

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 207**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2011** **E 11793827 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2652500**

54 Título: **Biosensor competitivo de elevada sensibilidad**

30 Prioridad:

17.12.2010 EP 10195667

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.08.2016

73 Titular/es:

EYESENSE AG (100.0%)
Elisabethenstrasse 3
4051 Basel, CH

72 Inventor/es:

MÜLLER, ACHIM;
HERBRECHTSMEIER, PETER;
KNUTH, MONIKA y
NIKOLAUS, KATHARINA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 580 207 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biosensor competitivo de elevada sensibilidad

5 Descripción

La presente invención se refiere a las medidas a tomar para la determinación de la glucosa y para el diagnóstico de enfermedades que tienen como base un metabolismo trastornado de la glucosa. En particular, la presente invención se refiere a un dispositivo que comprende un hidrogel con una proteína intercalada dentro del mismo que tiene la propiedad de unirse a la glucosa, y un ligando de dicha "proteína que se une a la glucosa", en donde el hidrogel comprende una primera matriz de hidrogel a base de alginato y una segunda matriz de hidrogel, la cual forma una red interpenetrada dentro de la primera matriz de hidrogel. La descripción se refiere además al empleo de un hidrogel de este tipo para la determinación del contenido de glucosa de una muestra, así como al empleo para el diagnóstico de un metabolismo trastornado de la glucosa en voluntarios.

La determinación de la concentración de glucosa mediante una eficiente y fidedigna técnica de medición es de una gran importancia en muchos campos de la técnica. No solamente en la pura analítica de laboratorio, sino también en la industria de la alimentación, por ejemplo, en el campo de la enología, así como en el campo de la medicina, por ejemplo, el diagnóstico de enfermedades, las cuales han sido causadas por un metabolismo trastornado de la glucosa, por ejemplo, en la diabetes mellitus o el síndrome metabólico, la rápida y fidedigna determinación de la concentración de glucosa en soluciones preparadas, juega un papel principal. En el campo del diagnóstico de enfermedades, las cuales tienen como base un metabolismo trastornado de la glucosa, los sensores de glucosa se emplean tanto en dispositivos implantados en el cuerpo, los cuales miden el contenido en glucosa de una muestra tomada dentro del cuerpo, como también en sensores los cuales pueden medir ex vivo el contenido de glucosa de unas muestras de voluntarios.

Para la determinación del contenido de glucosa en una solución se han descrito distintos sistemas de molécula sensora y ligando, en donde el sensor es una proteína que tienen la propiedad de unirse a la glucosa y el ligando es un competidor de la glucosa, el cual está unido en el sensor en primer lugar con la molécula sensora de glucosa. En la competición con la glucosa durante el proceso de medición, el competidor de la "proteína que se une a la glucosa" está inhibido. La inhibición del competidor mediante la glucosa de "la proteína que se une a la glucosa" puede detectarse mediante el cambio de una propiedad física o química de la molécula, por ejemplo, por transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Los sistemas antes citados deben estar presentes naturalmente en una zona localizada del sensor.

Para la inclusión de los componentes del sistema, es decir, de la molécula que se une a la glucosa, y del ligando, el cual actúa como competidor, se han acreditado, entre otros, los hidrogeles. A este respecto, hidrogeles adecuados pueden ser los polietilenglicoles, pero también los alginatos (por ejemplo, las patentes US 2007 /0105176; US 6.485.703; Russell 1999, Anal Chem 71: 3126-3132). Además, han sido descritos sensores en los cuales los sistemas antes citados han sido incorporados en un medio acuoso mediante una membrana semipermeable. Dichas membranas pueden consistir por ejemplo en celulosa regenerada, polietilenglicol, capas "layer-by layer" ("capa a capa") (LBL) de poliuretano, polietersulfonas, capas de parileno, o sílice perforado (por ejemplo US 2007/0122829).

La patente DE 10 2007 024642 describe un implante de hidrogel para la comprobación por lo menos de un analito en el líquido del ojo. La publicación de Czimerova et al. (Journal of Colloid and Interface Science, vol 320, 2008, págs 140 - 151) describe la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre dos colorantes laser catiónicos en presencia de una serie de montmorillonitas de carga reducida, e investiga el efecto de la carga.

Los sensores de glucosa descritos en el estado actual de la técnica, presentan sin embargo una relativamente escasa actividad de glucosa. La actividad de glucosa y por lo tanto el rendimiento sensorial se determina decisivamente mediante las constantes de unión de los complejos de la "proteína que se une a la glucosa" y del competidor, así como de la "proteína que se une a la glucosa", y de la glucosa.

En el caso de sensores ex vivo, para obtener una sensibilidad de los sensores lo más alta posible, se puede escoger un receptor de analito con una constante de unión cualquiera más alta, puesto que el analito no debe ser liberado de nuevo, y se puede obtener mediante una constante de unión muy alta, la mayor parte de las veces, de una muy alta especificidad y por lo tanto un buen rendimiento sensorial.

En el caso de los sensores in vivo, la situación es sin embargo otra, puesto que el sensor debe reaccionar continuamente de forma reversible a los cambios de concentración del analito. Por lo tanto, la constante de unión no debe ser demasiado alta, puesto que el sensor ya en concentraciones de analito muy pequeñas estaría saturado y no podría mostrar los cambios de concentración. Además existe otra problemática de los sensores in vivo, que consiste en que el intervalo de concentración del analito permanece constante y no puede ser optimizado mediante dilución o concentración. En el estado actual de la técnica se describen esencialmente sistemas de ligando y "proteína que se une a la glucosa", en los cuales se tienen constantes de unión, medias. Una adecuación de la sensibilidad de la medición mediante el cambio de las concentraciones, bien de la "proteína que se une a la glucosa", o bien del ligando, o bien de ambos, está generalmente limitada por la escasa solubilidad de las

correspondientes moléculas. En los sensores descritos según el estado actual de la técnica citado anteriormente, tanto la sensibilidad de la medición como también la exactitud de la medición del sensor, están limitadas (ver Rounds 2007, J. Fluorec. 17: 57-63).

5 El objetivo de la presente invención es el de proporcionar un dispositivo que permita una más eficiente determinación del nivel de glucosa también in vivo y que obvie esencialmente los inconvenientes citados anteriormente. La invención se resuelve mediante las versiones descritas en las reivindicaciones, así como las versiones que se dan a conocer a continuación.

10 La invención se refiere por lo tanto a un dispositivo que comprende un hidrogel con una "proteína que se une a la glucosa" incorporada al mismo, y un ligando de la "proteína que se une a la glucosa", en donde el hidrogel comprende una primera matriz de hidrogel a base de alginato y una segunda matriz de hidrogel que está formada dentro de la primera matriz de hidrogel por una red interpenetrada.

15 En el caso del dispositivo según la invención se trata también de una composición que consta de los componentes anteriormente citados.

El concepto de "hidrogel" describe un polímero que contiene agua cuyas moléculas están ligadas química o físicamente a una red tridimensional. Las moléculas del polímero puede estar unidas entre sí por enlaces covalentes o iónicos o mediante un enmarañado o un entretejido a la red tridimensional. Los polímeros, los cuales forman el hidrogel, contienen de preferencia componentes polímeros hidrófilos, los cuales hacen posible la absorción de soluciones acuosas así como de grupos que están en situación de interreaccionar con la "proteína que se une a la glucosa".

25 Los hidrogeles según la invención se componen de una primera matriz de hidrogel a base de alginato, y de una segunda matriz de hidrogel, la cual está expandida en el alginato de la primera matriz de hidrogel, formando una red interpenetrante. Esta segunda matriz de hidrogel consta de preferencia de un polímero soluble en agua con por lo menos un grupo reticulable por molécula y con un peso molecular de máximo 500.000. Es particularmente preferido un peso molecular de como máximo 250.000, 200.000, 150.000, 100.000, ó 50.000. Se prefiere que la segunda matriz de hidrogel esté escogida del grupo formado por: polivinilalcoholes (PVAs), polietilenglicoles (PEGs), poli(2-oxazolinas, poliacrilamidas (por ejemplo, la dimetilacrilamida), polihidroxiacrilatos (por ejemplo el polihidroximetacrilato, la polihidroxiacrilamida, la polivinilpirrolidona), polímeros de (2-metil-3-etil[2-hidroxietil]), polihidroxialcanoatos (PHAs), poli(2-metil-2 oxazolinas), poli(2-etil-2 oxazolinas), poli(2-hidroxietil-2 oxazolinas), poli(2(1-(hidroximetil)-etil)-2 oxazolinas), poli-(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), poli-(hidroxietil-acrilato) (PHEA), polivinilpirrolidonas, poli-(dimetil) acrilamida, poli-(hidroxietil) acrilamida, polivinilalcoholes (incluidos copolímeros con acetato de vinilo y/o etileno), poli(etileno-co-vinilalcohol), poli(vinilacetato-co-vinilalcohol), poli(etileno-co-vinilacetato-co-vinilalcohol), polietilenglicoles y poli(etilenglicol-co-propilenglicol).

Una red interpenetrante según la invención, se obtiene de preferencia mediante la polimerización de monómeros del segundo polímero en presencia de un primer polímero ya existente. Con particular preferencia, esto se logra mediante procedimientos que están descritos con más detalle en los ejemplos de versiones. Con ello se logra que en la red existente del primer polímero pueda formarse ya una red interpenetrante del segundo polímero. Las redes de polímeros están también entretejidas entre si y/o enmarañadas. Por el contrario, coexisten diferentes polímeros en mezclas como redes separadas no entretejidas entre si ni enmarañadas.

45 Con particular preferencia, se diferencian los mecanismos de reticulación del primer y el segundo polímero, de manera que no aparece ningún reticulado mezclado. El alginato antes citado, el cual debe formar la primera matriz de hidrogel, se retícula mediante interacciones iónicas. Los segundos polímeros antes citados, que forman las redes interpenetrantes se retículan todos mediante polimerización radical o iónica.

50 Con particular preferencia, la segunda matriz de hidrogel se forma a base de polivinilalcohol. Es particularmente preferido el polivinilalcohol con un peso molecular de 10.000 a 100.000, con mayor preferencia de 10.000 a 50.000, con más preferencia de 10.000 a 20.000, con muy particular preferencia 15.000. Es particularmente preferido el polivinilalcohol que presenta un contenido en reticulación de máximo 0,5 mmoles/gramo, 0,4 mmoles/gramo, 0,35 mmoles/gramo ó 0,3 mmoles/gramo y muy particularmente preferido 0,35 mmoles/gramo. Además el polivinilalcohol presenta con particular preferencia un contenido en sólidos del prepolímero de menos del 40 por ciento en peso.

55 El hidrogel según la invención puede contener aditivos junto a la primera matriz de hidrogel y en la segunda matriz de hidrogel, como por ejemplo, estabilizadores, emulsionantes, antioxidantes, estabilizadores de ultravioleta, detergentes, y / o iniciadores de UV.

60 El hidrogel empleado según la invención puede además estar recubierto por otro material de recubrimiento, de preferencia semipermeable. Mediante este sistema de contención se evita un "sangrado" ("lixiviación") de los componentes de los sensores a partir del hidrogel. Como material de recubrimiento entran en consideración membranas semipermeables u otras matrices de hidrogel. Membranas semipermeables pueden ser de preferencia de celulosa regenerada, de polietilenglicol, de capas capa-a-capas de poliuretano (LBL), de polietersulfona, de capas

de parileno, o de sílice perforada. De preferencia, puede formarse otra matriz de hidrogel a base de un polímero, escogido del grupo formado por los alginatos, las sefarosas, el ácido hialurónico, el quitosano, los polivinilalcoholes (PVAs), los polietilenglicoles (PEGs), los carragenos y los polihidroalcanoatos (PHAs), las poli(2-metil-2 oxazolininas), las poli(2-etil-2 oxazolininas), las poli(2-hidroxietil-2 oxazolininas), las poli(2-(1-(hidroximetil)-etil)-2 oxazolininas), el poli(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), el poli(hidroxietilacrilato) (PHEA), las poli-vinilpirrolidonas, la poli(dimetil)acrilamida, la poli(hidroxietil)acrilamida, los polivinil alcoholes (incluidos los copolímeros con acetato de vinilo y/o etileno), el poli(etileno-co-vinilalcohol), el poli(vinilacetato-co-vinilalcohol), el polietileno-co-vinilacetato-co-vinilalcohol), los polietilenglicoles y el poli(etilenglicol-co-propilenglicol).

El concepto "proteína que se une a la glucosa" se refiere en el marco de la invención, a proteínas que son capaces de interaccionar específicamente con la glucosa. Si una proteína está en situación de interaccionar específicamente con la glucosa, puede detectarse simplemente por el experto mediante un ensayo de unión ya conocido en el estado actual de la técnica. Se prefiere en particular que la "proteína que se une a la glucosa" se escoja del grupo formado por las lectinas, las enzimas que se unen a la glucosa como sustrato, y los anticuerpos que reconocen específicamente a la glucosa. El concepto "proteína que se une a la glucosa" incluye también las moléculas subrogadas, que pueden reconocer específicamente a la glucosa, de preferencia los aptámeros, los cuales reconocen específicamente a la glucosa. Muy particularmente preferida es la "proteína que se une a la glucosa", la concanavalina A.

Secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos, las cuales codifican a las anteriormente citadas "proteínas que se unen a la glucosa", son ya conocidas en el estado actual de la técnica (Yamauchi 1990 FEBS Letters 260 (1): 127-130). En consecuencia, las proteínas anteriormente citadas pueden fácilmente ser obtenidas por el experto. Las proteínas mencionadas pueden por ejemplo obtenerse recombinantemente o pueden ser purificadas a partir de una fuente biológica. Además, dichas proteínas pueden también sintetizarse químicamente. La mayor parte de las proteínas anteriormente citadas pueden adquirirse comercialmente. Los anticuerpos o aptámeros, los cuales reconocen específicamente a la glucosa, pueden obtenerse fácilmente por el experto mediante métodos ya conocidos en el estado actual de la técnica para la obtención de anticuerpos o aptámeros.

Las "proteínas que se unen a la glucosa" citadas anteriormente y en particular la concanavalina A pueden presentar de preferencia también, modificaciones químicas, las cuales proporcionan una mayor solubilidad en comparación con las versiones sin modificar de la "proteína que se une a glucosa". Dichas modificaciones comprenden de preferencia, la funcionalización con un polímero soluble en agua, y pueden escogerse en una versión particularmente preferida, a partir del grupo compuesto por: peguación, acetilación, polioxazolinilación y succinilación.

La comprobación de la glucosa en una muestra para análisis tiene lugar en el dispositivo según la invención, mediante un desplazamiento del ligando unido a la "proteína que se une a la glucosa" mediante la glucosa contenida en la muestra (competición entre el ligando y la glucosa). De preferencia, el ligando tiene una menor afinidad para la "proteína que se une a la glucosa" que la glucosa. El desplazamiento puede de preferencia ser comprobado mediante el marcado del ligando con un colorante u otra molécula marcada, de comprobación. Como particularmente adecuados para la comprobación del desplazamiento se han acreditado ciertos colorantes u otras moléculas de marcado, las cuales cuando se aproximan a las moléculas unidas a ellas, provocan un cambio de por lo menos una propiedad física o químicamente medible. Sistemas adecuados comprenden aquellos en los cuales mediante una transferencia de energía entre las moléculas de colorante, o bien reprimen o bien generan una señal medible. Dichos sistemas basada en una transferencia de energía están descritos con más detalle por ejemplo en la patente WO 2001/13783. De preferencia se trata a este respecto de un sistema en el cual mediante el "efecto quenching" (efecto de "extinción") se reprime una señal de fluorescencia, cuando la molécula de colorante o la molécula de marcado - y con ello "la proteína que se une a la glucosa" y su ligando - están muy cerca. Después del desplazamiento del ligando por el analito, se cancela el "efecto quenching". Este efecto es comprobable mediante un cambio de la fluorescencia. Para la comprobación pueden por ejemplo emplearse los fotómetros de fluorescencia como se describen en la patente WO 2002/087429. Otros sistemas adecuados son los llamados sistemas de comprobación basados en la transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET). A este respecto se marcan con colorantes de fluorescencia dos componentes interaccionantes, como la "proteína que se une a la glucosa" y su ligando. Un componente es acoplado con un colorante aceptor, y el otro con un colorante dador. Mediante la interacción de los componentes, los colorantes entran en contacto, por lo cual el efecto FRET tiene lugar, y con ello es transferida la energía de excitación del colorante dador al colorante aceptor y con ello se mide una intensidad del colorante dador más baja. Tan pronto la interacción de los componentes se interrumpe, aumenta la intensidad de la fluorescencia del dador. En el caso del dispositivo según la invención, puede comprobarse en la glucosa un aumento de la intensidad de una señal, la cual se genera mediante el analito desde un colorante o una molécula marcadora después de la separación del complejo "proteína que se une a la glucosa" con el ligando.. El colorante o la molécula marcadora se acopla, o bien a "la proteína que se une a la glucosa", o bien al ligando. Por ejemplo un colorante dador puede ser acoplado a la "proteína que se une a la glucosa" o al ligando, en donde el componente no acoplado al colorante dador se acopla con un colorante aceptor apropiado. En un dispositivo según la invención configurado de esta manera se observa, antes de la aplicación a una muestra conteniendo glucosa, el efecto FRET como resultado de la unión del ligando a la "proteína que se une a la glucosa". Después de la

aplicación, la glucosa desplaza a los ligandos, de manera que la intensidad medida de la fluorescencia del colorante dador aumenta, por cierto, proporcionalmente a la cantidad de glucosa.

Birch et al. (Birch 2001, Spectrochimica Acta Part A 57: 2245-2254) han calculado la solución matemática del equilibrio químico para el caso de que la concanavalina A se emplee como "proteína que se une a la glucosa", y el dextrano se emplee como ligando. Las simulaciones con concentraciones variables de concanavalina A y dextrano han demostrado que la relación (dextrano /complejo conA-dextrano) depende sólo ligeramente de las concentraciones de partida y las constantes de unión K_{dex} y K_{gluc} son los principales factores para el rendimiento de los sensores.

Sorprendentemente, la estructura de los colorantes influye también sobre la actividad de glucosa. Así, según la invención, una combinación de un colorante de rodamina y un colorante de oxacina es claramente superior a la combinación empleada convencionalmente de un colorante de xanteno y un colorante de rodamina (FITC-TMR).

Se prefiere que la "proteína que se une a la glucosa", que se emplea en el marco de la invención esté unida a un colorante de oxacina. La manera en que se puede conseguir dicha unión ya es bien conocida por el experto y está descrita adecuadamente en el estado actual de la técnica. Es particularmente preferido el colorante de oxacina, un aceptor de oxacina, escogido del grupo formado por el ATTO 655, el ATTO 680, el azul EVO 10, el azul EVO 30, el azul EVO 90, y el azul EVO 100. Muy particularmente preferido se emplea el ATTO 680. Los llamados colorantes de oxacina puede adquirirse comercialmente.

El grado de marcado preferido (DOL, "degree of labeling") para la "proteína que se une a la glucosa", por ejemplo, la concanavalina A, es de 0,1 a 4, con mayor preferencia de 1 a 4 y con particular preferencia, de 1 a 3. En el caso de la concanavalina A le corresponde un DOL de 1, a saber, un mol de colorante por mol de concanavalina A tetrámero (MW = 104.000). En el caso de un DOL alto, y empleando colorantes relativamente no polares (típicamente colorantes de fluorescencia de onda larga), la "proteína que se une a la glucosa" está funcionalizada de preferencia con PEG. Un grado de peguiliación preferido es de 0,1 a 5 y un peso molecular preferido, es de 200 a 10.000, con particular preferencia de 800 a 8000, con más preferencia de 800 a 5000.

Mediante experimentos que toman como base el marco de la presente invención, se comprobó que las modificaciones químicas de "la proteína que se une a la glucosa" las cuales comunican una elevada solubilidad en comparación a las variantes sin modificar, pueden ser empleadas de manera ventajosa para conseguir un mejor grado de marcado en "las proteínas que se unen a la glucosa". En el caso de "las proteínas que se unen a la glucosa" modificadas según la presente invención, pueden lograrse más altos grados de marcado con un colorante que para las variantes sin modificar de las mismas. Para la proteína modificada concanavalina A pueden lograrse de preferencia, concentraciones mayores de 0,5 mg/(gramos de matriz), y con muy particular preferencia, entre 2 y 60 mg/(gramos de matriz). Sorprendentemente, la actividad de glucosa medida de la proteína concanavalina A modificada, es comparable con la de la concanavalina A nativa en el hidrogel.

La mayor solubilidad es en particular importante cuando "las proteínas que se unen a la glucosa" deben ser marcadas con colorante, puesto que las proteínas que se unen a la glucosa marcada con colorante, por ejemplo una concanavalina A modificada con un colorante de oxacina anteriormente citado, posee todavía una solubilidad reducida en solución acuosa. Cuanto más alto es el grado de marcado, tanto más baja es la solubilidad en solución acuosa. Es necesario un alto grado de marcado justamente para "las proteínas que se unen a la glucosa" como componentes de los sensores en el dispositivo según la invención.

El concepto "ligando" de la "proteína que se une a la glucosa" se refiere a una molécula que es capaz de formar un enlace específico con la "proteína que se une a la glucosa". Para ello, dicha molécula interacciona esencialmente en el mismo lugar de unión que la glucosa, de manera que la molécula unida puede ser desplazada por la glucosa del lugar de unión a la "proteína que se une a la glucosa". Moléculas apropiadas están estructuralmente emparentadas con la glucosa. De preferencia el ligando de la "proteína que se une a la glucosa" es un oligosacárido, una macromolécula glicosilada, por ejemplo, una proteína o un péptido glicosilado, o una nanopartícula glicosilada. Las moléculas antes citadas que pueden emplearse como ligando de la "proteína que se une a la glucosa", son ya conocidas en el estado actual de la técnica y pueden obtenerse fácilmente por el experto. Con particular preferencia se emplea como ligando de la "proteína que se une a la glucosa", un dextrano.

De preferencia, el ligando de la "proteína que se une a la glucosa" está acoplado en el dispositivo de la presente invención con un colorante de rodamina. Con particular preferencia pueden emplearse el ATTO 590, el ATTO 610, el ROX, el TMR, la rodamina G6, los colorantes Alexa de fluor rodamina ó el Dy 590, y con muy particular preferencia el ATTO 590.

El grado de marcado preferido (DOL) para los ligandos de la "proteína que se une a la glucosa", por ejemplo el dextrano, es de 0,00003 a 0,016 (moles de colorante) / (moles de subunidad), con particular preferencia de 0,00032 a 0,0065 (moles de colorante) / (moles de subunidad), y con muy particular preferencia de 0,0008 a 0,0035 (moles de colorante) / (moles de subunidad). El grado de marcado del ligando tiene igualmente una influencia sobre la

actividad de glucosa. Un pequeño grado de marcado conduce a una peor actividad de glucosa, así como también, si es demasiado alto.

De lo anteriormente dicho se deduce que en una versión preferida del dispositivo según la invención la "proteína que se une a la glucosa", es la concanavalina A. Con particular preferencia, la concentración de concanavalina A es superior a 0,5 mg/(gramos de matriz) y con muy particular preferencia entre 2 y 60 mg/(gramos de matriz). También presenta la concanavalina A modificaciones químicas, de preferencia mediante la peguillación, la acetilación, la polioxazolinilización o la succinilización, las cuales presentan una mayor solubilidad acuosa en comparación con la concanavalina A sin modificar. En una versión preferida, la "proteína que se une a la glucosa" está unida a un colorante de oxacina y el ligando de la "proteína que se une a la glucosa", a un colorante de rodamina. Con particular preferencia se emplea un sistema concanavalina A / dextrano en el dispositivo, en el cual el dextrano está unido a un colorante dador, de rodamina, y la concanavalina A está unida a un colorante aceptor, de oxacina. En el sistema preferido concanavalina A / dextrano, los componentes están de preferencia en una relación de masas (dextrano / con A) de 1:1 a 1:40, en donde la relación de masas se prefiere que esté próxima a 1:10.

Se ha comprobado en el marco de la presente invención, que la combinación de colorantes de oxacina con colorantes de rodamina produce una acción recíproca heterodímera entre los radicales del colorante, lo cual aumenta la actividad de glucosa. En consecuencia, se puede conseguir mediante el empleo de los colorantes aceptor oxacina y el dador rodamina, ya en solución acuosa, de preferencia una actividad de glucosa de 2,1 veces. En el hidrogel empleado en el marco de la presente invención se puede incluso conseguir un aumento de la actividad de glucosa de 2,6 veces.

En el marco de la presente invención se ha comprobado ventajosamente que el empleo de un hidrogel que consta de una primera matriz de hidrogel de alginato y una segunda matriz de hidrogel la cual se forma dentro de la primera como una red interpenetrante, está en situación de crear un ambiente para los componentes sensores, a saber la "proteína que se une a la glucosa" y los ligandos competitivos de la "proteína que se une a la glucosa", lo cual permite una eficiente determinación de la actividad de glucosa. Muchas preparaciones para la medición de la glucosa mediante la fluorescencia tienen éxito en solución, mientras que pierden su actividad cuando los componentes del sensor están incrustados en la matriz del hidrogel, puesto que la movilidad de los componentes del sensor están limitados (Rounds 2007, J. Fluorec. 17: 57-63; US 2007/0105176 A1). Sorprendentemente, en particular también con respecto a los cálculos de Birch et al. (Birch 2001, loc cit.), se pudo comprobar en el caso presente unas soluciones acuosas comparativas de hasta 2,6 veces la actividad aumentada. Mediante la elección de matrices de hidrogel apropiadas se pudo lograr un enriquecimiento de la "proteína que se une a la glucosa" muy por encima de sus límites de solubilidad en solución acuosa. La mejora de la solubilidad encontrada en el marco de la presente invención en las matrices de hidrogel empleadas según la invención, es atribuible a las particulares propiedades de la matriz de hidrogel en interacción con los componentes del sensor y en particular con las "proteínas que se unen a la glucosa", como la concanavalina A. En el caso de la concanavalina A pudo conseguirse, por ejemplo, una concentración unas 10 veces mayor en comparación con la concentración que se puede conseguir en una solución libre. Habitualmente, la solubilidad del componente receptor en una solución libre, recibe todavía una influencia negativa con la adición del ligando, puesto que el complejo receptor / competidor debido a su tamaño y a menudo también debido a las multivalencias presenta una escasa solubilidad. Cuando por ejemplo, un complejo concanavalina A/dextrano en solución, con una relación de masas de 1:10 empieza a dar mal resultado ya a partir de una concentración de concanavalina A de 0,5 mg/(gramos de solución), pueden ajustarse concentraciones de concanavalina A, por encima de los 50 mg/(gramos de matriz) en un hidrogel adecuado con la misma relación de masas. A consecuencia de ello, el intervalo de concentraciones que pueden emplearse se amplía unas 100 veces. Esto tiene una particular importancia para las aplicaciones, en las cuales la concentración de analito permanece fija y no puede adecuarse mediante diluciones o por concentración. Estas dificultades aparecen justamente en las aplicaciones in vivo, como la determinación del nivel de glucosa en los líquidos corporales. La concentración del analito glucosa, en el caso in vivo, no debe adecuarse a las condiciones específicas del ensayo sino que debe darse por sentado.

Otro problema de la disolución aparece particularmente en las aplicaciones in vivo de sensores biológicos. Debido a la gran longitud de onda disminuye la propia fluorescencia del tejido, de manera que en las aplicaciones in vivo se emplean colorantes de fluorescencia de gran longitud de onda. Estos colorantes de fluorescencia son sin embargo típicamente apolares debido a su estructura molecular y tamaño (sistemas conjugados),. Cuando la "proteína que se une a la glucosa" se marca con un colorante de este tipo disminuye adicionalmente la solubilidad, de manera que tampoco son posibles altos grados de marcado. Como ya se ha descrito anteriormente puede ser necesario que la "proteína que se une a la glucosa" se funcionalice, por ejemplo, con polietilenglicol para conseguir una mayor solubilidad y unido a ello un mayor grado de marcado. La funcionalización con polietilenglicol (peguillación) conduce en solución generalmente, a una actividad de glucosa fuertemente reducida, por ejemplo en la concanavalina A nativa (actividad relativa de glucosa de 0,4 ó inferior). Sorprendentemente se comprobó en el marco de la presente invención que en el hidrogel del dispositivo según la invención no aparece este empeoramiento. Más bien pueden lograrse las actividades de glucosa para la concanavalina A funcionalizada con polietilenglicol, las cuales son comparables con las de la concanavalina A nativa (actividad relativa de glucosa = 2,2 ó respectivamente 2,6). Además se descubrió que la actividad de glucosa mediante el aumento del grado de marcado en la concanavalina A

puede aumentarse adicionalmente en un hidrogel como se emplea en el dispositivo de la presente invención. De esta manera se logró sorprendentemente en el hidrogel enriquecido mediante el aumento del grado de marcado en la concanavalina A funcionalizada con polietilenglicol, incluso doblar la actividad de glucosa. En comparación con la medición en solución la actividad de glucosa aumenta en el hidrogel del dispositivo según la invención hasta 4,3 veces. El empleo del hidrogel en el dispositivo según la invención permite ajustar pues la relación de concentraciones entre la "proteína que se une a la glucosa" así como a sus ligandos, las cuales permiten actividades de glucosa en los correspondientes grados de marcado, las cuales son mayores alrededor de unas 4 veces frente a las concentraciones ajustadas en las soluciones acuosas. Esto permite de manera ventajosa también el empleo del dispositivo según la invención en condiciones, en las cuales la concentración del analito no puede ser ajustada a las condiciones del ensayo.

Para la determinación de la concentración de la glucosa en condiciones in vivo, por ejemplo en los diabéticos, debe prepararse una concentración de analito de 50 a 500 mg/dl. Dicha solución puede lograrse fácilmente con los dispositivos según la invención. Los dispositivos pueden a este respecto emplearse como sensores ex vivo. En el caso de las aplicaciones descritas in vivo puede colocarse el dispositivo sensorial por ejemplo subcutáneamente, en el ojo, por ejemplo debajo de la conjuntiva, o en otros lugares del cuerpo que permitan una evaluación de las actividades de glucosa medidas.

La invención se refiere en consecuencia también a un hidrogel en el que están incorporados una "proteína que se une a la glucosa", y un ligando de la "proteína que se une a la glucosa", en donde el hidrogel comprende una primera matriz de hidrogel a base de alginato y una segunda matriz de hidrogel la cual forma en el interior de la primera matriz de hidrogel una red interpenetrante, para emplear en la determinación del contenido de glucosa en una muestra.

Bajo el concepto "muestra" se comprende en el marco de la presente invención una composición, de preferencia una composición acuosa, de la que se sospecha, o se sabe, que contiene glucosa. De preferencia se trata en el caso de la muestra de una muestra biológica. Con particular preferencia se trata de la muestra de un líquido corporal, en particular de un líquido de un tejido (por ejemplo, líquido intersticial), sangre, plasma, suero, linfa, saliva, líquido lacrimal, sudor u orina. Con particular preferencia se trata en el caso de la muestra, de un líquido de un tejido, sangre, suero o plasma.

Cuando la muestra es un material biológico, por ejemplo un líquido corporal, puede obtenerse de preferencia, a partir de un voluntario que presenta un metabolismo trastornado de la glucosa, el cual está confirmado o bien se sospecha del mismo. El dispositivo según la invención puede emplearse en consecuencia para el diagnóstico ex vivo de enfermedades o trastornos del metabolismo de la glucosa, en particular para el diagnóstico de la diabetes mellitus o el síndrome metabólico. Además, el dispositivo según la invención se utiliza no solamente para el diagnóstico sino que también puede emplearse para la monitorización del nivel de glucosa. El dispositivo permite con ello también el apoyo de decisiones terapéuticas, por ejemplo, un tratamiento con insulina, las cuales deben prescribirse como respuesta a un cambio en el nivel de glucosa.

El dispositivo según la invención puede incorporarse para el empleo ex vivo, por ejemplo a placas de microtitulación, en las cuales se fija. Se aplican las muestras que han de medirse, y a continuación pueden ser medidas en un dispositivo lector. Una disposición de este tipo permite la simultánea medición de un gran número de muestras y en consecuencia es económico en particular en los diagnósticos clínicos.

En el marco del empleo in vitro, la descripción se refiere también a un procedimiento para la determinación de la cantidad de glucosa en una muestra, la cual contiene efectivamente glucosa o se sospecha que la contiene, el cual procedimiento comprende los pasos siguientes:

- (a) puesta en contacto del dispositivo según la invención con la muestra durante un tiempo y en condiciones que permiten la unión de la glucosa contenida en la muestra a la "proteína que se une a la glucosa" del dispositivo, y
- (b) determinación de la cantidad de ligandos desplazados por la glucosa en el dispositivo, con lo cual se determina la cantidad de glucosa.

El procedimiento descrito anteriormente puede comprender todavía otros pasos. Por ejemplo, pueden efectuarse otros pasos para la preparación de la muestra, como por ejemplo la obtención del suero a partir de la sangre entera. Pueden efectuarse otros pasos para relacionar las cantidades determinadas con respecto a los cambios patológicos del metabolismo de la glucosa. Para ello, la cantidad determinada puede compararse con unas cantidades de referencia, las cuales son indicativas de determinados estados patológicos, como por ejemplo, la diabetes mellitus o el síndrome metabólico. Dichos procedimientos pueden emplearse a continuación también para diagnósticos in vitro de la diabetes mellitus o del síndrome metabólico. El procedimiento, o respectivamente los pasos aislados del mismo, pueden efectuarse automatizados, como por ejemplo, mediante la implementación por computador y / o por sistemas robóticos.

Muestras apropiadas que pueden ser analizadas mediante el procedimiento descrito anteriormente, se describen con más detalle en otro lugar de la descripción.

El concepto "cantidad" se refiere tanto a la determinación de cantidades absolutas como también de cantidades relativas. La determinación de las cantidades absolutas puede efectuarse de preferencia mediante una curva de calibración, que se obtiene con el procedimiento a partir de los valores de medición para cantidades conocidas de glucosa. Cantidades relativas en el sentido de la invención son cantidades, las cuales se establecen en relación a sus parámetros de normalización. Se comprende que en el marco del procedimiento también pueden determinarse parámetros los cuales mediante operaciones matemáticas pueden derivarse de los valores de las cantidades determinadas.

La puesta-en-contacto debe hacer posible en el marco del procedimiento, la penetración en el dispositivo de la muestra y con ello la glucosa contenida en la misma. Además, la-puesta-en-contacto debe hacer posible la competición de la glucosa con el ligando en la "proteína que se une a la glucosa", la cual está incrustada en el dispositivo.

La comprobación del desplazamiento del ligando tiene lugar en el procedimiento ventajosamente, mediante la medición del aumento de la intensidad de la fluorescencia emitida por un colorante dador, como ya se ha descrito en otra parte. El aumento resulta del desplazamiento del ligando de la "proteína que se une a la glucosa", puesto que la intensidad de la fluorescencia del colorante dador en el complejo con la "proteína que se une a la glucosa" está reducida. Se comprende sin embargo, que pueden ser empleadas también otras técnicas de comprobación para la liberación del ligando.

Junto a las aplicaciones "ex vivo" anteriormente descritas y procedimientos "ex vivo" del dispositivo de la invención, la invención se refiere también al dispositivo según la invención anteriormente descrito para su empleo en el diagnóstico de un metabolismo de glucosa trastornado, en un voluntario. De preferencia, el trastorno del metabolismo de la glucosa está causado por una diabetes mellitus o por el síndrome metabólico.

En el caso del empleo in vivo descrito del dispositivo, éste se introduce en el cuerpo. A este respecto, debe tenerse en cuenta que la medición del nivel de glucosa es también la base para el diagnóstico, dando por supuesto que el dispositivo entra en contacto con un líquido corporal, el cual contiene la glucosa, en donde la concentración de glucosa en el líquido es representativa del nivel de glucosa que hay que determinar. Los líquidos corporales adecuados se enumeran en otro lugar de la descripción. Particularmente preferido es el líquido corporal, líquido tisular. El dispositivo introducido en el cuerpo genera a continuación una señal que puede ser evaluada para el establecimiento del diagnóstico.

El dispositivo se introduce de preferencia en lugares del cuerpo, los cuales permiten la medición óptica de la señal generada por el dispositivo. Son apropiados aquellos lugares con escaso grueso del tejido entre el dispositivo y la superficie corporal o con tejidos transparentes, los cuales pueden ser bien atravesados por la señal generada. Particularmente preferido, es el dispositivo colocado debajo de la piel (subcutáneo) o en el ojo, por ejemplo, debajo de la conjuntiva. Los correspondientes procedimientos para el implante del dispositivo son ya conocidos en el estado actual de la técnica.

Alternativamente, la señal producida por el dispositivo puede ser enviada fuera del cuerpo mediante un medio de transmisión adecuado. Para ello, se emplea un material conductor de la señal como un cable flexible, por ejemplo, un cable de fibra de vidrio. La transmisión de la señal puede sin embargo también tener lugar sin contacto, por ejemplo con rayos infrarrojos o señales de radio. Se comprende que en este caso la señal generada por el dispositivo en primer lugar debe ser leída por un detector, el cual debe estar instalado también en el dispositivo o por lo menos en su proximidad, y convertida en una señal electromagnética, por ejemplo una señal de radio. Esta señal electromagnética puede ser recibida por un receptor situado fuera del cuerpo, y evaluada a continuación.

Además, la presente invención se refiere a un dispositivo según la invención, como se ha descrito más arriba, para emplear en la determinación de la necesidad de tomar medidas terapéuticas en un voluntario con el metabolismo de la glucosa trastornado.

En correspondencia, las medidas terapéuticas comprenden aquellas medidas que se emplean para el tratamiento de la diabetes mellitus o del síndrome metabólico. A este respecto junto a la prescripción de medicamentos, por ejemplo, la insulina, puede también decidirse la ejecución de otras medidas terapéuticas, sobre la causa del metabolismo trastornado de la glucosa que se ha determinado, como por ejemplo intervenciones terapéuticas, por ejemplo operaciones de bypass gástrico u otros hábitos de vida, por ejemplo, la puesta en práctica de dietas especiales.

En el marco de la aplicación anteriormente descrita del dispositivo, puede éste también estar acoplado a otro dispositivo más, por ejemplo un dispositivo que controle la administración de un medicamento. De manera preferida, el dispositivo puede en la presente invención, a este respecto, estar acoplado a un dispositivo para la administración de insulina. La administración de insulina puede controlarse por la necesidad de la misma, determinada por el dispositivo según la invención. Un cambio determinado en el dispositivo según la invención del nivel de glucosa en una muestra, se traduce a este respecto, por ejemplo, en una unidad de proceso de datos en el propio dispositivo de

administración, en una instrucción, la cual determina la necesidad de administración de insulina. Esta instrucción indica la administración de insulina en sangre el tiempo que sea necesario y la cantidad necesaria.

Los empleos del dispositivo según la invención más arriba descrito, permiten con ello un eficiente diagnóstico ex vivo e in vivo, del nivel de azúcar en sangre y con ello el temprano reconocimiento de enfermedades que se adquieren con un metabolismo trastornado, o respectivamente por el empleo en el marco de una monitorización clínica también la gestión de dichas enfermedades. Los dispositivos son en este contexto también apropiados para tomar decisiones terapéuticas basadas sobre los resultados diagnósticos determinados. La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos de versiones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de sensores para la determinación de la glucosa

Obtención de partículas de hidrogel (matriz enriquecida)

1 gramo de sal sódica del ácido alginico se disuelve en 100 gramos de agua con agitación. En un vaso de 5 litros se disuelven 66,2 gramos de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ en 4931,3 gramos de agua.

La solución de alginato se transporta mediante una bomba a una tobera de dos pasos. Al mismo tiempo se inyecta en la segunda entrada de la tobera, aire comprimido, de forma que la solución de alginato se pulveriza en finas gotitas. Las gotitas se conducen mediante una corriente de aire a un baño con una solución de cloruro de calcio, en donde se gelifican y se depositan en el fondo. Las bolas gelificadas son finalmente recogidas.

Obtención de sensores en la matriz enriquecida:

Las bolas de alginato se incuban consecutivamente en una solución de concanavalina A marcada con colorante y una solución de dextrano marcada con colorante. A continuación, las bolas cargadas se centrifugan y la solución que sobrenada se separa por decantación. Las bolas cargadas se incuban eventualmente a continuación durante la noche en una solución de un segundo polímero (por ejemplo, a base de PVA, PEG), y eventualmente se separan mediante centrifugación. A continuación se mezclan las bolas en una solución acuosa de un polímero reticulado fotoquímicamente. Esta mezcla se reticula a continuación con luz UV, para evitar el lixiviado de los componentes del sensor de las bolas de alginato.

Las cantidades se ajustan según la concentración del analito a medir y el grado de marcado se elige en función de la intensidad deseada de la señal de fluorescencia. Como polímero reticulado fotoquímicamente, pueden emplearse por ejemplo el polímero Nelfilcon, un polivinilalcohol modificado con grupos acrilamida. Para el reticulado fotoquímico se añade todavía un 0,1% de Irgacure 2959. La solución acabada se dosifica en formas adecuadas y se endurece con luz UV.

Obtención de sensores y de la matriz no enriquecida:

La solución de concanavalina A marcada con un colorante y la solución de dextrano marcada con un colorante, se añaden sucesivamente a una mezcla de prepolímeros a base de agua y se agita durante 3 horas. Las cantidades se ajustan según la concentración del analito a medir y el grado de marcado se elige en función de la deseada intensidad de la señal de fluorescencia. Como prepolímero reticulado fotoquímicamente puede emplearse por ejemplo el polímero Nelfilcon, un polivinilalcohol modificado con grupos acrilamida. Para el reticulado fotoquímico se añaden todavía 0,1% de Irgacure 2959. La solución acabada se dosifica en formas adecuadas y se endurece con luz UV.

Ejemplo 2: Determinación de la actividad de glucosa para los sensores

Determinación de la actividad de glucosa en los sensores:

El espectro de fluorescencia de los sensores se determina con diferentes concentraciones de glucosa. El cambio de las intensidades de la fluorescencia del dador al aumentar el contenido de glucosa sirve como medida para la eficacia del sensor de glucosa. Puesto que en un sensor de glucosa in vivo deben medirse concentraciones de glucosa entre 50 y 500 mg/dl, la actividad de glucosa se calcula de la siguiente manera:

$$GA = (\text{intensidad}_{500 \text{ mg/dl}} - \text{intensidad}_{50 \text{ mg/dl}}) / \text{intensidad}_{50 \text{ mg/dl}}$$

Como valores de respuesta y para una mejor comparación, se normaliza con respecto a la respuesta del mismo sistema en solución. Para la determinación de la actividad relativa de la glucosa se divide la actividad de glucosa de los sensores (en la matriz) por la actividad de glucosa en solución.

$$GA_{rel} = GA \text{ (matriz)} / GA \text{ (en solución)}$$

Determinación de la actividad de glucosa en solución:

La solución de conA y la solución de dextrano se diluyeron en solución tampón y se agitó durante varias horas. El espectro de fluorescencia de la solución se determinó a diferentes concentraciones de glucosa. El cambio de las intensidades de la fluorescencia del dador al aumentar el contenido de glucosa sirve como medida para la eficacia del sistema. Puesto que debe medirse una concentración de glucosa in vivo del sensor de glucosa, entre 50 y 500 mg/decilitros, se calcula la actividad glucosa de la siguiente manera:

$$GA = (\text{intensidad}_{500\text{mg/dl}} - \text{intensidad}_{50\text{mg/dl}}) / \text{intensidad}_{50\text{mg/dl}}$$

Ejemplo 3: Determinación de la influencia de la matriz

Según la invención, "la proteína que se une a la glucosa" y el ligando, se incorporan a una matriz de hidrogel, la cual presenta una cierta interacción con la "proteína que se une a la glucosa". A este respecto, la matriz de hidrogel se elige de tal forma que la interacción entre "la proteína que se une a la glucosa" y la matriz de hidrogel, sea mayor que entre "la proteína que se une a la glucosa" y la solución acuosa (enriquecimiento de los componentes del sensor). Por otro lado, la interacción entre "la proteína que se une a la glucosa" y el analito (glucosa) no se puede dañar sin embargo por la interacción entre "la proteína que se une a la glucosa" y la matriz de hidrogel.

Al efectuar una adecuada elección de la matriz de hidrogel, se produce por la interacción entre "la proteína que se une a la glucosa" y la matriz de hidrogel, un enriquecimiento de "la proteína que se une a la glucosa" en la matriz muy por encima del límite de solubilidad de "la proteína que se une a la glucosa" en solución acuosa. En el caso de la conA pueden por ejemplo lograrse concentraciones de hasta 10 veces la de la solución libre. Todavía se hacen más patentes los problemas de solubilidad después de la adición del ligando (por ejemplo dextrano) puesto que el complejo "proteína que se une a la glucosa" y ligando, debido a su tamaño y a menudo también debido a las multivalencias, presenta una escasa solubilidad. Cuando el complejo conA - dextrano en solución con una relación de masas de 1 : 10 ya a partir de una concentración de conA de 0,5 mg/g empieza a fallar, pueden ajustarse en una matriz de hidrogel adecuada con la misma relación de masas, concentraciones de conA - por encima de los 50 mg/g. Mediante la matriz de hidrogel, el intervalo de concentraciones utilizable de "la proteína que se une a la glucosa", por ejemplo la conA, puede ser aumentado unas 100 veces.

Puesto que en la utilización in vivo, el intervalo de concentración del analito permanece fijo y no puede adecuarse por ejemplo mediante una dilución o una concentración, las concentraciones de "proteína que se une a la glucosa" y el ligando deben adecuarse al intervalo de concentraciones in vivo del analito. A menudo se presenta sin embargo la dificultad de que por lo tanto, las concentraciones de "proteína que se une a la glucosa" y / o las concentraciones de ligando, sería necesario que sobrepasaran el límite de solubilidad.

En el sistema conA - dextrano en solución, puede, por ejemplo, ajustarse solamente una concentración de conA de 0,5 mg/g con una relación de masas (dex : conA) de 1: 10, puesto que de otra manera, el complejo conA - dextrano empieza a precipitar. La actividad de glucosa alcanzada con esta concentración (GA) se establece aquí para la determinación de la actividad relativa de glucosa (GA relativa) igual a 1. Como era esperado, la actividad de glucosa de la matriz no enriquecida, debido a la escasa movilidad de los componentes del sensor, disminuye hasta la mitad (GA relativa = 0,52). En la matriz enriquecida se obtiene a la misma concentración casi la misma respuesta como en solución (GA relativa = 0,83). En la matriz enriquecida pueden ajustarse sin embargo también, concentraciones de conA esencialmente mayores. A una concentración de conA de 10 mg/g se obtiene en la matriz de hidrogel enriquecida una actividad de glucosa alrededor de 2,6 veces superior (ver tabla 1).

Tabla 1: Influencia de la matriz

	En solución	En la matriz no enriquecida	En la matriz enriquecida	En la matriz enriquecida
Concentración de conA	0,5 mg/g	0,5 mg/g	0,5 mg/g	10 mg/g
GA relativa	1	0,52	0,83	2,55
ConA nativo con DOL = 1, dextrano con 0,001 moles de colorante (FS) por mol de subunidad de dex (UE), relación de masas dex : conA = 1:10				

Ejemplo 4: Determinación de la influencia de la concentración del receptor

En la matriz enriquecida se ve claramente una dependencia de la actividad de glucosa de la concentración de partida de la "proteína que se une a la glucosa" y del ligando. Al aumentar la concentración se obtiene un aumento de la actividad de glucosa. En concentraciones muy altas del receptor disminuye de nuevo la actividad de glucosa. La concentración de conA óptima para un ensayo in vivo está entre 8 y 20 mg de conA / gramos de matriz (ver tabla 2).

Tabla 2: Influencia de la concentración del receptor

Conc de conA (mg/g)	0,5	10,0	13,3	30	52,2
Actividad relativa de glucosa (GA rel)	0,83	2,55	2,76	2,14	1,76
ConA nativo con DOL = 1, dextrano con 0,001 moles de colorante (FS) por mol de subunidad de dex (UE), relación de masas, dex : conA = 1:10)					

Ejemplo 5: Determinación de la influencia del grado de marcado del receptor

- 5 Debido a la propia decreciente fluorescencia de alta longitud de onda del tejido, deben emplearse en las aplicaciones in vivo, colorantes de fluorescencia de onda larga. Estos colorantes de fluorescencia son típicamente muy no polares debido a los sistemas conjugados más grandes. Cuando la "proteína que se une a la glucosa" se marca con estos colorantes, entonces disminuye su solubilidad, de manera que como precipitan a menudo, no es posible ningún alto grado de marcado. Para aumentar la solubilidad de "la proteína que se une a la glucosa", es ventajoso que ésta sea funcionarizada, por ejemplo, con polietilenglicol. Con ello aumenta la solubilidad de "la proteína que se une a la glucosa", con lo cual es posible conseguir mayores grados de marcado en la síntesis.

- 10 Sin embargo, la ConA peguilada conduce en solución, solamente a menos de la mitad de la actividad de glucosa de la conA nativa (GA relativa = 0,4). Sorprendentemente, no aparece en la matriz de hidrogel este empeoramiento. Se obtiene con la PEG-conA una actividad de glucosa similar a la de la conA nativa (GA relativa = 2,2 frente a 2,6) (ver tabla 3).

Tabla 3: Influencia del grado de marcado (DOL)

DOL de conA		1	1
Tipo		Nativa	peguilada
Solución, c = 0,5 mg de conA/g	GA relativa	1	0,43
Matriz, c = 10 mg de conA/g	Ga relativa	2,55	2,22

- 20 Mediante la peguilación es posible disponer de una conA con un alto grado de marcado de un colorante de fluorescencia de onda larga, el cual en solución es estable por largo tiempo y no precipita. Sorprendentemente, no se ha observado en la matriz enriquecida en comparación con la solución, ningún empeoramiento de la actividad de glucosa debido a la peguilación. Solamente por el efecto positivo de la matriz es posible emplear en un ensayo PEG-conA con un alto grado de marcado en altas concentraciones.

- 25 Asombrosamente, la actividad de glucosa puede aumentarse adicionalmente mediante un aumento del grado de marcado en la conA. En la matriz de hidrogel enriquecida se logra con la conA con DOL = 2,5, casi el doble de la actividad de glucosa (GA relativa = 4,3 frente a 2,6). En una comparación directa con la medición en solución, la actividad de glucosa en la matriz mediante el efecto combinado de concentración y DOL aumenta incluso unas 4,3 veces (ver tabla 4)

Tabla 4: Influencia del grado de marcado (DOL)

DOL de conA		1	1	2,5*	2,5
tipo		nativa	peguilada	nativa*	peguilada
Solución, c = 0,5 mg de conA/g	GA relativa	1	0,43		1,03
Matriz, c = 10 mg de conA/g	GA relativa	2,55	2,22		4,28

* La ATTO680 – conA nativa con un DOL de >1,5 no es estable en solución y precipita

Ejemplo 6: Determinación de la influencia de los colorantes de fluorescencia

- 35 La estructura de los colorantes de fluorescencia que están unidos a "la proteína que se une a la glucosa" o respectivamente al ligando, tiene igualmente una influencia sobre la actividad de glucosa. Como particularmente adecuada se ha acreditado una combinación de un colorante de rodamina y un colorante de oxacina. Para el sistema conA-dextrano es particularmente preferido un dador de rodamina (por ejemplo ATTO 590-dextrano ó ATTO 610-dextrano, ROX-dextrano) , y un aceptor de oxacina (por ejemplo ATTO 655-conA ó ATTO 680-conA, azul Evo30-conA). Al contrario del convencionalmente empleado, el sistema TMR-conA / FITC-dextrano (combinación xanteno - rodamina), se obtiene con ello en solución una actividad de glucosa 2,1 veces, y en la matriz enriquecida incluso una actividad de glucosa 2,6 veces. En una pareja de colorantes rodamina-oxacina puede aparecer una interacción de heterodímeros entre los colorantes, lo cual refuerza la actividad de glucosa (ver tabla 5 y 6).

- 45

Tabla 5: Influencia de los colorantes

Colorante conA		ATTO 680	TMR
Colorante dextrano		ATTO 590	FITC
DOL conA		2,5*	2,3
Tipo		nativo*	nativo

Solución, c = 0,5 mg de conA / g	GA relativa	2,4	1,17
Actividad relativa en comparación con el sistema convencional FITC/TMR		2,05	1
Matriz, c = 10 mg de conA / g	GA relativa	4,92	1,9
Actividad relativa en comparación con el sistema convencional FITC/TMR		2,59	1
Valores correspondientes extrapolados a base de los valores experimentales con PEG-conA : FITC-dextrano con 0,01 moles de FS / mol de UE. Relación de masas dex : conA = 1:10			

Tabla 6: Influencia de los colorantes

		ATTO590/ATTO680	ROX/Evoblue30
Matriz, c = 10 mg de conA/g	GA relativa	2,55	2,1
conA nativa con DOL =1, dextrano con 0,001 moles de colorante (FS) por mol de subunidad de dextrano (UE), relación de masas dex : conA = 1:10			

Ejemplo 7: Determinación de la influencia de la constitución de la matriz del hidrogel

La actividad de glucosa depende también de la constitución de la matriz del hidrogel. La matriz del hidrogel puede estar constituida por un polímero o por una mezcla de varios polímeros. Se ha descrito como ventajosa una matriz de hidrogel a base de alginato o de una mezcla de un alginato y un hidrogel de polivinilalcohol. El hidrogel de alginato hace posible mediante su interacción con el conA y el dextrano, el enriquecimiento de los componentes del sensor a altas concentraciones.

El prepolímero del 2º hidrogel (por ejemplo PVA) puede penetrar en las bolas de alginato y después de su reticulación formar una red interpenetrante con el alginato. El ancho de malla de la red interpenetrante influye en la movilidad de las moléculas de "la proteína que se une a la glucosa" y del ligando y con ello también la actividad de glucosa. Los anchos de malla pueden estar influidos por el tipo, el peso molecular, el contenido de sólidos del polímero así como la proporción de los grupos de reticulación, lo cual determina el número de puntos nodales. Un contenido pequeño de grupos de reticulación conduce a una mayor actividad de glucosa. Reduciendo a la mitad los grupos de reticulación, la actividad aumenta incluso unas 1,5 veces. En comparación con el sistema en solución, la actividad puede incluso tener una mejora de 4,2 veces la actividad de glucosa, sin experimentar un aumento del grado de marcado en la conA (ver tabla 7).

Tabla 7: Influencia del contenido de reticulación

Contenido de reticulación (mmoles/g)	0,486	0,33	0,26
GA relativa	2,76	4,04	4,24
conA nativa (13 mg/g) con DOL = 1, dextrano con 0,001 moles de colorante (FS) por mol de subunidad de dex (UE), relación de masas dex : conA = 1:10			

El contenido en sólidos de la red tiene igualmente una influencia sobre la actividad de glucosa. Cuanto mayor es el contenido en sólidos tanto más pequeña es la actividad de glucosa (ver tabla 8).

Tabla 8: Influencia del contenido en sólidos

Prepolímero FG	25%	30%	35%	40%
GA relativa	2,87	2,76	2,48	1,96
conA nativa (13 mg/g) con DOL = 1, dextrano con 0,001 moles de colorante (FS) por mol de subunidad de dex (UE), relación de masas dex : conA = 1:10				

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo que comprende un hidrogel con "una proteína que se une a la glucosa" incorporada al mismo y un ligando de "la proteína que se une a la glucosa", en donde el hidrogel comprende una primera matriz de hidrogel de alginato, y una segunda matriz de hidrogel, la cual forma dentro de la primera matriz de hidrogel una red interpenetrante.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en donde la segunda matriz de hidrogel consta de un polímero soluble en agua con por lo menos un grupo reticulado por molécula y un peso molecular máximo de 500.000.
3. Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, en donde la segunda matriz de hidrogel se escoge del grupo compuesto por polivinilalcoholes (PVAs; incluyendo los copolímeros con vinil acetatos y / o etileno), polietilenglicoles (PEGs), y polihidroxialcanoatos (PHAs), poli (2-metil-2 oxazolinas), poli (2-etil-2 oxazolinas), poli (2-hidroxietil-2 oxazolinas), poli (2-(1-(hidroximetil)-etil)-2 oxazolinas), poli-(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), poli-(hidroxietilacrilato) (PHEA), poli-vinilpirrolidonas, poli-(dimetil)acrilamida, poli-(hidroxietil)acrilamida, poli(etileno-co-vinilalcohol), poli(vinilacetato-co-vinilalcohol), poli(etileno-co-vinilacetato-co-vinilalcohol), y poli(etilenglicol-co-propilenglicol).
4. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la primera y / o la segunda matriz de hidrogel son capaces de interreaccionar con "la proteína que se une a la glucosa".
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde "la proteína que se une a la glucosa" se escoge del grupo formado por: lectinas, enzimas, las cuales unen a la glucosa como sustrato, anticuerpos, los cuales reconocen específicamente la glucosa, y aptámeros que reconocen específicamente la glucosa.
6. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ligando de "la proteína que se une a la glucosa" es un oligosacárido, una macromolécula glicosilada o una nanopartícula glicosilada.
7. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde "la proteína que se une a la glucosa" es la concanavalina A.
8. Dispositivo según la reivindicación 7, en donde la concentración de concanavalina A es mayor de 0,5 mg /(g de matriz).
9. Dispositivo según la reivindicación 8 en donde la concentración de concanavalina A está entre 2 y 60 mg/(g de matriz).
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la concanavalina A presenta una solubilidad elevada mediante una modificación química en comparación con la concanavalina A sin modificar.
11. Dispositivo según la reivindicación 10, en donde la modificación se escoge del grupo compuesto por: peguiliación, acetilación, succinilación y polioxazolinilación.
12. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 11, en donde "la proteína que se une a la glucosa" está ligada con un colorante de oxacina, y el ligando de "la proteína que se une a la glucosa" está ligado con un colorante de rodamina.
13. Hidrogel con "una proteína unida a la glucosa" colocada en su interior, y un ligando de "la proteína que se une a la glucosa", en donde el hidrogel comprende una primera matriz de hidrogel a base de alginato y una segunda matriz de hidrogel, la cual está dentro de la primera matriz de hidrogel, y forma una red interpenetrante, para emplear en la determinación del contenido de glucosa de una muestra.
14. Hidrogel para emplear en la determinación del contenido de glucosa de una muestra según la reivindicación 13, en donde la muestra ha sido conseguida de un voluntario, el cual presenta un metabolismo trastornado de la glucosa, o bien se sospecha que presenta un metabolismo trastornado de la glucosa.
15. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 12 para emplear en el diagnóstico de un metabolismo trastornado de la glucosa, en un voluntario.
16. Hidrogel para emplear en la determinación del contenido de glucosa en una muestra según la reivindicación 13 ó 14, ó dispositivo para emplear en el diagnóstico de un metabolismo trastornado de glucosa en un voluntario según la reivindicación 15, en donde el metabolismo trastornado de la glucosa ha sido causado por la diabetes mellitus o el síndrome metabólico.

17. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 12 para emplear en la determinación de la necesidad de una medida terapéutica en un voluntario con el metabolismo de la glucosa trastornado.