una ventaja comparativa frente a las medidas de fluorescencia tradicionales, al eliminar algunos problemas metodológicos, como la autofluorescencia y permite hacer medidas en sangre completa, durante 40-80 veces, cada 15 minutos, de modo que se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 5).

Ejemplo 10: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:5) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:5 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 6).

Ejemplo 11: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:8) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:8 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 7).

Ejemplo 12: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:10) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:10 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 8).

5 Ejemplo 13: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:20) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:20 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 9).

10 Ejemplo 14: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:30) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:30 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 10).

15 Ejemplo 15: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:40) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:40 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 11).

20 Ejemplo 16: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:50) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:50 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 12).

25 Ejemplo 17: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:100) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:100 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 13).

30 Ejemplo 18: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa diluida (1:200) en presencia de fitohemaaglutinina

Según un procedimiento similar al del Ejemplo 9, con una proporción v/v de sangre a medio de 1:200 se obtiene un gráfico de linfoproliferación en cada pocillo, mediante la representación del consumo de oxígeno, de acuerdo a lo esperado (Figura 14).

35 Ejemplo 19: protocolo de citotoxicidad de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), frente a células THLE-2

40 A cada pocillo de una microplaca negra de 96 pocillos, para cultivo de tejidos, se le añaden 10.000 células THLE2/pocillo, suspendidas en el medio recomendado por el proveedor. De este modo, la placa resultante se guarda en el incubador de células a 37°C y 5% de dióxido de carbono, durante toda la noche, tras lo cual, se aspira el medio y se añaden 0,18 mililitros/pocillo de medio completo nuevo, seguidos de 0,02 mililitros/pocillo de concentraciones variables de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), previamente disuelta en dimetilsulfóxido, hasta una concentración final, en cada pocillo, del 1% en dimetilsulfóxido.

La placa se mantiene en el incubador de células a 37°C y 5% de dióxido de carbono, durante 72 horas, tras las cuales se aspira el medio y se reemplaza por 0,02 mililitros/pocillo del tampón de lisis (“Ready to use lysis buffer” del Cambrex Vialight Plus kit, Cat#LT07-121). Tras 45 minutos adicionales de incubación, se añaden 0,05 mililitros/pocillo del reactivo de detección de ATP (“ATP monitoring reagent-Plus” del Cambrex Vialight Plus kit, Cat#LT07-121) y se mantiene a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras los que se hace una lectura de luminiscencia en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer).

De ese modo, se obtiene el gráfico de la Figura 15, que representa el contenido de ATP, cuyos datos son la media  $\pm$  error de 6 pocillos diferentes para cada concentración de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), resultando una concentración inhibitoria media (CI50) de 0,07 milimolar.

Ejemplo 20: protocolo de detección de proliferación en sangre humana completa en presencia de fitohemaglutinina

La sangre se recoge en tubos de 10 ml con heparina de sodio como anticoagulante y se diluye con 100 ml de un medio de cultivo comercial RPMI 1604 modificado, en el que se ha disuelto fitohemaglutinina en cantidad adecuada para contener una concentración final de 0,02 mg/ml. La mezcla resultante, se incuba a 37°C y un 5% de dióxido de carbono en el incubador de células durante 72 horas, tras lo cual se distribuye en alícuotas de 0,180 ml/pocillo de dicha disolución de sangre en las placas multipocillo obtenidas según el Ejemplo 1.

Dicha placa, conteniendo la sangre y cubierta con su correspondiente tapa, se introduce en el incubador de células a 37°C y un 5% de dióxido de carbono, tras agregar a la mitad de los pocillos 0,1 ml/pocillo de aceite mineral, para prevenir cualquier intercambio de oxígeno con el interior, mientras que el resto de los pocillos se mantienen sin aceite. Al cabo de tres horas, la placa se introduce en un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer), de forma que el lector captura dos señales: una primera señal de excitación a 340 nanómetros y una emisión a 615 nanómetros, tras un tiempo de demora de 70 microsegundos y una segunda señal a las mismas longitudes de excitación y emisión, pero con una demora de 30 microsegundos. La relación entre la primera y la segunda lectura, se considera la señal final con la que se crean la gráficas, de modo que se obtiene la linfoproliferación en cada pocillo, a través de la representación del consumo de oxígeno y cuyos datos son la media  $\pm$  error de 4 pocillos diferentes para la concentración dada (Figuras 16 y 17).

Ejemplo 21: protocolo de lixiviación de la 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), hacia el medio

Sobre 24 pocillos de una microplaca generada según el Ejemplo 1 (filas A-H y columnas 7-9), se añaden 0,2 ml de medio de cultivo RPMI 1640. De este modo, el medio de tres de los pocillos (fila A) se retira de forma inmediata (denominado día 0) o se mantiene en la placa a diferentes días hasta 8 días (denominado día 8, correspondientes a las filas F-H), tras los cuales, también se aspira el medio.

La placa, una vez que está completamente vacía, se procesa añadiendo 0,1 ml de vehículo (medio de cultivo RPMI 1640) sobre el pocillo de la fila A y columna 7 (n=1) y 0,1 ml de una disolución patrón de sulfito de sodio al 10% en agua sobre cada pocillo de la fila A y columnas 8 y 9 (n=2), correspondientes todos ellos al día 0. Del mismo modo se añaden 0,1 ml de vehículo (medio de cultivo RPMI 1640) sobre cada pocillo de las filas F-H y columna 7 (n=3) y 0,1 ml de una disolución de sulfito de sodio al 10% en agua sobre los pocillos de las filas F-H y columnas 8 y 9 (n=6), correspondientes todos ellos al día 8.

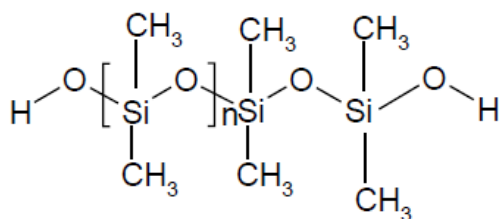
5 Los pocillos conteniendo vehículo o disolución de sulfito de sodio se cubren con 0,15 ml de aceite mineral, para evitar cualquier intercambio de oxígeno con el exterior y se llevan a un lector de placas (Envision, Perkin-Elmer) y cada pocillo se lee 10 veces, con un intervalo de 1 una hora (10 horas de lectura), de modo similar a como se describe en los ejemplos anteriores, suministra cada una de las señales finales recogidas en la Tabla 1, donde se incluyen los valores medios de cada grupo y la desviación estándar ( $\square$ ).

Tabla 1

		Media	$\square$			Media	$\square$
Vehículo	Día 0	19,3	-	Día 8	25,29	14,48	
		18,8	-		14,93	1,54	
		21,4	-		17,80	2,35	
		23,1	-		16,97	1,75	
		25,1	-		17,60	2,88	
		28,9	-		18,77	2,87	
		28,9	-		18,83	5,46	
		27,8	-		18,33	2,61	
		29,3	-		18,17	2,73	
		30,9	-		18,47	3,17	
		29,1	-		18,90	2,43	
		28,2	-		19,73	2,24	
Patrón Positivo	Día 0	44,85	25,53	Día 8	71,57	35,52	
		182,30	111,16		222,88	73,57	
		212,10	51,34		244,85	110,11	
		242,65	36,70		259,25	122,31	
		262,30	33,80		260,43	118,87	
		275,90	37,90		247,30	111,65	
		284,10	39,74		254,08	128,49	
		284,05	36,42		242,75	117,29	
		286,50	31,25		249,87	112,58	
		290,95	35,43		238,97	106,50	
		289,90	33,66		241,85	102,44	
		296,50	38,75		238,62	91,32	

## REIVINDICACIONES

1. Microsensor químico polimérico de detección de oxígeno caracterizado por que comprende:
- 5 - un soporte que es una placa de ensayo que presenta una pluralidad de pocillos en forma de receptáculos abiertos por su cara superior y cuyo número varía entre 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 ó 3456 pocillos, siendo de geometría y capacidad variables; recubierto de
  - una película sensible al oxígeno depositada homogéneamente sobre la superficie interior de los pocillos del soporte, que comprende:
    - 10 · una matriz polimérica inerte y estable que comprende un xerogel de estructura porosa, formado por polímeros inorgánicos constituidos por una cadena principal de átomos alternos de silicio y de oxígeno seleccionados entre una red tridimensional de dióxido de silicio, desarrollada a partir de monómeros con grupos alcoxilo hidrolizables, y/o un polisiloxano, dicha matriz siendo sensible al oxígeno gracias a
    - 15 · al menos una sonda molecular fluorogénica anclada a la matriz polimérica, que es soluble en agua y seleccionada entre derivados de metalofteralocianina y/o metaloporfirina.
2. Microsensor de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sonda molecular fluorogénica es al menos una metaloporfirina que comprende un ciclo nitrogenado central conteniendo un átomo o ión metálico seleccionado del grupo que consiste en paladio, platino y rutenio, sustituido en su periferia con uno, dos, tres o cuatro grupos del tipo carboxilato.
- 20 3. Microsensor de acuerdo con la reivindicación 2, donde una de las sondas moleculares es 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina Pt(II), y está presente en la matriz polimérica en una proporción comprendida entre el 10% y el 100% en peso del total de metaloporfirinas y/o metalofteralocianinas del microsensor.
4. Microsensor de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el xerogel de la matriz polimérica incluye en su estructura al menos un segundo átomo metal o metaloide diferente al silicio seleccionado del grupo que consiste en aluminio, circonio, titanio, estaño, vanadio, hierro y cualquiera de sus combinaciones.
- 30 5. Microsensor de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la matriz polimérica es seleccionada del grupo que consiste en:
- 35 - una matriz inorgánica de estructura compuesta en un 100% de dióxido de silicio;
  - una matriz híbrida orgánica-inorgánica que contiene de forma combinada dióxido de silicio y polisiloxanos, estando contenidos dichos polisiloxanos en un intervalo comprendido entre 10% y 99% del total del peso de la matriz; y
  - una matriz orgánica de estructura compuesta en un 100% de polisiloxano.
- 40 6. Microsensor de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polisiloxano es poldimetilsiloxano hidroxil terminado de fórmula I



I

donde n corresponde al número de unidades de silicio por molécula de oligómero, y representa el grado de oligomerización.

- 5 7. Microsensor de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una segunda película de una matriz polimérica que contiene un material inerte adecuado para reflejar y dispersar la luz emitida por la sonda que consiste en un óxido metálico seleccionado dentro del grupo compuesto por dióxido de estaño, óxido de zinc, dióxido de titanio y cualquiera de sus combinaciones, estando dicha capa depositada directamente sobre la superficie interior de los pocillos de la microplaca y
- 10 entre dicha superficie interior y la primera capa de matriz polimérica.
8. Microsensor de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente al menos una sustancia bioactiva adsorbida sobre la superficie de la matriz polimérica porosa del xerogel.
- 15 9. Microsensor de acuerdo a la reivindicación 8, donde dicha sustancia bioactiva es seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, antifúngicos, antiprotozoarios, antineoplásicos, mitógenos y antígenos específicos, así como cualquiera de sus combinaciones, y se encuentra presente en la matriz polimérica en una cantidad comprendida entre un 0,001% y un 50% en peso respecto al peso total de la matriz
- 20 polimérica depositada.
10. Proceso para la fabricación del microsensor definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, mediante preparación de una matriz de estructura porosa formada por cadenas de átomos alternos de silicio y de oxígeno seleccionadas entre sílice y polisiloxanos a partir de un proceso sol-gel, que comprende las etapas de:
- 25 (a) formar un sol precursor de compuestos de silicio seleccionados entre dióxido de silicio y/o polisiloxano, a partir de la mezcla de al menos un monómero portador de al menos un alcóxido de silicio de fórmula
- $$\text{Si}(\text{OR})_n(\text{R}')_{4-n},$$
- 30 donde n varía entre 2 y 4; R es un alquilo, y cada R' es seleccionado independientemente entre alquilo o alquenilo, en una proporción comprendida entre 2 y 30 moles de agua por mol de alcóxido, usada como reactivo de hidrólisis, y un catalizador precursor de reacción que es un ácido orgánico, un ácido inorgánico o una base en una razón molar catalizador:alcóxido comprendida entre 0,000001:99,999999 y 0,0001:99,9999;
- 35 (b) adicionar al sol precursor resultante de la etapa (a) al menos un aditivo sensible al oxígeno que consiste en la sonda molecular fluorogénica antes descrita, en una razón molar sonda:alcóxido entre 0,00001:99,99999 y 0,001:99,9999;
- (c) depositar una película del sol precursor obtenido en la etapa (b) sobre la superficie interior de los pocillos de la microplaca que hace de soporte de forma



homogénea, en un volumen comprendido entre 1% y 25% del volumen total del pocillo a recubrir

- 5 (d) gelificar el sol precursor resultante de la etapa (c) mediante policondensación del alcóxido a una temperatura comprendida entre 15°C y 70°C durante un tiempo comprendido entre 1 y 72 horas, dando lugar a una matriz porosa de xerogel, la cual se somete a
- (e) sinéresis o envejecimiento para evaporar el medio de disolución del sol precursor, durante un período de 2 a 5 días.

- 10 11. Proceso según la reivindicación anterior, donde se añade al menos un segundo alcóxido de metal y/o metaloide a la mezcla de la etapa a), que es un alcóxido de fórmula



- 15 y cualquiera de sus mezclas binarias y ternarias con estequiometría en una razón molar comprendida entre 0,1 y 0,9 de cada uno de los alcóxidos de la mezcla; donde M es seleccionado del grupo que consiste en aluminio, zirconio, titanio, estaño, vanadio y hierro; (RO-) representa un grupo alcoxilo que es un radical orgánico derivado de un alcohol por pérdida del hidrógeno hidroxílico, donde R es un grupo alquilo; y n varía entre 2 y 4.

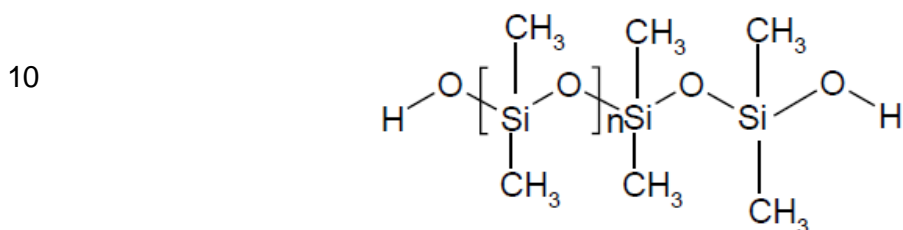
- 20 12. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde los alcóxidos son seleccionados del grupo que consiste en: tetrametoxisilano, tetraetoxisilano, octiltriethoxisilano, etiltrimetoxisilano, hexiltriethoxisilano, hexiltrimetoxisilano, ciclohexiltrimetoxisilano, feniltriethoxisilano, feniltrimetoxisilano, benziltriethoxisilano, dimetildimetoxisilano, clorometiltriethoxisilano, tetra(1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropoxi)silano, polifluorooctil triethoxisilano, tetra-n-propoxisilano, tetra-n-butoxisilano, tetrakis(2-metoxietoxi)silano, metiltriethoxisilano, dodeciltriethoxisilano, dodeciltrimetoxisilano, hexadeciltrimetoxisilano, octadeciltriethoxisilano, octadeciltrimetoxisilano, metiltrimetoxisilano, (3-aminopropil)triethoxisilano, (3-aminopropil)trimetoxisilano, aliltrimetoxisilano, aliltriethoxisilano, trietoxivinilsilano, [3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilano, (3-chloropropil)trimetoxisilano, (3-bromopropil)trimetoxisilano, 3-cloropropildimetoximetilsilano, 3-cloropropiltriethoxisilano, 2-cianoetiltriethoxisilano, (3-mercaptopropil)triethoxisilano, (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, ciclohexil(dimetoxi)metilsilano, dietoxidimetilsilano, dietoxidifenilsilano, dietoxi(3-glicidiloxipropil)metilsilano, dietoximetilvinilsilano, dimetoximetilfenilsilano, trimetoxi(2-feniletil)silano, N-[3-(trimetoxisilil)propil]anilina, 35 tetraetiltitanato, tetrakispropiltitanato y tetrabutiltitanato y sus posibles mezclas binarias y ternarias, con estequiometría variable, en una razón molar desde 0,1 a 0,9 de cada uno de sus componentes.

- 40 13. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la mezcla de alcóxido y agua se realiza en un medio de disolución seleccionado entre un alcohol, un hexano y un éter cíclico; dicho medio de disolución estando presente en una cantidad comprendida entre 2 y 20 moles.

14. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde:
- 45 - el 100% de los alcóxidos que se añaden en la mezcla de la etapa a) son alcóxidos de fórmula  $Si(OR)_n(R')_{4-n}$ , dando lugar a una red tridimensional de átomos alternos de silicio y de oxígeno;

- el 100% de los alcóxidos que se añaden en la mezcla de la etapa a) son polisiloxanos, en cuyo caso se añade adicionalmente al menos un tensioactivo no iónico; o
- 5 - entre el 10% y el 99% del total de precursores que se añaden en la mezcla de la etapa a) son polisiloxanos, en cuyo caso se añade adicionalmente al menos un tensioactivo no iónico.

15. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el polisiloxano es polidimetilsiloxano hidroxil terminado de fórmula I



donde n corresponde al número de unidades de silicio por molécula de oligómero, y representa el grado de oligomerización.

- 15 16. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, donde la deposición de la etapa (c) se lleva a cabo mediante recubrimiento por centrifugación a una velocidad de rotación de entre 300 y 2000 rpm durante un tiempo comprendido entre 1 y 60 minutos, o por inmersión.
- 20 17. Proceso para la fabricación de un microsensor como el definido en la reivindicación 7, caracterizado por que comprende adicionar una segunda capa de una matriz polimérica, que contiene al menos un material inerte adecuado para reflejar y dispersar la luz emitida por la sonda consistente en un óxido metálico seleccionado del grupo compuesto por dióxido de estaño, óxido de zinc, dióxido de titanio y cualquiera de sus combinaciones, antes de la deposición de la capa de matriz polimérica que contiene la sonda fluorogénica, donde dicho óxido metálico es adicionado en el proceso sol-gel de la etapa (a) dando lugar a un xerogel mixto, o bien es adicionado mediante dispersión en al menos una silicona
- 25
- 30 18. Proceso para la fabricación de un microsensor como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, caracterizado por que comprende adicionar al menos una sustancia bioactiva en la etapa (b) en una cantidad comprendida entre 0,001% y 50% en peso del total de la película polimérica depositada sobre el pocillo.
- 35 19. Uso de un microsensor como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la monitorización de muestras *in vitro* y *ex vivo* mediante un estudio seleccionado del grupo que consiste en: estudio de proliferación celular de eucariotas o procariontas, estudio de citotoxicidad y quimiosensibilidad, estudio de senescencia celular, estudio de la cadena de respiración mitocondrial; estudio de transformación linfoblástica con mitógenos inespecíficos; estudio de respuesta inmune celular provocada por tratamientos inmunológicos, farmacológicos, quirúrgicos, nutricionales, hormonales o ambientales; estudio de perfil inmunológico y estado del sistema inmune
- 40 de un sujeto para el control de rutina de grupos de riesgo; estudio de enfermedades inmunomediadas; estudio de inmunodeficiencias que pueden sospecharse frente a cuadros infecciosos recurrentes o refractarios al tratamiento; estudio del déficit de la capacidad inmunológica en estados patológicos autoinmunes; estudio de consecuencias de terapias inmunosupresoras, terapias de realce inmunitaria, de

- reacciones de hipersensibilidad celular reaccionando contra los alérgenos del medio ambiente o antígenos; estudio de la respuesta a mitógenos; estudio de la candidiasis mucocutáneas y otras infecciones fúngicas crónicas; estudio de la blastogénesis inducida por berilio; estudio de la detección de la exposición previa a diversos agentes patógenos; estudio de enfermedades periodontales y ciertas infecciones virales; estudio de la detección de exposición previa al antígeno correspondiente en sujetos sin respuesta a anticuerpos; estudio de la presencia de antígenos responsables de alergias que también estimulan reacciones específicas linfoproliferativas; estudio de estados alérgicos; estudio de reacciones inmunológicas hacia agentes patógenos, alérgenos y autoantígenos; estudio de las condiciones autoinmunes en las que los antígenos estimulan específicamente la transformación linfoblástica sólo en sujetos que padecen dicho estado; estudio de los estados de inmunodeficiencia genética y adquirida, con una función linfocitaria deprimida; estudio de efectos terapéuticos; estudio de seguimiento del grado de deterioro/mejoría de la reactividad linfocitaria en sujetos con cáncer; estudio del comportamiento celular en desórdenes mitocondriales; estudio del seguimiento del grado de deterioro y/o mejoría de la reactividad linfocitaria en pacientes con cáncer; estudio del comportamiento celular en desórdenes mitocondriales; estudio de reacciones enzimáticas de consumo o producción de oxígeno y de modelos de enfermedades asociadas al estrés oxidativo; estudio del vínculo funcional entre desórdenes neurológicos y mecanismos de regulación bioenergética de células periféricas; estudio de las complicaciones diabéticas e inflamación; estudio de las técnicas de manipulación para la terapia celular reproductiva, regenerativa y terapéutica; estudio del efecto de formulaciones conteniendo nanopartículas y otros sistemas teranósticos sobre la función inmunológica básica de linfocitos animales; que se llevan a cabo en un cultivo seleccionado del grupo que consiste en cultivos con enzimas o sistemas enzimáticos dependientes de oxígeno, cultivos de células adherentes y cultivos celulares en suspensión de: orgánulos celulares, tejidos de animales modificados genéticamente o no; organismos eucariotas formados por una sola célula o por una colonia de células iguales entre sí sin diferenciación de tejidos y que viven en medios acuosos o en líquidos internos de organismos superiores, y organismos acuáticos completos.
20. Uso de un microsensor como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la medida directa *in vitro* de cinéticas de la concentración de oxígeno presente en líquidos orgánicos, en líquidos inorgánicos, en sus mezclas o en al menos una matriz biológica seleccionada de un grupo que consiste en suero, plasma, saliva, sudor, leche, exudado vaginal, semen, líquido pericárdico, líquido sinovial, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y líquido peritoneal, orina completa, sangre completa, orina o sangre diluidas en un medio seleccionado del grupo que consiste en: agua, suero fisiológico, suero de ternera, suero bovino fetal, suero de caballo, suero humano, solución salina equilibrada de Hank, RPMI 1640, medio basal de Eagle, medio mínimo esencial de Eagle, medio MEM modificado por Dulbeco, modificación de Iscove del medio DMEM, McCoy 5A, medio L-15 de Leibovitz, medio F-10 de Ham, medio F-12 de Ham, medio 199 y cualquiera de sus variantes.
21. Uso de un microsensor como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, para la liberación controlada de sustancias bioactivas.

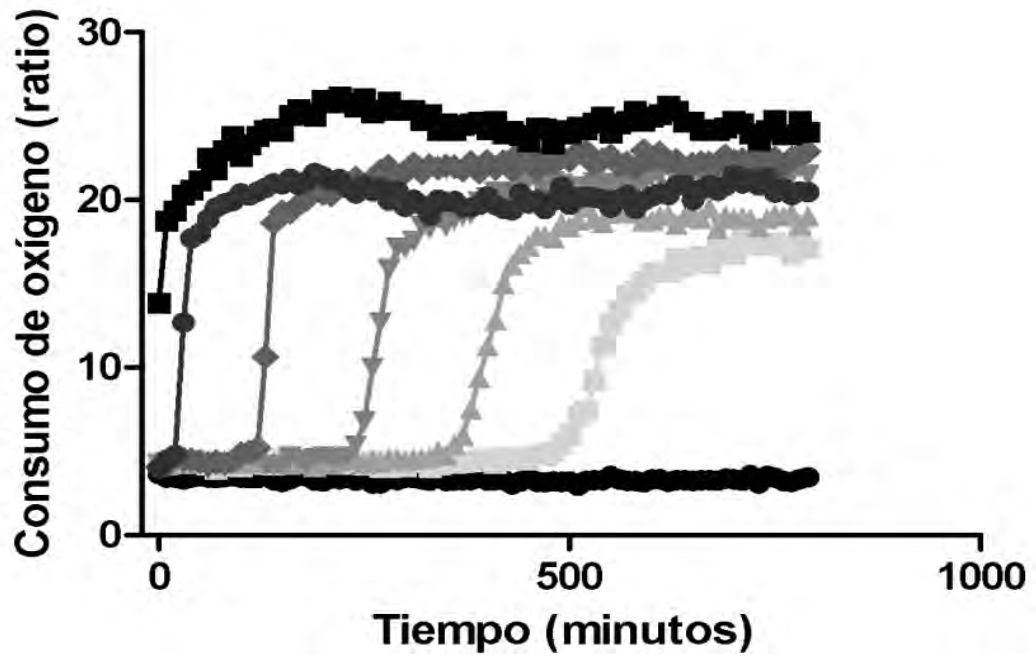


Fig. 1

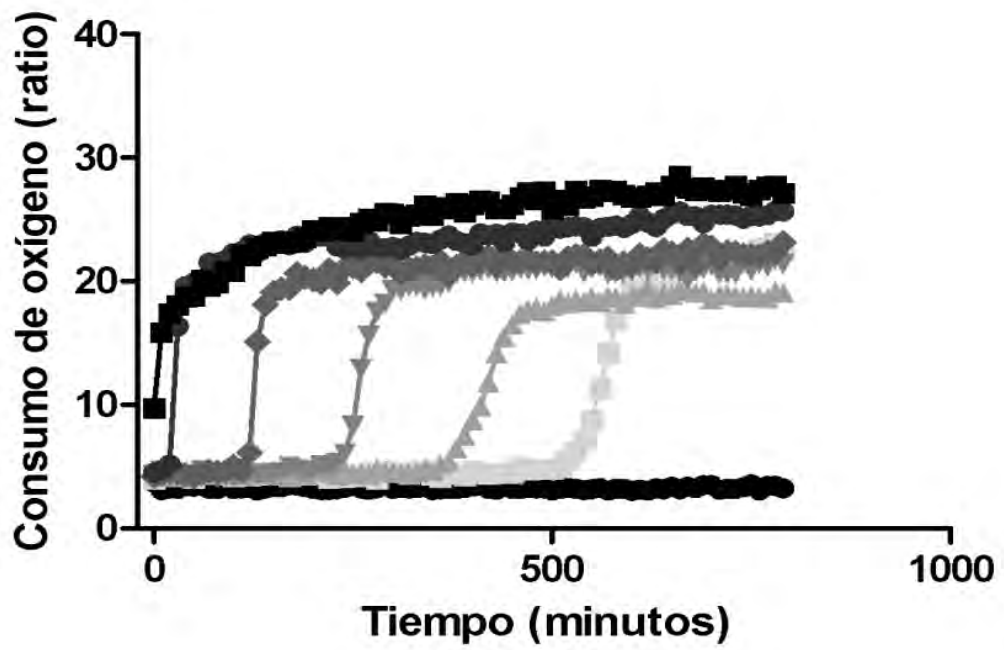


Fig. 2

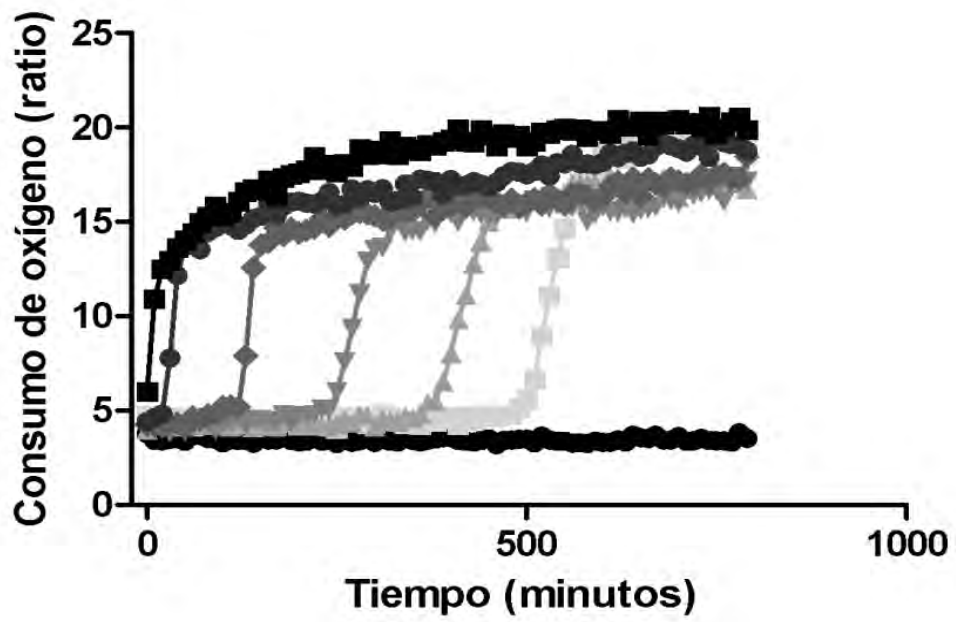


Fig. 3

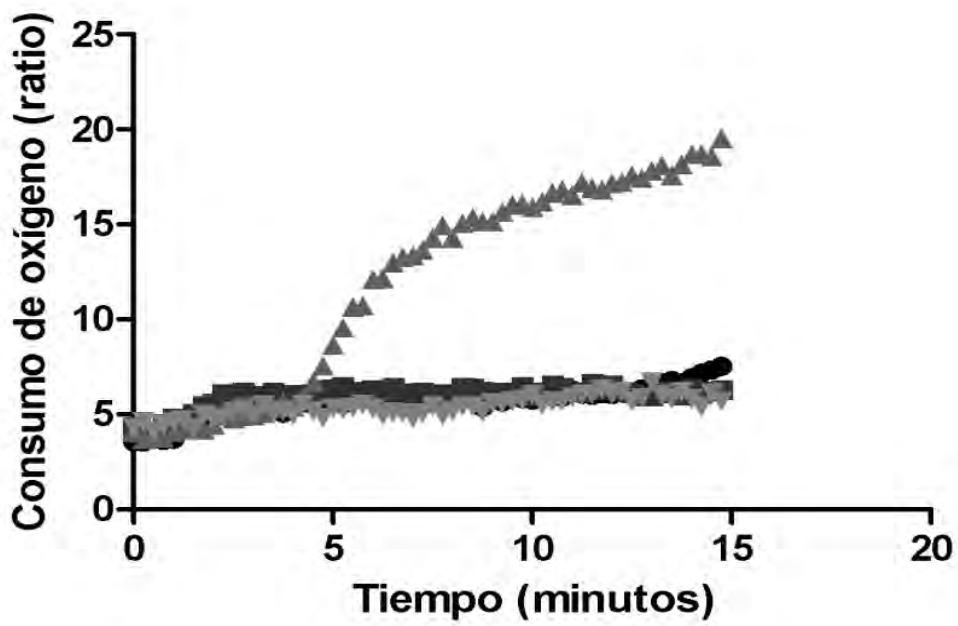


Fig. 4

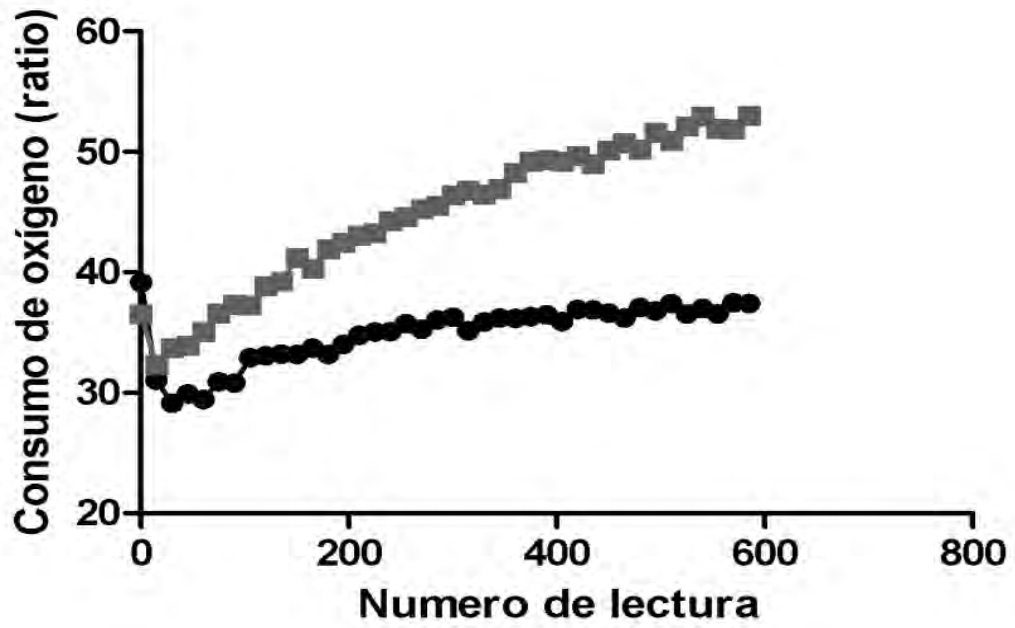


Fig. 5

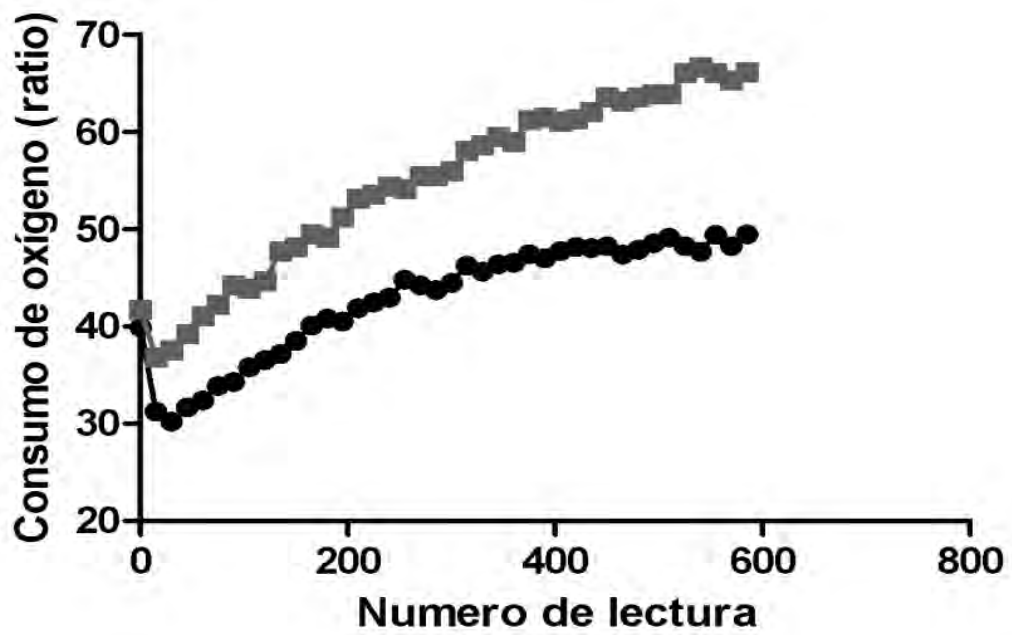


Fig. 6

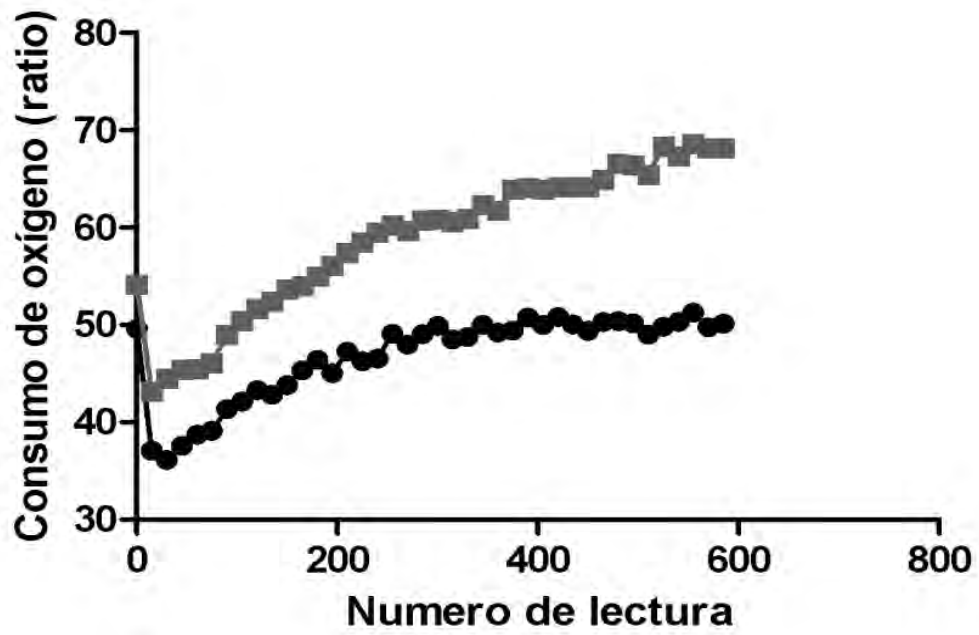


Fig. 7

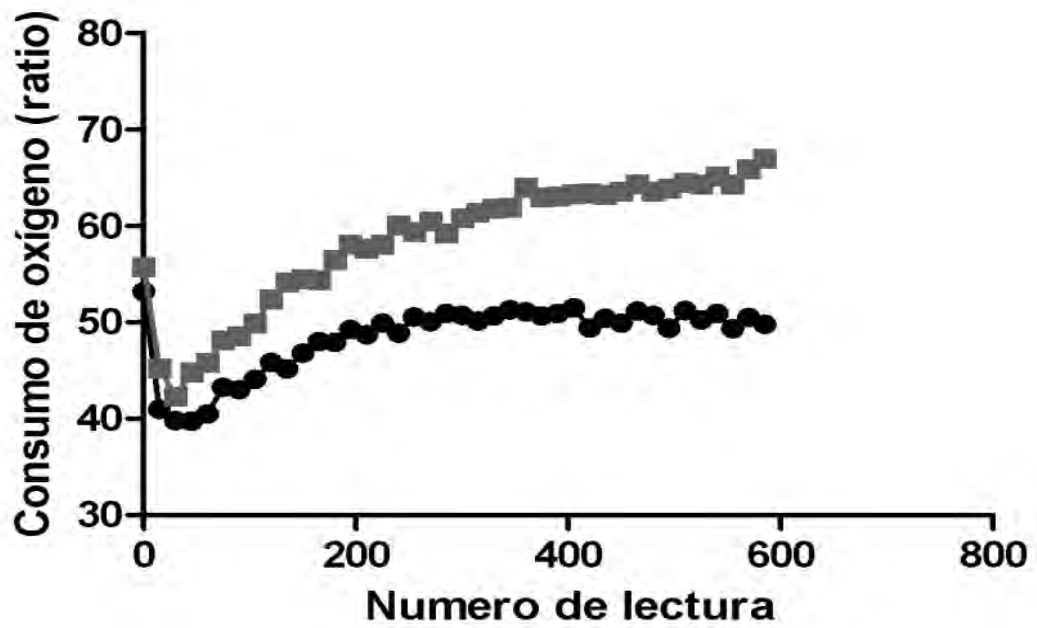


Fig. 8

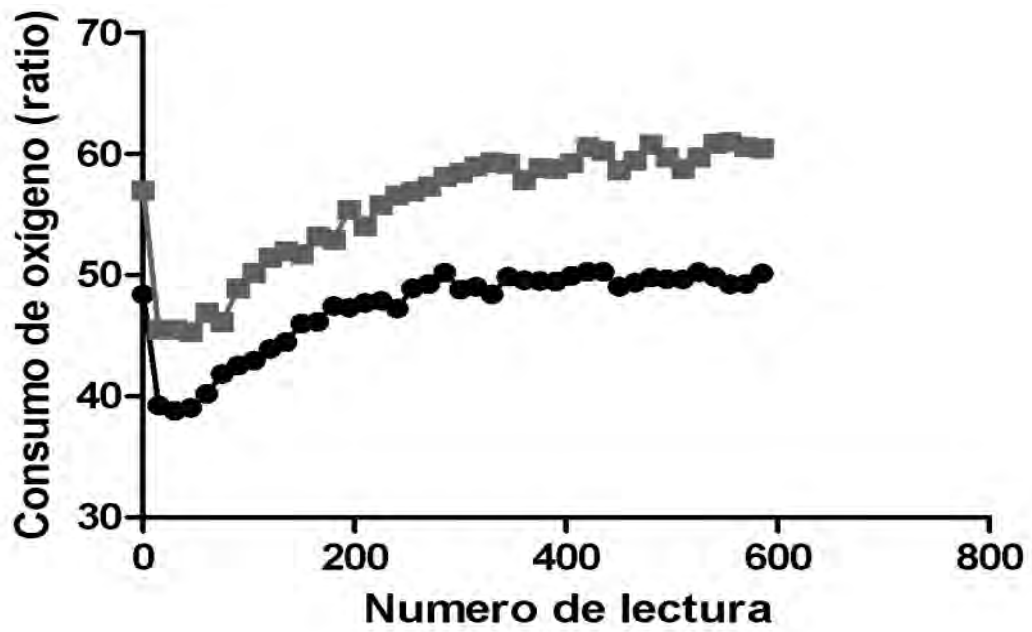


Fig. 9

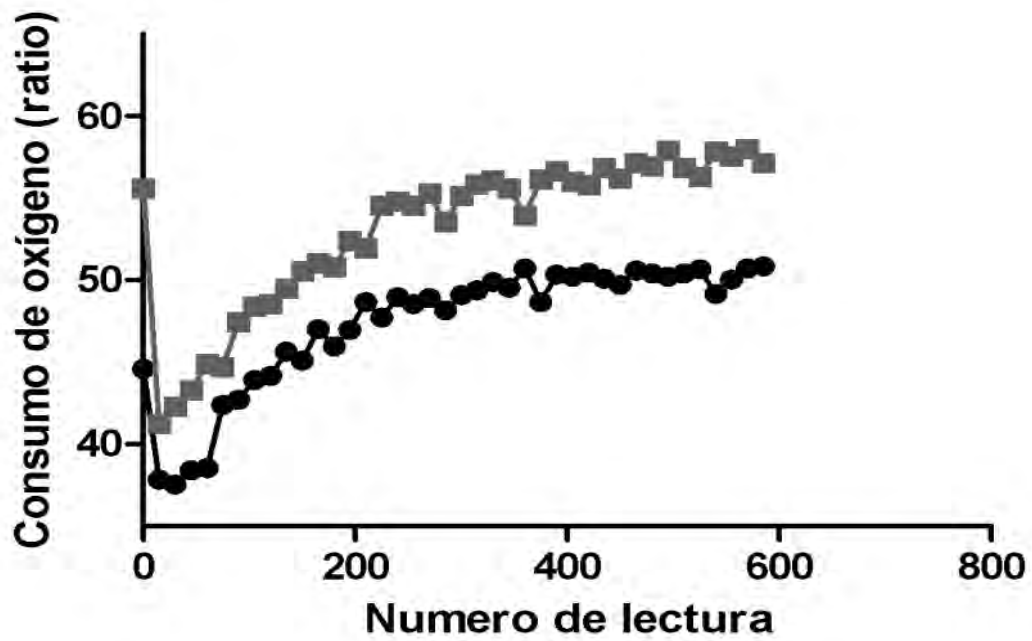


Fig. 10



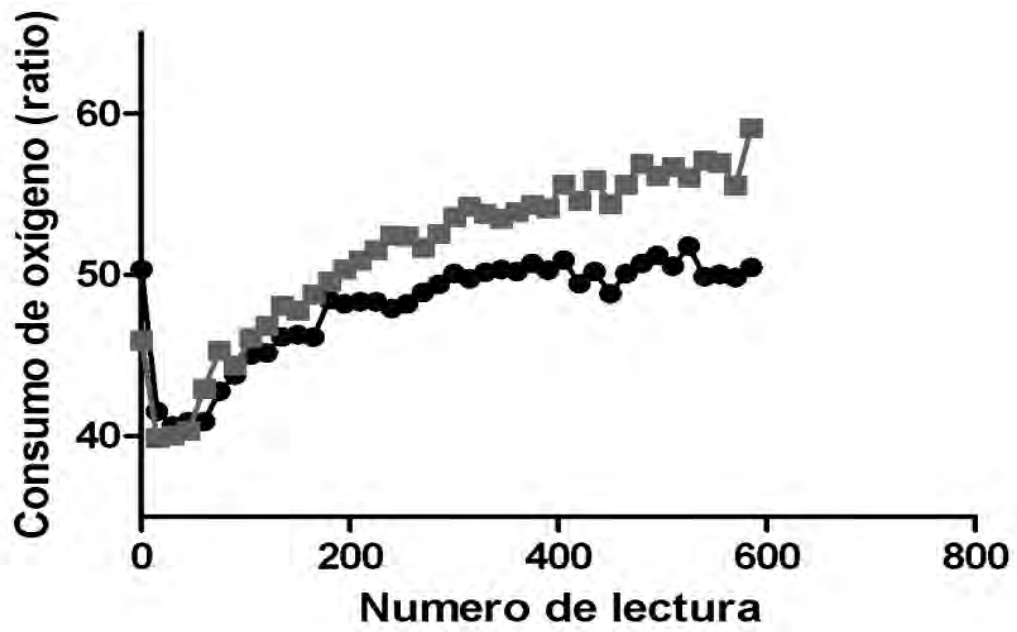


Fig. 11

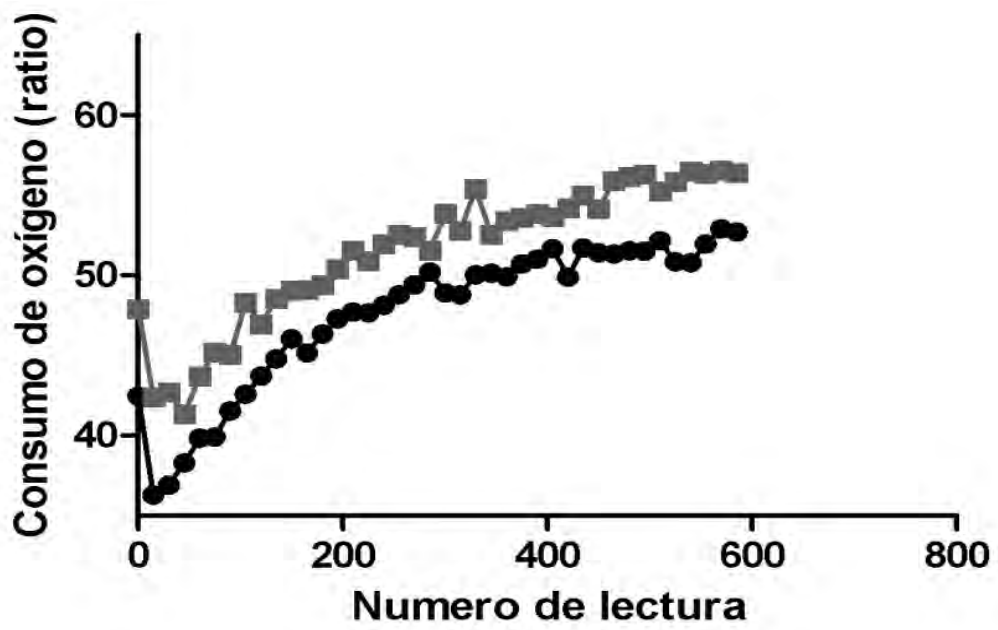


Fig. 12

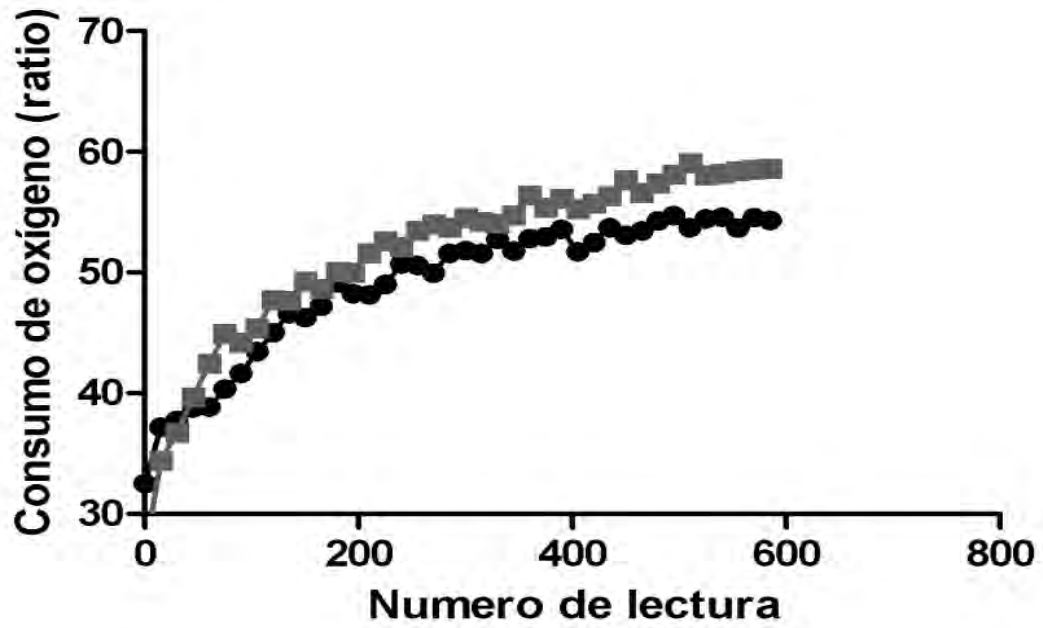


Fig. 13

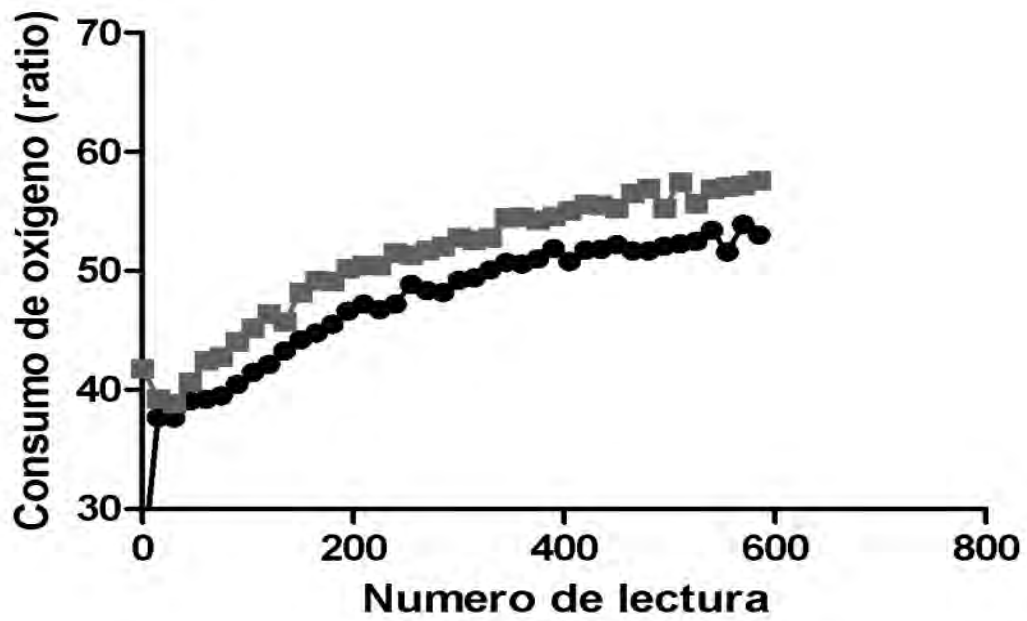


Fig. 14

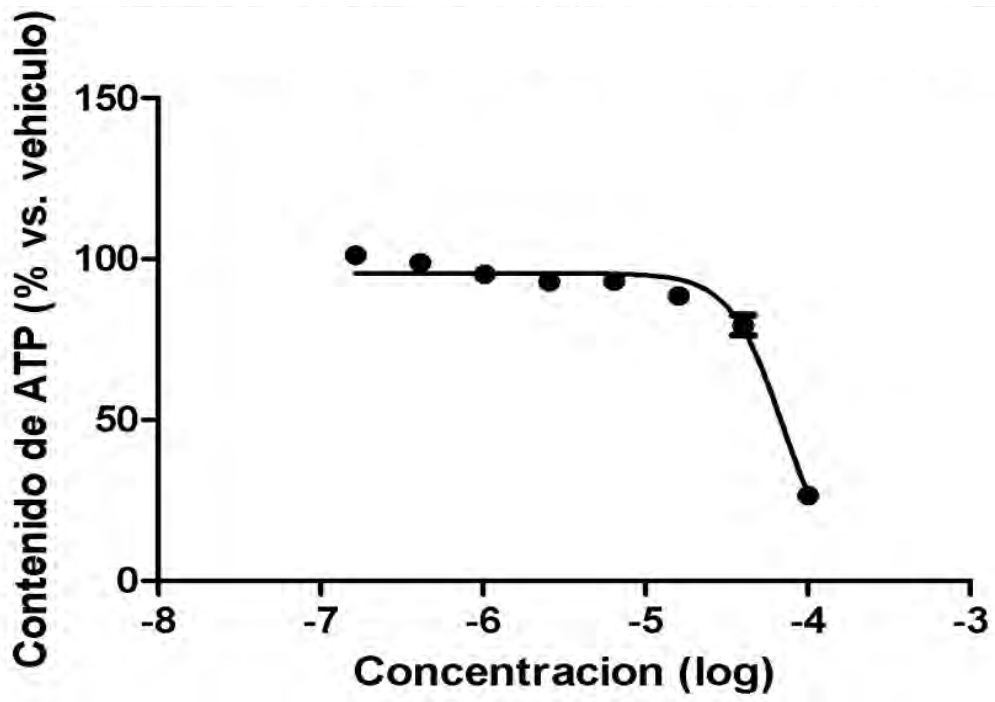


Fig. 15

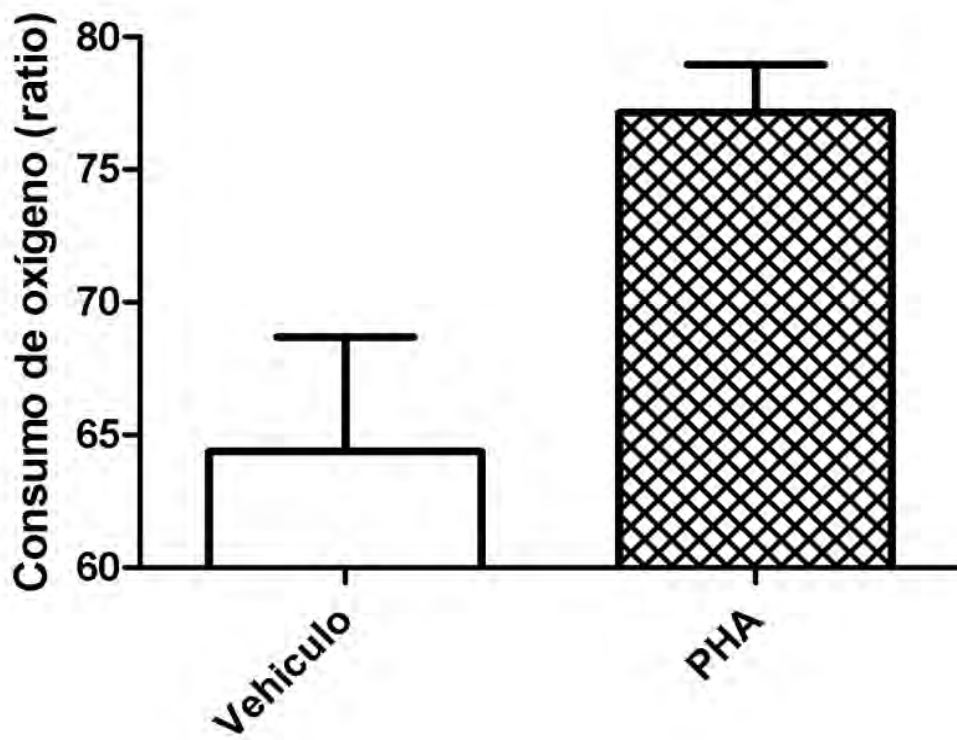


Fig. 16

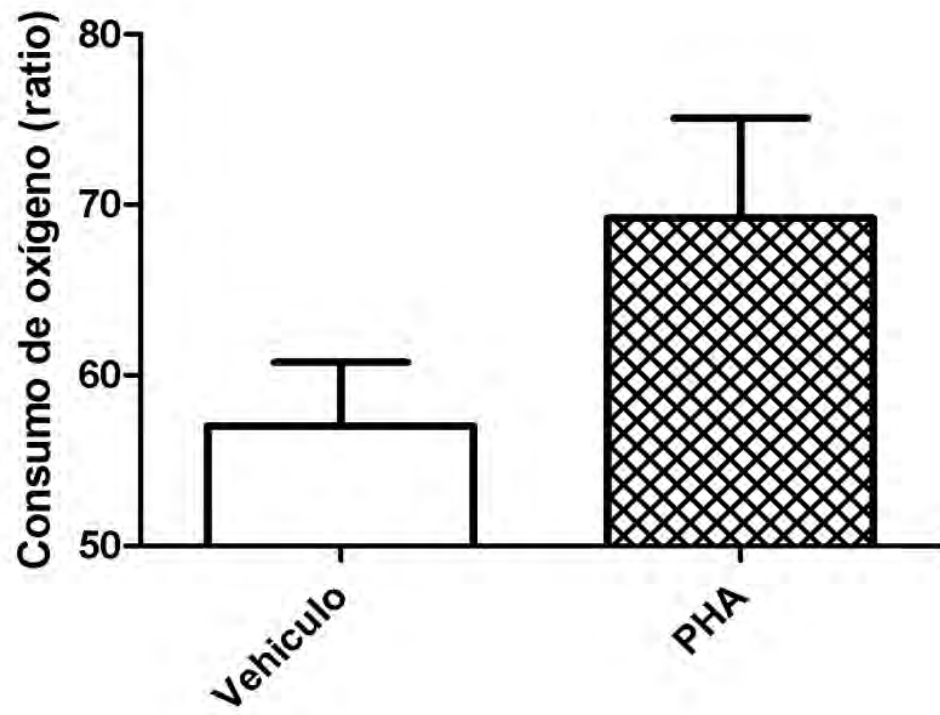


Fig. 17



- ②1 N.º solicitud: 201430899  
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 12.06.2014  
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2011086418 A1 (FORRY SAMUEL P ET AL.) 14/04/2011, párrafos 4, 7, 29, 37, 46 y 48; Ejemplos 1 y 2; párrafos 67-69.	1,4-9,19-21
Y		2, 10-18
Y	CHU, C. et al. "Highly sensitive fiber-optic oxygen sensor based on palladium tetrakis (4-carboxyphenyl)porphyrin doped in ormosil". Journal of Luminiscence, 2014, Vol. 154, páginas 475-478. Ver Resumen; Apartado 3.	2, 10-18
A	WO 9937998 A1 (BAYER AG ET AL.) 29/07/1999, Página 6, líneas 1-15; página 15, líneas 3-6.	1-21
A	US 2004171094 A1 (KLIMANT INGO ET AL.) 02/09/2004, párrafos 1 y 21.	1-21
A	CHU, C. et al. "Enhanced oxygen sensing properties of Pt(II) complex and dye entrapped core-shell silica nanoparticles embedded in sol-gel matrix". Talanta 2010, Vol. 82, páginas 1044-1051. Ver Resumen; Apartado 3.4.	1-21
A	LEE, S. et al. "Porphyrin-doped sol-gel glass as a probe for oxygen sensing". Analytica Chimica Acta, 1997, Vol. 342, páginas 181-188. Ver Resumen; Apartado 3.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
16.04.2015

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N21/64** (2006.01)

**G01N33/483** (2006.01)

**C12M1/34** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BD-TXT, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.04.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-4, 7-18, 21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 5, 6 y 19-20	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 3	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2, 4-21	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2011086418 A1 (FORRY SAMUEL P et al.)	14.04.2011
D02	CHU, C. et al. "Highly sensitive fiber-optic oxygen sensor based on palladium tetrakis (4-carboxyphenyl)porphyrin doped in ormosil". Journal of Luminiscence, 2014, Vol. 154, páginas 475-478.	04.06.2014
D03	WO 9937998 A1 (BAYER AG et al.)	29.07.1999
D04	US 2004171094 A1 (KLIMANT INGO et al.)	02.09.2004

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a un microsensar químico polimérico de detección de oxígeno que comprende una placa de ensayo con una pluralidad de pocillos como sustrato y una película sensible al oxígeno depositada homogéneamente sobre la placa que está formada por una matriz polimérica derivada de silicio y una metalo-ftalocianina o una metalo-porfirina como sonda molecular fluorogénica.

El documento D01 divulga un sensor químico polimérico de detección de oxígeno en cultivos celulares formado por una placa de ensayo con pocillos recubierta con al menos una película polimérica formada por un polidimetilsiloxano u otro organosilicio polimérico que incorpora un fluoróforo uniformemente dispersado en dicho polímero. Como fluoróforos se utiliza la metalo-porfirina meso-tetra(pentafluorofenilporfina) - Pt (II) pudiéndose utilizar otros compuestos de rutenio o de platino sensibles al oxígeno. El sensor puede incorporar otra capa permeable al oxígeno e impermeable al fluoróforo o una tercera capa que facilite el depósito de los cultivos celulares como puede ser mediante una matriz extracelular de proteínas. La película polimérica sensible al oxígeno se preparó mezclando la metaloporfirina disuelta en tolueno con el prepolímero de polidimetilpolixilosano y un agente de curado, a continuación la mezcla de aplicó a un cubreobjeto mediante centrifugación y se dejó evaporar el disolvente a la vez que procede el curado del polímero. La película obtenida se aplica a la base de los pocillos de una placa de ensayo donde se añaden los cultivos celulares para su estudio (párrafos 4, 7, 29, 37, 46 y 48; Ejemplos 1 y 2; párrafos 62 y 68).

La invención tal y como está definida en las reivindicaciones 1, 5, 6, 19 y 20 de la solicitud carece de novedad a la vista de dicho documento D01 (Art. 6.1 LP 11/1986).

La invención definida en la reivindicación 2 de la solicitud se diferencia de lo divulgado en el documento D01 en que la sonda fluorogénica es una metaloporfirina funcionalizada con grupos carboxilato en lugar de una metaloporfirina funcionalizada con grupos fluor como recoge el documento D01. Aunque se reconoce novedad a la invención definida en dicha reivindicación no así actividad inventiva. La utilización de metaloporfirinas funcionalizadas con grupo carboxilos inmersas en un polixilosano es conocido en la preparación de sensores de oxígeno como recoge el documento D02 (Resumen), se considera que un experto en la materia dentro de una actividad rutinaria podría incorporar una carboxi-metaloporfirina como la recogida en el documento D02 al sensor definido en el documento D01 cara a la mejora de la actividad sensora de la placa con una razonable expectativa de éxito, dando lugar a la invención definida en la reivindicación 2 de la solicitud.

Por lo tanto, la invención definida en la reivindicación 2 de la solicitud carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

En relación a las reivindicaciones 10-18 de la solicitud, referentes al método de preparación del sensor, dicho método difiere de lo divulgado en el documento D01 en que la preparación de la película polimérica sensible al oxígeno que incorpora la placa se lleva a cabo mediante un proceso sol-gel.



El problema que trata de resolver la solicitud es mejorar la fijación del grupo fluoróforo a la matriz polimérica sin llevar a cabo uniones covalentes. Esto se resuelve en la solicitud preparando la película polimérica mediante un proceso sol-gel en el que el grupo fluorógeno se adiciona al sol derivado de óxidos de silicio, previo a una etapa de gelificación.

Este problema y su correspondiente solución se encuentra recogido en el documento D02 que divulga la fijación en una matriz polimérica de polixilosano, del fluorógeno carboxi-metaloporfirina de paladio mediante la preparación de un sol derivado de TEOS y octil-TEOS, adición de la porfirina y posterior gelificación (Resumen; Apartado 3).

En consecuencia, un experto en la materia podría preparar la película sensible al oxígeno tal y como se recoge en el documento D02 e incorporarla al sustrato definido en el documento D01 cara a la obtención de una placa sensora de oxígeno, dando lugar a la invención definida en las reivindicaciones 10-18 de la solicitud.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 10-18 de la solicitud carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

En relación a las reivindicaciones 4, 7-9 y 21 de la solicitud, referentes a la incorporación adicional en el sensor de otros metales, óxidos metálicos o sustancias bioactivas, se considera que no aportan características técnicas que en combinación con la reivindicación 1 de la que dependen le otorguen actividad inventiva. Estas son modificaciones de acabado conocidas en el estado en la técnica en el campo de los sensores y que constituyen alternativas que entrarían dentro de la práctica habitual del experto en la materia cara a la optimización del mismo, ver por ejemplo el documento D03 que divulga la incorporación de óxidos de titanio en sensores de oxígeno para prevenir la atenuación de la señal óptica (página 6, líneas 1-15; página 15, líneas 3-6) o el documento D04 que divulga la incorporación de biomoléculas en un sensor de oxígeno formado por una matriz polimérica y una porfirina como sonda fluorogénica (párrafos 1 y 21).

En consecuencia, la invención definida en las reivindicaciones 4, 7-9 y 21 de la solicitud carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Sin embargo, en relación a la reivindicación 3 de la solicitud, referente a la incorporación en concreto de la sonda fluorogénica 5,10, 15,20-tetrakis(4-carboxifenil) porfirina de Pt (II) en la placa sensora, sonda funcionalizada con grupos carboxilato y que incorpora Pt como metal, se considera que no resultaría evidente para un experto en la materia la incorporación de dicha metaloporfirina en concreto a la placa sin la necesaria experimentación, donde dicha sonda presenta una buena fijación a la matriz polimérica y confiere al sensor un buen nivel de detección oxígeno en ensayos biológicos.

Por lo tanto, la invención definida en la reivindicación 3 de la solicitud es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).