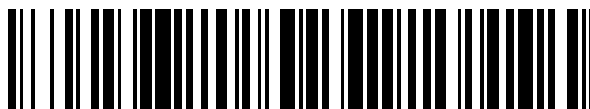


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 458**

51 Int. Cl.:

G01N 33/66 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2011** **PCT/EP2011/072622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO12080258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2011** **E 11793841 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016** **EP 2652510**

54 Título: **Uso de hidrogeles para biosensores con sensibilidad elevada**

30 Prioridad:

17.12.2010 EP 10195668

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

09.12.2016

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 2 593 458 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

Uso de hidrogeles para biosensores con sensibilidad elevada

- 5 La presente invención se refiere al uso de un hidrogel a base de polímero que comprende al menos un polímero soluble en agua en un sensor para el enriquecimiento de una proteína de unión a glucosa disuelta, en el que el al menos un polímero puede interaccionar con la proteína de unión a glucosa y en el que la proteína de unión a glucosa se encuentra en un complejo con un ligando.
- 10 La determinación de la concentración de glucosa mediante una técnica de medición eficiente y fiable es de gran importancia en muchos campos de la técnica. No solo en la analítica de laboratorio pura, sino también en la industria alimentaria, por ejemplo en el campo de la enología, así como en el campo de la medicina, por ejemplo en el diagnóstico de enfermedades que se provocan por un metabolismo de glucosa alterado, por ejemplo diabetes mellitus o síndrome metabólico, la determinación rápida y fiable de la concentración de glucosa desempeña un papel
- 15 fundamental en soluciones predeterminadas. En el campo del diagnóstico de enfermedades que se basan en el metabolismo de glucosa alterado, se usan sensores de glucosa tanto en dispositivos que pueden implantarse en el cuerpo y pueden medir el contenido en glucosa en una muestra tomada dentro del cuerpo, como en sensores que miden *ex vivo* el contenido en glucosa en una muestra de un sujeto de prueba.
- 20 Para la determinación del contenido en glucosa en una disolución se han descrito sistemas de molécula de sensor y ligando, siendo el sensor una proteína de unión a glucosa y el ligando un competidor por la glucosa que, en el sensor, se encuentra en primer lugar unido a la proteína de unión a glucosa. Mediante competición con glucosa durante el proceso de medición se desplaza el competidor por la proteína de unión a glucosa. El desplazamiento del competidor por la glucosa por la proteína de unión a glucosa puede detectarse en este caso por medio de una
- 25 variación de una propiedad física o química de las moléculas, por ejemplo por medio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los sistemas mencionados anteriormente deben encontrarse, naturalmente, en una zona espacialmente limitada del sensor.
- 30 Para la inclusión de los componentes de sistema, es decir de la proteína de unión a glucosa y del ligando, en medio acuoso, se usan membranas semipermeables. Las membranas de este tipo pueden componerse por ejemplo de celulosa regenerada, polietilenglicol, poliuretano, capas layer-bilayer (LBL) (capa-bicapa), polietersulfonas, capas de parileno o sílice perforada (véase por ejemplo el documento US2007/0122829). Como alternativa, se emplean también hidrogeles que, en cambio, se incluyen habitualmente también por una membrana adicional (véase por ejemplo el documento US 6.485.703; el documento US2007/0105176).
- 35 Los sensores de glucosa descritos en el estado de la técnica presentan sin embargo una actividad de glucosa relativamente baja. La actividad de glucosa y, con ello, el rendimiento del sensor se determina de forma decisiva mediante las constantes de unión para los complejos de proteína de unión a glucosa y competidor así como proteína de unión a glucosa y glucosa. Además, también desempeña un papel la movilidad de los componentes de sensor.
- 40 Esta está más bien limitada en las matrices de hidrogel (Rounds 2007, J. Fluoroec. 17: 57-63).
- La publicación de Cheung et al. (Anal. Chim. Acta (2008), 607, páginas 204-210) describe el desarrollo de una plataforma de bioensayos reutilizable con el uso de almohadillas de hidrogel de permeabilidad controlada para la detección selectiva de sacáridos.
- 45 En el caso de sensores *in vivo* para la medición de glucosa, el sensor debe reaccionar continuamente de forma reversible a cambios de concentración del analito. Con ello, la constante de unión no debe ser demasiado alta, dado que el sensor estaría saturado de lo contrario ya a bajas concentraciones de analito y ya no podría indicar cambios de concentración. Además, una problemática adicional de los sensores *in vivo* consiste en que puede establecerse el intervalo de la concentración de analito y no puede optimizarse mediante dilución o concentraciones. En el estado de la técnica se describen esencialmente sistemas de ligando y proteína de unión a glucosa en los que se realizan constantes de unión medias. Una adaptación de las sensibilidades de medición mediante la variación de las concentraciones (por ejemplo mediante enriquecimiento) de, o bien proteína de unión a glucosa o ligando o bien ambos, está limitada normalmente por la baja solubilidad de las moléculas correspondientes. En este sentido, en el
- 50 caso de los sensores descritos en el estado de la técnica mencionado anteriormente, está limitada tanto la sensibilidad de medición como la precisión de medición del sensor.
- 55 Es objetivo de la presente invención proporcionar medidas que permiten mejorar la sensibilidad de medición y la precisión de biosensores para la medición del nivel de glucosa. La invención se consigue mediante las formas de realización descritas en las reivindicaciones así como las formas de realización que se divulgan a continuación.
- 60 La invención se refiere por lo tanto al uso de un hidrogel a base de polímero que se compone de al menos un polímero soluble en agua en un sensor para el enriquecimiento de una proteína de unión a glucosa disuelta, en el que el al menos un polímero puede interaccionar con la proteína de unión a glucosa y en el que la proteína de unión a glucosa se encuentra en un complejo con un ligando, comprendiendo el hidrogel a base de polímero una primera
- 65

matriz de hidrogel de alginato y una segunda matriz de hidrogel, que forma una matriz interpenetrante dentro de la primera matriz de hidrogel.

El término "hidrogel" describe un polímero que contiene agua, cuyas moléculas están enlazadas química o físicamente formando una red tridimensional. Las moléculas de polímero pueden enlazarse entre sí mediante enlaces covalentes o iónicos o mediante entrelazado o entretejido para formar la red tridimensional. Los polímeros que forman el hidrogel contienen componentes de polímero hidrófilos que permite la absorción de disoluciones acuosas así como grupos que pueden interaccionar con la proteína de unión a glucosa. En particular, para lectinas tales como concanavalina A se describieron, además de un sitio de unión para monosacáridos, por ejemplo glucosa, también un sitio de unión adicional para moléculas de azúcar terminales (Moothoo 1999, Glycobiology 9(6): 539-545; Bryce 2001, Biophysical Journal 81: 1373-1388; Moothoo 1998, Glycobiology 8(2): 173-181; Delatorre 2007, BMC Structural Biology 7:52). Los azúcares o moléculas o restos estructuralmente similares en las moléculas de polímero del hidrogel pueden interaccionar preferentemente con estos sitios de unión adicionales. En función del tipo de la proteína de unión a glucosa se selecciona de acuerdo con la invención un polímero que dispone de restos que pueden interaccionar con la proteína de unión a glucosa sin, a este respecto, bloquear los sitios de unión para glucosa. Restos adecuados pueden ser en este sentido también anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como Fab F(ab)₂, scFv o similares, que se acoplan al polímero y que reconocen específicamente la proteína de unión a glucosa. En lugar de anticuerpos, pueden usarse de manera análoga también aptámeros que reconocen específicamente la proteína de unión a glucosa.

El al menos un polímero se selecciona del grupo que consiste en: alginatos, Sepharose, ácido hialurónico, quitosán, carragenanos, poli(alcoholes vinílicos) (PVA), polietilenglicoles (PEG), poli(2-oxazolin), poliacrilamidas (por ejemplo dimetilacrilamida), polihidroxiacrilatos (por ejemplo polihidroxiacetato, polihidroxiacrilamidas, polivinilpirolidonas), polímeros de (2-metil-3-etil[2-hidroxietil]), polihidroxiacanoatos (PHA), poli(2-metil-2-oxazolin), poli(2-etil-2-oxazolin), poli(2-hidroxietil-2-oxazolin), poli(2-(1-(hidroximetil)-etil)-2-oxazolin), poli(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), poli(hidroxietilacrilato) (PHEA), poli-vinilpirolidonas, poli-(dimetil)acrilamida, poli(hidroxietil)acrilamida, poli(alcoholes vinílicos) (inclusive copolímeros con acetatos de vinilo y/o etilenos), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), polietilenglicoles y poli(etilenglicol-co-propilenglicol).

Preferentemente, el al menos un polímero se selecciona del grupo que consiste en:

alginatos, Sepharose, ácido hialurónico, quitosán y carragenanos. De manera especialmente muy preferentemente, el al menos un polímero es un alginato.

Se entiende que el hidrogel puede presentar en el sensor también otros polímeros. En particular, el hidrogel a base de polímero puede comprender una primera matriz de hidrogel de alginato y una segunda matriz de hidrogel que forma una matriz interpenetrante dentro de la primera matriz de hidrogel. Esta segunda matriz de hidrogel se compone preferentemente de un polímero soluble en agua con al menos un grupo reticulable por molécula y un peso molecular de como máximo 500.000. Se prefiere especialmente un peso molecular de como máximo 250.000, 200.000, 150.000, 100.000 o 50.000. Preferentemente, el polímero de la segunda matriz de hidrogel se selecciona, en este caso, del grupo que consiste en: poli(alcoholes vinílicos) (PVA), polietilenglicoles (PEG), poli(2-oxazolin), poliacrilamidas (por ejemplo dimetilacrilamida), polihidroxiacrilatos (por ejemplo polihidroxiacetato, polihidroxiacrilamidas, polivinilpirolidonas), polímeros de (2-metil-3-etil[2-hidroxietil]), polihidroxiacanoatos (PHA), poli(2-metil-2-oxazolin), poli(2-etil-2-oxazolin), poli(2-hidroxietil-2-oxazolin), poli(2-(1-(hidroximetil)-etil)-2-oxazolin), poli(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), poli(acrilato de hidroxietil) (PHEA), poli-vinilpirolidonas, poli-(dimetil)acrilamida, poli(hidroxietil)acrilamida, poli(alcoholes vinílicos) (inclusive copolímeros con acetatos de vinilo y/o etilenos), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), polietilenglicoles y poli(etilenglicol-co-propilenglicol).

De manera especialmente preferente, la segunda matriz de hidrogel se forma a partir de poli(alcohol vinílico). Se prefiere especialmente el poli(alcohol vinílico) con un peso molecular de 10.000 a 100.000, más preferentemente de 10.000 a 50.000, además preferentemente de 10.000 a 20.000 y de manera muy especialmente preferente 15.000. De manera especialmente preferente, el poli(alcohol vinílico) presenta un contenido en agente reticulante de como máximo 0,5 mmol/g, 0,4 mmol/g, 0,35 mmol/g o 0,3 mmol/g y de manera muy especialmente preferente 0,35 mmol/g. Además el poli(alcohol vinílico) presenta de manera especialmente preferente un contenido en sólidos del prepolímero inferior al 40 por ciento en peso.

El hidrogel de acuerdo con la invención puede contener, además de la primera matriz de hidrogel y la segunda matriz de hidrogel aditivos, por ejemplo estabilizadores, emulsionantes, antioxidantes, estabilizadores UV, detergentes, y/o iniciadores UV.

El hidrogel usado de acuerdo con la invención puede estar rodeado además por un material de envuelta adicional, preferentemente semipermeable. Mediante este encerramiento se impide un "desangrado" ("*leaching*") de los componentes de sensor del hidrogel. Como material de envuelta se tienen en cuenta membranas semipermeables u otras matrices de hidrogel. Las membranas semipermeables pueden componerse preferentemente de celulosa

regenerada, polietilenglicol, poliuretano, capas de capa-bicapa (LBL), polietersulfonas, capas de parileno o sílice perforada. Como material de envuelta se tiene en cuenta también otra matriz de hidrogel. Preferentemente, este puede formarse a partir de un polímero seleccionado del grupo que consiste en alginatos, Sepharose, ácido hialurónico, quitosán, carragenanos, poli(alcoholes vinílicos) (PVA), polietilenglicoles (PEG), poli(2-oxazolinas), poliacrilamidas (por ejemplo dimetilacrilamida), polihidroxiacrilatos (por ejemplo polihidroximetacrilato, polihidroxiacrilamidas, polivinilpirolinonas), polímeros de (2-metil-3-etil[2-hidroxietil]), polihidroxialcanoatos (PHA), 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(acrilato de hidroxietilo) (PHEA), poli-vinilpirolidonas, poli-(dimetil)acrilamida, poli-(hidroxietil)acrilamida, poli(alcoholes vinílicos) (inclusive copolímeros con acetatos de vinilo y/o etilenos), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), polietilenglicoles y poli(etilenglicol-co-propilenglicol).

La expresión "proteína de unión a glucosa" se refiere, en el contexto de la invención, a proteínas que pueden interaccionar específicamente con glucosa. Si una proteína puede interaccionar específicamente con glucosa, puede determinarse sin más por el experto, mediante pruebas de unión conocidas en el estado de la técnica. Preferentemente, la proteína de unión a glucosa puede además, interaccionar con el polímero del hidrogel. Preferentemente, esta interacción no se media por el sitio de unión a glucosa de la proteína de unión a glucosa. De manera especialmente preferente, la proteína de unión a glucosa se selecciona del grupo que se compone de lectinas, enzimas que se unen a glucosa como sustrato, y anticuerpos que reconocen específicamente glucosa. La expresión abarca también moléculas subrogadas que pueden reconocer glucosa específicamente, preferentemente aptámeros, que reconocen específicamente glucosa. De manera muy especialmente preferente, la proteína de unión a glucosa es concanavalina A.

Las secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos que codifican para las proteínas de unión a glucosa mencionadas anteriormente, son conocidas en el estado de la técnica (Yamauchi 1990, FEBS Letters 260(1): 127-130). Por consiguiente, las proteínas mencionadas anteriormente pueden proporcionarse sin más por el experto. Dichas proteínas pueden producirse por ejemplo de manera recombinante o purificarse a partir de una fuente biológica. Además, las proteínas pueden sintetizarse también químicamente. La mayoría de las proteínas mencionadas anteriormente se encuentran además comercialmente disponibles. Los anticuerpos o aptámeros, que reconocen específicamente glucosa, pueden proporcionarse por el experto sin más mediante métodos conocidos en el estado de la técnica para la obtención de anticuerpos o aptámeros.

Las proteínas de unión a glucosa mencionadas anteriormente y en particular concanavalina A pueden presentar preferentemente también modificaciones químicas que, median una solubilidad en agua elevada en comparación con versiones no modificadas de las proteínas de unión a glucosa. Tales modificaciones comprenden preferentemente la funcionalización con un polímero soluble en agua y pueden seleccionarse en una forma de realización especialmente preferente, del grupo que consiste en: pegilación, acetilación polioxazolinización y succinilación.

La detección de glucosa en una muestra que va a analizarse tiene lugar en el dispositivo de acuerdo con la invención mediante un desplazamiento del ligando unido a la proteína de unión a glucosa mediante la glucosa contenida en la muestra (competición entre ligando y glucosa). Preferentemente, el ligando tiene por lo tanto una menor afinidad con la proteína de unión a glucosa que la glucosa. El desplazamiento puede detectarse preferentemente mediante marcaje del ligando con un colorante u otra molécula de marcador detectable. Han resultado ser especialmente adecuados para la detección de un desplazamiento, colorantes u otras moléculas de marcador, que al aproximarse a las moléculas unidas a los mismos provocan una variación de al menos una propiedad física o química medible. Los sistemas adecuados abarcan aquellos en los que por medio de transferencia de energía entre las moléculas de colorante o bien se suprime o bien se genera una señal medible. Tales sistemas basados en transferencia de energía se describen en detalle por ejemplo en el documento WO2001/13783. Preferentemente, en este caso puede tratarse de sistemas en los que mediante efectos de hinchamiento se suprime una señal de fluorescencia cuando el colorante o las moléculas de marcador y, con ello la proteína de unión a glucosa y su ligando, están en proximidad espacial. Después del desplazamiento del ligando por el analito se aumenta entonces el efecto de hinchamiento. Este efecto puede detectarse mediante una variación de la fluorescencia. Para la detección pueden emplearse por ejemplo fotómetros de fluorescencia tal como se describe en el documento WO2002/087429. Otros sistemas adecuados son los denominados sistemas de detección basados en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). En este caso, se marcan dos componentes que interactúan, tal como la proteína de unión a glucosa y su ligando, con colorantes de fluorescencia. Un componente se acopla con un colorante aceptor, el otro con un colorante donador. Mediante la interacción de los componentes se aproximan espacialmente los colorantes mediante lo cual se media el efecto FRET. En este caso se transfiere la energía de excitación del colorante donador al colorante aceptor y con ello se reduce de forma medible la intensidad del colorante donador. Tan pronto como se interrumpe la interacción de los componentes, aumenta de nuevo la intensidad de fluorescencia del donador. En el caso del dispositivo de acuerdo con la invención, la glucosa puede detectarse por lo tanto a través del aumento de la intensidad de una señal que se genera por un colorante o molécula de marcador después de la separación del complejo de la proteína de unión a glucosa y el ligando se genera mediante los analitos. El colorante o la molécula de marcador está acoplado o bien a la proteína de unión a glucosa o bien a los ligandos. Por ejemplo, un colorante donador puede estar acoplado a la proteína de unión a

glucosa o el ligando, estando acoplado el componente no acoplado con el colorante donador con un colorante aceptor adecuado. En un dispositivo de acuerdo con la invención configurado de esta manera, antes de cargarse con una muestra que contiene glucosa, puede observarse el efecto FRET como resultado de la unión del ligando a la proteína de unión a glucosa. Tras cargarse, la glucosa desplaza el ligando, de modo que aumenta la intensidad medible de la fluorescencia del colorante donador, en concreto, proporcionalmente a la cantidad de glucosa.

Birch et. al (Birch 2001, Spectrochimica Acta Parte A 57: 2245-2254) han calculado la solución matemática del equilibrio químico para el caso de concanavalina A como proteína de unión a glucosa y dextrano como ligando. Simulaciones con concentraciones variables de concanavalina A y dextrano han dado como resultado que la relación (dextrano) / (complejo ConA-dextrano) solo depende ligeramente de las concentraciones de partida y las constantes de unión K_{Dex} y K_{Gluc} son los factores principales para el funcionamiento del sensor.

Sorprendentemente, la estructura de los colorantes repercute, sin embargo, así mismo sobre la actividad de glucosa. De este modo, de acuerdo con la invención es claramente superior una combinación de un colorante de rodamina y un colorante de oxazina de la combinación usada convencionalmente de un colorante de xanteno y un colorante de rodamina (FITC-TMR).

Preferentemente, la proteína de unión a glucosa, que se emplea en el contexto del uso de acuerdo con la invención, está ligada con un colorante de oxazina. El experto conoce absolutamente un enlace de este tipo y se describe suficientemente en el estado de la técnica. De manera especialmente preferente, el colorante de oxazina es un aceptor de oxazina, seleccionado del grupo que consiste en: ATTO655, ATTO680, EVOblue10, EVOblue30, EVOblue90 y EVOblue100. De manera muy especialmente preferente se emplea ATTO680. Los colorantes de oxazina mencionados se encuentran comercialmente disponibles.

El grado de marcaje preferido (DOL, "*degree of labeling*") para la proteína de unión a glucosa, por ejemplo concanavalina A, es de 0,1 a 4 más intenso, preferentemente de 1 a 4 y de manera especialmente preferente de 1 a 3. En el caso de la concanavalina A un DOL de 1 corresponde en este caso a un mol de colorante por mol de concanavalina A tetrámero (MW = 104.000). En el caso de un DOL alto y el uso de colorantes relativamente no polares (normalmente colorantes de fluorescencia de onda larga), la proteína de unión a glucosa está preferentemente funcionalizado con PEG. El grado de pegilación preferente es de 0,1 a 5, el peso molecular preferido es de 200 a 10.000, de manera especialmente preferente de 800 a 8.000 y de manera muy especialmente preferente de 800 a 5.000.

En el contexto de los experimentos en los que se basa la presente invención se estableció que las modificaciones químicas de las proteínas de unión a glucosa, que median una solubilidad en agua elevada en comparación con variantes no modificadas, pueden emplearse de manera ventajosa para alcanzar un mejor grado de marcaje en las proteínas de unión a glucosa. Para las proteínas de unión a glucosa modificadas de acuerdo con la presente invención pueden alcanzarse también mayores grados de marcaje con un colorante que para variantes no modificadas de las mismas. Para tales proteínas de concanavalina A modificadas pueden conseguirse preferentemente concentraciones mayores que 0,5 mg/(g de matriz) y de manera muy especialmente preferente entre 2 y 60 mg/(g de matriz). Sorprendentemente, la actividad de glucosa medida de proteínas de concanavalina A modificadas era en este caso también comparable con la de concanavalina A nativa en hidrogel.

Preferentemente, la proteína de unión a glucosa disuelta en el hidrogel puede encontrarse en este caso en una concentración elevada al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con una disolución acuosa.

La solubilidad mejorada es en particular relevante cuando las proteínas de unión a glucosa deben marcarse con un colorante, dado que las proteínas de unión a glucosa marcadas con colorantes, por ejemplo una concanavalina A modificada con uno de los colorantes de oxazina mencionados anteriormente, tienen una solubilidad reducida de nuevo en disolución acuosa. En este sentido, cuanto mayor es el grado de marcaje, menor es la solubilidad en disolución acuosa. Sin embargo, un alto grado de marcaje se necesita precisamente para proteínas de unión a glucosa como componentes de sensor en los dispositivos de acuerdo con la invención.

La expresión "ligando de la proteína de unión a glucosa" designa una molécula que puede adoptar una unión específica con la proteína de unión a glucosa, interaccionando la molécula esencialmente con el mismo sitio de unión que la glucosa, de modo que la molécula unida puede desplazarse por la glucosa del sitio de unión en la proteína de unión a glucosa. Las moléculas adecuadas como ligando están relacionadas por lo tanto estructuralmente con glucosa. Preferentemente, el ligando de la proteína de unión a glucosa es un oligosacárido, una macromolécula glicosilada, por ejemplo una proteína o péptido glicosilado, o una nanopartícula glicosilada. Las moléculas mencionadas anteriormente, que pueden emplearse como ligandos de la proteína de unión a glucosa, son conocidas en el estado de la técnica y pueden proporcionarse sin más por el experto. De manera especialmente preferente se emplea un dextrano como ligando de la proteína de unión a glucosa.

Preferentemente, el ligando de la proteína de unión a glucosa está acoplado en el sensor con un colorante de rodamina. De manera especialmente preferente, en este sentido pueden emplearse ATTO590, ATTO610, ROX,

TMR, rodamina G6, colorantes Alexa flúor o Dy590 y de manera muy especialmente preferente ATTO590.

El grado de marcaje (DOL) preferente para los ligandos de la proteína de unión a glucosa, por ejemplo dextrano, es de 0,00003 a 0,017 (mol de colorante)/(mol de subunidad), de manera especialmente preferente de 0,0005 a 0,007 (mol de colorante)/(mol de subunidad) y de manera muy especialmente preferente de 0,001 a 0,0016 (mol de colorante)/(mol de subunidad). El grado de marcaje del ligando tiene así mismo una influencia sobre la actividad de glucosa. Grados de marcaje demasiado bajos al igual que demasiado altos llevan a una peor actividad de glucosa.

En una forma de realización preferida del uso de acuerdo con la invención la proteína de unión a glucosa es concanavalina A. Así mismo, la concanavalina A mediante modificaciones químicas, preferentemente pegilación, acetilación polioxazolinización o succinilación, presenta una solubilidad en agua elevada en comparación con la concanavalina A no modificada. La proteína de unión a glucosa está ligada en una forma de realización preferida con un colorante de oxazina y el ligando de la proteína de unión a glucosa con un colorante de rodamina. De manera muy especialmente preferente se usa un sistema de concanavalina A / dextrano en el sensor, en el que el dextrano está ligado con un colorante donador de rodamina y la concanavalina A con un colorante aceptor de oxazina. En el sistema de concanavalina A / dextrano preferido, los componentes se encuentran preferentemente en una relación de masas (dextrano/ConA) de 1:1 a 1:40, prefiriéndose especialmente relaciones de masas próximas a 1:10.

En el contexto de la presente invención se estableció que la combinación de colorantes de oxazina y rodamina provoca una interacción heterodímera entre los restos de colorante, que refuerza la actividad de glucosa. Por lo tanto, mediante el uso de colorantes aceptores de oxazina y donadores de rodamina pudo conseguirse ya en disolución acuosa preferentemente una actividad de glucosa de 2,1 veces. En el hidrogel empleado en el contexto de la presente invención pudo provocarse incluso un aumento de 2,6 veces de la actividad de glucosa.

Mediante el uso de un polímero que puede interaccionar con la proteína de unión a glucosa, puede conseguirse ventajosamente una mayor concentración de proteína de unión a glucosa y ligando en el hidrogel del sensor. Esto aumenta la sensibilidad de medición pero también la precisión de medición del sensor, en particular en aplicaciones *in vivo* con una concentración de glucosa dada.

En el contexto de la presente invención se estableció ventajosamente que el uso de un hidrogel, que se compone de una primera matriz de hidrogel como alginato y una segunda matriz de hidrogel, que forma dentro de la primera una matriz interpenetrante, puede crear un entorno para los componentes de sensor, en concreto la proteína de unión a glucosa y los ligandos competitivos de la proteína de unión a glucosa, que permite una determinación eficiente de la actividad de glucosa. Muchos planteamientos para la medición de glucosa por medio de fluorescencia son satisfactorios en disolución, pero pierden su actividad cuando los componentes de sensor se integran en matrices de hidrogel, dado que se limita la movilidad de los componentes de sensor (Rounds 2007, J. Fluoresc. 17: 57-63; documento US 2007/0105176 A1). Sorprendentemente en particular también con respecto a los cálculos de Birch et al (Birch 2001, loc cit) pudo establecerse sin embargo en el presente caso una actividad aumentada hasta 2,6 veces con respecto a disoluciones acuosas. Mediante la elección de matrices de hidrogel adecuadas pudo conseguirse un enriquecimiento de la proteína de unión a glucosa en gran medida a través de su límite de solubilidad en disolución acuosa. En el caso de concanavalina A pudo conseguirse por ejemplo una concentración elevada más de 10 veces con respecto a una concentración que puede alcanzarse en disolución libre. Habitualmente se influye en la solubilidad del componente de receptor en disolución libre aún negativamente mediante la adición del ligando, dado que el complejo de receptor / competidor debido a su tamaño y con frecuencia también debido a multivalencias una menor solubilidad. Mientras que por ejemplo un complejo concanavalina A / dextrano en disolución comienza a precipitar en una relación en masa de 1:10 ya a partir de una concentración de concanavalina A de 0,5 mg/(g de disolución), en un hidrogel adecuado con la misma relación en masa puede ajustarse una concentración de concanavalina A de más de 50 mg/(g de matriz). Por lo tanto, puede ampliarse el intervalo de concentración aplicable 100 veces. Esto es de importancia en particular para aplicaciones en las que la concentración de analito es fija y no puede adaptarse mediante diluciones o concentración. Tales dificultades aparecen precisamente en aplicaciones *in vivo*, tales como la determinación del nivel de glucosa en fluidos corporales. La concentración del analito glucosa, en la situación *in vivo*, no puede adaptarse a las condiciones de ensayo específicas, sino que debe aceptarse como viene dada.

Un problema de solubilidad adicional aparece en particular en aplicaciones *in vivo* de sensores biológicos. Debido a la mayor longitud de onda, disminuye la fluorescencia propia del tejido, de modo que en aplicaciones *in vivo* pueden emplearse colorantes de fluorescencia de onda larga. Estos colorantes de fluorescencia son sin embargo normalmente apolares debido a su estructura y tamaño moleculares (sistemas conjugados). Si la proteína de unión a glucosa se marca solamente con un colorante de este tipo, se disminuye la solubilidad adicionalmente, de modo que tampoco son posibles altos grados de marcaje. Tal como ya se describió anteriormente, puede ser necesario funcionalizar la proteína de unión a glucosa con, por ejemplo, polietilenglicol, para permitir una solubilidad aumentada y con ello mayores grados de marcaje relacionados. La funcionalización con polietilenglicol (pegilación) lleva sin embargo en disolución normalmente a una actividad de glucosa fuertemente reducida de por ejemplo concanavalina A nativa (actividad de glucosa relativa de 0,4 o menos). Sorprendentemente, en el contexto de la presente invención se estableció que en el hidrogel del dispositivo sensor no aparece este empeoramiento. Más bien, pueden conseguirse actividades de glucosa para concanavalina A funcionalizada con polietilenglicol, que pueden compararse con las de concanavalina A nativa (actividad de glucosa relativa = 2,2 o 2,6). Además, se

descubrió que la actividad de glucosa puede aumentarse aún adicionalmente mediante el aumento del grado de marcaje en la concaavalina A en un hidrogel, tal como se emplea en el dispositivo sensor de acuerdo con la invención. De este modo se consiguieron sorprendentemente en el hidrogel enriquecido, mediante aumento del grado de marcaje en la concaavalina A funcionalizada con polietilenglicol incluso doblar la actividad de glucosa. En comparación con la medición en disolución, se aumenta la actividad de glucosa en el hidrogel usado de acuerdo con la invención en el dispositivo sensor incluso 4,3 veces. Es decir, el uso del hidrogel en el dispositivo de acuerdo con la invención permite ajustar relaciones de concentración para la proteína de unión a glucosa y sus ligandos que permitan a grados de marcaje correspondientes, actividades de glucosa que estén 4 veces elevadas con respecto a concentraciones que pueden ajustarse en disoluciones acuosas. Esto permite de manera ventajosa también el uso del dispositivo de acuerdo con la invención en condiciones en las que la concentración de analito no puede adaptarse a las condiciones de ensayo.

En el contexto del uso de acuerdo con la invención, puede emplearse el sensor preferentemente para la determinación del contenido en glucosa.

En este caso puede examinarse una muestra. Por el término "muestra" se entiende en el contexto de la presente invención una composición, preferentemente una composición acuosa, que contiene glucosa presumible o realmente. Preferentemente en el caso de la muestra se trata de una muestra biológica. De manera muy especialmente preferente en el caso de la muestra se trata de un fluido corporal, en particular, líquido intersticial (fluido intersticial), sangre, plasma, suero, linfa, saliva, líquido lacrimal, sudor u orina. De manera especialmente preferente en el caso de la muestra se trata de líquido intersticial, sangre, suero o plasma.

Siempre que la muestra sea un material biológico, por ejemplo un fluido corporal, puede obtenerse preferentemente de un sujeto de prueba que presenta un metabolismo de glucosa alterado o bien real o bien presumiblemente. Preferentemente, el metabolismo de glucosa alterado se provoca en este sentido por diabetes mellitus o el síndrome metabólico.

Es decir, el sensor puede emplearse en el contexto del uso de acuerdo con la invención también para el diagnóstico *ex vivo* de enfermedades o trastornos del metabolismo de la glucosa. En particular, el sensor puede emplearse para el diagnóstico de un metabolismo de glucosa alterado y relacionado con ello, de enfermedades tales como diabetes mellitus o el síndrome metabólico o para la determinación de la necesidad de una medida terapéutica en un paciente con metabolismo de glucosa alterado.

Las medidas terapéuticas mencionadas anteriormente abarcan aquellas que se emplean para el tratamiento de diabetes mellitus o el síndrome metabólico. A estas pertenece, además de la administración de fármacos, por ejemplo insulina, también la realización de otras medidas terapéuticas, sobre las que puede decidirse debido al metabolismo de glucosa alterado determinado. Entre ellas figuran intervenciones terapéuticas, por ejemplo operaciones de derivación gástrica, o cambios de los hábitos, por ejemplo la realización de dietas especiales. El sensor puede acoplarse con un dispositivo adicional, por ejemplo un dispositivo que controla la emisión de un fármaco. En este sentido se prefiere un dispositivo para la emisión de insulina. La emisión de insulina puede controlarse entonces basándose en la necesidad determinada por el sensor.

El sensor del uso de acuerdo con la invención puede introducirse para la aplicación *ex vivo* por ejemplo en placas de microtítulo y allí anclarse. Las muestras que van a medirse se aplican entonces en las cavidades de las placas de microtítulo y pueden entonces medirse con un dispositivo lector. Un planteamiento de este tipo permite la medición simultánea de un gran número de muestras y es por lo tanto también económico, en particular en el modo de diagnóstico clínico.

Se describe una aplicación *in vivo*. Para ello puede introducirse el sensor en el cuerpo. En este sentido ha de tenerse en cuenta que la medición del nivel de glucosa, que también es la base para el diagnóstico, presupone que el sensor entra en contacto con un fluido corporal que contiene glucosa, siendo la concentración de la glucosa en el fluido representativa del nivel de glucosa que va a determinarse. Los fluidos corporales adecuados se enumeran en otro punto en la descripción. De manera especialmente preferente el fluido corporal es líquido intersticial.

El sensor se introduce preferentemente en sitios en el cuerpo que permiten una medición óptica de la señal generada por el sensor. Son adecuados sitios con, o bien un pequeño grosor de tejido entre dispositivo y superficie corporal o bien con tejidos transparentes que pueden penetrarse adecuadamente por la señal generada. De manera especialmente preferente, el dispositivo se coloca bajo la piel (por vía subcutánea) o en el ojo (por vía subconjuntiva). Procedimientos correspondientes para el implante del dispositivo son conocidos en el estado de la técnica.

Como alternativa, la señal generada por el dispositivo también puede transmitirse por medio de un medio de transmisión adecuado desde el cuerpo. Para ello puede emplearse preferentemente un material conductor de señales como cable flexible, por ejemplo un cable de fibra de vidrio. La transmisión de la señal puede tener lugar sin embargo también sin contacto por ejemplo como señal infrarroja, de radio o radioeléctrica. Se entiende que en este caso, la señal generada por el dispositivo debe leerse en primer lugar por un detector, que debe estar instalado

igualmente en el dispositivo o al menos en proximidad espacial y convertirse en una señal electromagnética, por ejemplo una señal radioeléctrica. Esta señal electromagnética puede recibirse entonces por un receptor situado fuera del cuerpo y evaluarse.

- 5 Mediante el uso de acuerdo con la invención del hidrogel en el sensor se permite un diagnóstico *ex vivo* eficiente del nivel de glucosa y con ello el reconocimiento temprano de enfermedades que van acompañadas de un metabolismo de glucosa alterado, así como su tratamiento clínico y la elección de medidas terapéuticas.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos de realización.

10

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de sensores para la determinación de glucosa

15 *Producción de partículas de hidrogel (matriz enriquecedora)*

Se disuelve 1 g de sal sódica de ácido algínico en 100 g de agua con agitación. En un recipiente de 5 l se disuelven 66,2 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en 4931,3 g de agua.

- 20 La disolución de alginato se transporta a través de una bomba en una boquilla de dos sustancias. Al mismo tiempo se aplica aire comprimido en la segunda entrada de la boquilla, de modo que la disolución de alginato se atomiza en gotas finas. Las gotas se portan mediante el flujo de aire a un baño con la disolución de cloruro de calcio, donde gelifican y bajan al fondo. Las esferas gelificadas se recogen a continuación.

25 *Producción de sensores en matriz enriquecedora:*

Se incuban esferas de alginato para su carga una tras otra en una disolución de concanavalina A marcada con colorante y una disolución de dextrano marcada con colorante. A continuación se separan por centrifugación las esferas cargadas y se separa por decantación la disolución sobrenadante. Las esferas cargadas se incuban, opcionalmente, a continuación durante la noche en una disolución de un segundo polímero (por ejemplo a base de PVA, PEG) y se separan, opcionalmente, mediante centrifugación. A continuación se mezclan las esferas en una disolución acuosa de un polímero reticulable fotoquímicamente. Esta mezcla se reticula a continuación con luz UV para impedir la lixiviación de los componentes de sensor a partir de las esferas de alginato.

- 35 Las cantidades dependen a este respecto de la concentración del analito que va a medirse y el grado de marcaje se seleccionan en función de la intensidad deseada de la señal de fluorescencia. Como polímero reticulable fotoquímicamente puede usarse por ejemplo polímero Nelfilcon, un poli(alcohol vinílico) modificado con grupos acrilamida. Para la reticulación fotoquímica se añade aún un 0,1% de Irgacure 2959. La disolución acabada se dosifica en formas adecuadas y se endurece mediante luz UV.

40

Producción de sensores en matriz no enriquecedora:

La disolución de concanavalina A marcada con colorante y la disolución de dextrano marcada con colorante se añaden una tras otra a una mezcla de prepolímero a base de agua y se agitan durante 3 horas.

45

Las cantidades dependen a este respecto de la concentración del analito que va a medirse y el grado de marcaje se selecciona en función de la intensidad deseada de la señal de fluorescencia. Como prepolímero reticulable fotoquímicamente puede usarse por ejemplo polímero Nelfilcon, un poli(alcohol vinílico) modificado con grupos acrilamida. Para la reticulación fotoquímica se añade aún un 0,1% de Irgacure 2959. La disolución acabada se dosifica en formas adecuadas y se endurece mediante luz UV.

50

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

Determinación de la actividad de glucosa en sensores:

55

El espectro de fluorescencia de los sensores se determina a distintas concentraciones de glucosa. La variación de las intensidades de fluorescencia del donador con contenido en glucosa creciente sirve como medida para la calidad del sensor de glucosas. Dado que en el caso de un sensor de glucosa *in vivo* deben medirse concentraciones de glucosa entre 50 y 500 mg/dl, se calcula la actividad de glucosa del siguiente modo:

60

$$AG = (\text{Intensidad}_{500\text{mg/dl}} - \text{Intensidad}_{50\text{mg/dl}}) / \text{Intensidad}_{50\text{mg/dl}}$$

Todos los valores de respuesta se normalizan para su mejor comparación con respecto a la respuesta del mismo sistema en disolución. Para determinar la actividad de glucosa relativa se divide la actividad de glucosa de los sensores (en la matriz) entre la actividad de glucosa en disolución

65

$$AG \text{ rel.} = AG (\text{matriz}) / AG (\text{disolución})$$

Determinación de la actividad de glucosa en disolución:

La disolución de ConA y disolución de dextrano se diluyen en disolución tampón y se agita durante varias horas. El espectro de fluorescencia de la disolución se determina a distintas concentraciones de glucosa. La variación de las intensidades de fluorescencia del donador con contenido en glucosa creciente sirve como medida para la calidad del sistema. Dado que en el caso de un sensor de glucosa *in vivo* deben medirse concentraciones de glucosa entre 50 y 500 mg/dl, se calcula la actividad de glucosa del siguiente modo:

$$AG = (\text{Intensidad}_{500\text{mg/dl}} - \text{Intensidad}_{50\text{mg/dl}}) / \text{Intensidad}_{50\text{mg/dl}}$$

Ejemplo 3: Determinación de la influencia de la matriz

De acuerdo con la invención se incorporan la proteína de unión a glucosa y el ligando en una matriz de hidrogel que presenta una cierta interacción con la proteína de unión a glucosa. A este respecto, la matriz de hidrogel se selecciona de modo que, por un lado, la interacción de proteína de unión a glucosa y matriz de hidrogel es mayor que aquella entre proteína de unión a glucosa y disolución acuosa (enriquecimiento de los componentes de sensor). Por otro lado, la interacción entre proteína de unión a glucosa y el analito (glucosa) no debe verse afectada o no esencialmente por la interacción de proteína de unión a glucosa y matriz de hidrogel.

En el caso de la elección adecuada de la matriz de hidrogel se consigue, mediante la interacción entre proteína de unión a glucosa y matriz de hidrogel, un enriquecimiento de la proteína de unión a glucosa en la matriz a través del límite de solubilidad de la proteína de unión a glucosa en disolución acuosa. En el caso de Con A pueden conseguirse por ejemplo concentraciones hasta 10 veces mayores que en disolución libre. Aún más extremos resultan los problemas de solubilidad tras la adición del ligando (por ejemplo dextrano), dado que el complejo proteína de unión a glucosa-ligando, debido a su tamaño y con frecuencia también debido a multivalencias, presenta una menor solubilidad. Mientras que el complejo ConA-dextrano en disolución a una relación en masa de 1:10 comienza a precipitar ya a partir de una concentración de ConA de 0,5 mg/g, en una matriz de hidrogel adecuada con la misma relación en masa pueden ajustarse concentraciones de ConA de más de 50 mg/g. Mediante la matriz de hidrogel puede aumentarse el intervalo de concentración de la proteína de unión a glucosa, por ejemplo ConA, unas 100 veces.

Dado que en una aplicación *in vivo*, el intervalo de concentración de analito permanece fijo y no puede adaptarse por ejemplo mediante dilución o concentración, las concentraciones de proteína de unión a glucosa y ligando deben adaptarse al intervalo de concentración *in vivo* del analito. Con frecuencia, existe sin embargo la dificultad de que, por este motivo, serían necesarias concentraciones de proteína de unión a glucosa y / o concentraciones de ligando que superan el límite de solubilidad.

En el caso del sistema de ConA-dextrano, puede ajustarse por ejemplo en disolución solo una concentración de ConA de 0,5 mg/g a una relación en masa (Dex : ConA) de 1:10, dado que, de lo contrario, el complejo ConA-dextrano comienza a precipitar. La actividad de glucosa (AG) alcanzada a esta concentración se establece igual a 1 en este caso para la determinación de la actividad de glucosa relativa (AG rel.). Como cabe esperar, en una matriz no enriquecedora, se reduce a la mitad la actividad de glucosa debido a la menor movilidad de los componentes de sensor (AG rel. = 0,52). En una matriz enriquecedora se obtiene, con la misma concentración, casi la misma respuesta que en disolución (AG rel. = 0,83). En la matriz enriquecedora pueden ajustarse sin embargo también concentraciones de ConA esencialmente mayores. En el caso de una concentración de ConA de 10 mg/g se obtiene en la matriz de hidrogel enriquecedora, una actividad de glucosa aumentada 2,6 veces (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Influencia de la matriz

	En disolución	En matriz no enriquecedora	en matriz enriquecedora	en matriz enriquecedora
Concentración de ConA	0,5 mg/g	0,5 mg/g	0,5 mg/g	10 mg/g
AG rel.	1	0,52	0,83	2,55
ConA nativa con DOL = 1, dextrano con 0,001 mol de colorante (C) por mol de subunidad de Dex (SU), relación en masa Dex : ConA = 1:10				

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

En la matriz enriquecedora se observa claramente una función de la actividad de glucosa de la concentración de partida de la proteína de unión a glucosa y del ligando. En el caso de un aumento de la concentración se obtiene también un aumento de la actividad de glucosa. En el caso de concentraciones de receptor muy elevadas disminuye de nuevo la actividad de glucosa. La concentración de ConA óptima para un ensayo *in vivo* se encuentra entre 8 y 20 mg de ConA / g de matriz (véase la Tabla 2).

Tabla 2: Influencia de la concentración de receptor

Concentración de ConA [mg/g]	0,5	10,0	13,3	30	52,2
Actividad de glucosa relativa (AG rel.)	0,83	2,55	2,76	2,14	1,76
ConA nativa con DOL = 1, dextrano con 0,001 mol de colorante (C) por mol de subunidad de Dex (SU), relación en masa Dex : ConA = 1:10					

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

- 5 Debido a la fluorescencia propia del tejido que disminuye con mayores longitudes de onda, deben emplearse en aplicaciones *in vivo* colorantes de fluorescencia de onda larga. Estos colorantes de fluorescencia son bastante no polares normalmente debido a los mayores sistemas conjugados. Si la proteína de unión a glucosa se marca con colorantes de este tipo, entonces disminuye su solubilidad, de modo que debido a la precipitación, con frecuencia no son posibles altos grados de marcado. Para aumentar la solubilidad de la proteína de unión a glucosa, es ventajoso
- 10 funcionalizarla por ejemplo con polietilenglicol. De este modo se aumenta la solubilidad de la proteína de unión a glucosa, mediante lo cual son posibles mayores grados de marcado durante la síntesis.

- Las ConA pegiladas llevan sin embargo en disolución solo a menos de la mitad de la actividad de glucosa de la ConA nativa (AG rel. = 0,4). Sorprendentemente, en la matriz de hidrogel no aparece este empeoramiento. Con
- 15 PEG-ConA se obtiene una actividad de glucosa comparable con la de ConA nativa (AG rel. = 2,2 frente a 2,6) (véase la Tabla 3).

Tabla 3: Influencia del grado de marcaje (DOL)

DOL ConA		1	1
Tipo		nativa	pegilada
Disolución, c = 0,5 mg de ConA / g	AG rel.	1	0,43
Matriz, c = 10 mg de ConA / g	AG rel.	2,55	2,22

- 20 Mediante la pegilación se hace posible por primera vez dotar ConA de un alto grado de marcaje de un colorante de fluorescencia de onda larga, que es estable a largo plazo en disolución y no precipita. Sorprendentemente, en la matriz enriquecedora en comparación con en disolución no se observa empeoramiento alguno de la actividad de glucosa mediante la pegilación. Solamente mediante el efecto positivo de la matriz es por lo tanto posible emplear en un ensayo PEG-ConA con alto grado de marcado en altas concentraciones.

- 25 Sorprendentemente, la actividad de glucosa puede aumentarse adicionalmente mediante un aumento del grado de marcado en la ConA. En la matriz de hidrogel enriquecedora se consigue en el caso de ConA con DOL = 2,5 casi doblar la actividad de glucosa (AG rel. = 4,3 frente a 2,6). En comparación directa con la medición en disolución, se aumenta la actividad de glucosa en la matriz mediante el efecto combinado de concentración y DOL por lo tanto
- 30 incluso 4,3 veces (véase la Tabla 4)

Tabla 4: Influencia del grado de marcaje (DOL)

DOL ConA		1	1	2,5*	2,5
Tipo		nativa	pegilada	nativa*	pegilada
Disolución, c = 0,5 mg de ConA / g	AG rel.	1	0,43		1,03
Matriz, c = 10 mg de ConA / g	AG rel.	2,55	2,22		4,28

*ATTO680-ConA nativa con un DOL de >1,5 no es estable en disolución 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 proteína de unión a glucosa o ligando, tiene así mismo una influencia sobre la actividad de glucosa. Ha resultado especialmente adecuada una combinación de un colorante de rodamina y un colorante de oxazina. Para el sistema de ConA-dextrano se prefiere especialmente un donador de rodamina (por ejemplo ATTO590- o ATTO610-dextrano, ROX-dextrano) y un aceptor de oxazina (por
- 40 ejemplo ATTO655- o ATTO680-ConA, Evoblue30-ConA). En contraposición al sistema de TMR-ConA / FITC-dextrano usado convencionalmente (combinación de xanteno - rodamina) se obtiene de este modo en disolución una actividad de glucosa de 2,1 veces y en una matriz enriquecedora incluso una actividad de glucosa de 2,6 veces. En el caso de un par de colorantes de rodamina-oxazina, puede aparecer una interacción de heterodímero entre los
- 45 colorantes que intensifica la actividad de glucosa (véanse las Tablas 5 y 6).

Tabla 5: Influencia de los colorantes

Colorante de ConA		ATTO680	TMR
Colorante de dextrano		ATTO590	FITC
DOL ConA		2,5*	2,3
Tipo		nativo*	nativo
Disolución, c = 0,5 mg de ConA / g	AG rel.	2,4	1,17
Actividad relativa en comparación con el sistema convencional FITC/TMR		2,05	1

Matriz, c = 10 mg de ConA / g	AG rel.	4,92	1,9
Actividad relativa en comparación con el sistema convencional FITC/TMR		2,59	1
Valores correspondientes debidos a los valores experimentales con PEG-ConA extrapolados: FITC-dextrano con 0,01 mol de C/mol de SU, relación en masa Dex : ConA = 1:10			

Tabla 6: Influencia de los colorantes

		ATTO590/ATT0680	ROX/Evoblue30
Matriz, c = 10 mg de ConA / g	AG rel.	2,55	2,1
ConA nativa con DOL = 1, dextrano con 0,001 mol de colorante (C) por mol de subunidad de Dex (SU), relación en masa Dex : ConA = 1:10			

Ejemplo 7: Determinación de la influencia de la naturaleza de la matriz de hidrogel

5 La actividad de glucosa depende también de la naturaleza de la matriz de hidrogel. La matriz de hidrogel puede componerse de un polímero o de una mezcla de varios polímeros. Se ha comprobado que es ventajosa una matriz de hidrogel de alginato o una mezcla de un hidrogel de alginato y poli(alcohol vinílico). El hidrogel de alginato permite, mediante su interacción con la ConA y el dextrano el enriquecimiento de los componentes de sensor en
10 altas concentraciones.

El prepolímero del segundo hidrogel (por ejemplo PVA) puede penetrar en las esferas de alginato y después de su reticulación forman una red interpenetrante con el alginato. El ancho de malla de la red interpenetrante influye en la movilidad de las moléculas de la proteína de unión a glucosa y del ligando y por lo tanto también la actividad de
15 glucosa. El ancho de malla puede influirse mediante el tipo, el peso molecular, el contenido en sólidos del polímero así como el porcentaje de grupos reticulantes, que determina el número de nodos.

Un menor contenido en grupos reticulantes lleva a una mayor actividad de glucosa. Mediante una reducción a la mitad de los grupos reticulantes puede aumentare la actividad incluso en 1,5 veces. En comparación con el sistema en disolución puede conseguirse por lo tanto así mismo una mejora de 4,2 veces de la actividad de glucosa, sin un
20 aumento del grado de marcado en la ConA (véase la Tabla 7).

Tabla 7: Influencia del contenido en agente reticulante

Contenido en agente reticulante (mmol/g)	0,486	0,33	0,26
AG rel.	2,76	4,04	4,24
ConA nativa (13 mg/g) con DOL = 1, dextrano con 0,001 mol de colorante (C) por mol de subunidad de Dex (SU), relación en masa Dex : ConA = 1:10			

25 El contenido en sólidos de la red tiene así mismo una influencia sobre la actividad de glucosa. Cuanto mayor sea el contenido en sólidos menor será la actividad de glucosa (véase la Tabla 8).

Tabla 8: Influencia del contenido en sólidos

Prepolímero FG	25%	30%	35%	40%
AG rel.	2,87	2,76	2,48	1,96
ConA nativa (13 mg/g) con DOL = 1, dextrano con 0,001 mol de colorante (C) por mol de subunidad de Dex (SU), relación en masa Dex : ConA = 1:10				

REIVINDICACIONES

1. Uso de un hidrogel a base de polímero que se compone de al menos un polímero soluble en agua en un sensor para el enriquecimiento de una proteína de unión a glucosa disuelta, en el que el al menos un polímero puede interactuar con la proteína de unión a glucosa y en el que la proteína de unión a glucosa se encuentra en un complejo con un ligando, comprendiendo el hidrogel a base de polímero una primera matriz de hidrogel de alginato y una segunda matriz de hidrogel, que forma una red interpenetrante dentro de la primera matriz de hidrogel.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ligando de la proteína de unión a glucosa es un oligosacárido, un macromolécula glicosilada o una nanopartícula glicosilada.
3. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína de unión a glucosa disuelta se encuentra en una concentración aumentada al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con una disolución acuosa.
4. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína de unión a glucosa se selecciona del grupo que consiste en: lectinas, enzimas que se unen a glucosa como sustrato, anticuerpos que reconocen específicamente glucosa y aptámeros que reconocen específicamente glucosa.
5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína de unión a glucosa es concanavalina A.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la concentración de concanavalina A es mayor que 0,5 mg/(g de polímero).
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la concentración de concanavalina A se encuentra entre 2 y 60 mg/(g de polímero).
8. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la concanavalina A mediante modificación química presenta una solubilidad en agua elevada en comparación con concanavalina A no modificada.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en: pegilación, acetilación, succinilación y polioxazolinización.
10. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la proteína de unión a glucosa está ligada con un colorante de oxazina y el ligando de la proteína de unión a glucosa está ligado con un colorante de rodamina.
11. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sensor se emplea para la determinación *in vitro* del contenido en glucosa.
12. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sensor se emplea para el diagnóstico *in vitro* de un metabolismo de glucosa alterado.
13. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sensor se emplea para la determinación de la necesidad de una medida terapéutica en un paciente con metabolismo de glucosa alterado.