

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 752**

51 Int. Cl.:

**A61B 5/00** (2006.01)

**A61B 5/05** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2004 PCT/US2004/042215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2005 WO05062765**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2004 E 04814404 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 1701654**

54 Título: **Biosensor implantable y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

**18.12.2003 US 531447 P**

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

**18.05.2017**

73 Titular/es:

**METRONOM HEALTH, INC. (100.0%)  
26051 Merit Circle, Suite 102  
Laguna Hills, CA 92653, US**

72 Inventor/es:

**BOTVINICK, ELLIOT y  
BREMER, TROY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 612 752 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 implantable y métodos de uso del mismo.

**5 DATOS DE SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica la prioridad bajo el Artículo 35 U.S.C. § 119(e)(1) del documento de Estados Unidos n.º de serie 60/531.447, presentado el 18 de diciembre de 2003, cuyo contenido en su totalidad se incorpora en el presente documento por referencia.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

15 La invención se refiere en general al control de la glucosa, y más específicamente a sensores de glucosa implantables.

**INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES**

20 La diabetes es una enfermedad de la regulación insuficiente de glucosa en sangre. En las personas no diabéticas, las células beta del cuerpo controlan la glucosa y entregar la cantidad correcta de insulina en una base minuto a minuto para los tejidos en el cuerpo para captar la cantidad adecuada de glucosa, manteniendo la glucosa en sangre en niveles saludables. En los diabéticos, este sistema de regulación sana falla principalmente a los dos factores siguientes, ya sea en solitario o en combinación:

25

1) insuficiente producción de insulina y secreción, 2) una falta de sensibilidad normal a la insulina por los tejidos del cuerpo.

El primer gran avance en el tratamiento de la diabetes fue el descubrimiento de la insulina. El pilar de los  
30 tratamientos de hoy en día se basa en este descubrimiento, y la iniciativa propia y el cumplimiento del paciente. Dos tipos de diabetes mellitus son comunes. La diabetes tipo 1 representa el 5-10 % de todos los casos, y la diabetes tipo 2 representa el 90-95 % de la población diabética. En la diabetes tipo 1, la enfermedad requiere inyecciones de insulina para vivir, además requiere una alimentación saludable y ejercicio. El tratamiento de la diabetes tipo 2 puede requerir insulina, pero la enfermedad puede ser controlable con medicación oral, pérdida de peso, una dieta  
35 cuidadosa y un programa de ejercicios regular.

Todavía no existe ninguna píldora mágica para tratar la diabetes. Los fármacos actuales tienen el potencial de eliminar por completo las complicaciones, únicamente si paciente sabe cuándo y cuánto debe tomar. Se requiere un programa de toma de muestras muy frecuente para proporcionar tanto la velocidad como la extensión de las  
40 excursiones glucémicas. Este conjunto de medidas de la glucosa es información absolutamente necesaria para calcular el tiempo y la cantidad de acciones correctivas necesarias para tratar con eficacia la diabetes y prevenir complicaciones. La importancia de la monitorización de la glucosa en la sangre ha sido subrayada por los resultados del Ensayo sobre el Control y Complicaciones de la Diabetes, que demostró que muchas de las complicaciones a largo plazo de la diabetes se pueden prevenir mediante la regulación de la glucosa en sangre.

45

Sin embargo, las pruebas actuales de glucosa en sangre son dolorosas, que requieren la punción del dedo para obtener una muestra de sangre. Son inconvenientes debido a la interrupción de la vida diaria y ser difíciles de realizar en los pacientes diabéticos a largo plazo debido a los callos en los dedos y la mala circulación. Con la tecnología actual, el paciente diabético promedio pone a prueba sus niveles de glucosa en sangre menos de dos  
50 veces al día en comparación con la cantidad recomendada de 4-7 veces por día. Además, incluso el horario recomendado está lejos de ser suficiente para permitir la normalización de la glucosa en sangre.

Así, con la tecnología actual, el seguimiento necesario con frecuencia es una tarea inacabada. El programa de muestreo requerido no puede esperarse de forma realista de incluso los pacientes más comprometidos durante el  
55 día y no es factible por la noche. Los métodos actuales de controla de la glucosa en sangre no son automáticos, lo que requiere crónicamente la iniciativa usuario. Por lo tanto, no se puede confiar en que este sistema detecte una hipoglucemia espontánea u otras excursiones glucémicas. Por consiguiente, incluso los pacientes más diligentes no pueden evitar complicaciones graves. Como resultado, se gastaron \$85 billones en 2002, sobre el tratamiento de las complicaciones de la diabetes, incluyendo la pérdida de visión, pérdida de la función renal, pérdida de extremidades,

enfermedad vascular, insuficiencia cardiaca, ictus, coma y dolor constante grave.

Se necesitan nuevos métodos de control de glucosa para hacer frente a estas deficiencias. Un medio automático, incoloro, y cómodo de control continuo de la glucosa podría proporcionar la información necesaria para un control  
5 adecuado. Esto reduciría en gran medida las complicaciones observadas en estos pacientes y el coste clínico asociado de su tratamiento.

Con el fin de satisfacer las necesidades de monitorización continua de la glucosa para la diabetes, el proceso de seguimiento debe satisfacer lo siguiente:

10

- No requerir la preparación de muestras (las mediciones se realizan automáticamente)
- Ser altamente selectivo y sensible
- Proporcionar una respuesta rápida a cambios en la glucosa
- Proporcionar mediciones altamente repetibles/reproducibles

15 • **Operar con estabilidad y baja desviación**

Se han aplicado varias tecnologías diferentes para desarrollar un sensor de glucosa para satisfacer estas necesidades. Sin embargo, la ruta más directa para poner un dispositivo de éxito en el mercado es el desarrollo de un sensor desechable que opere en el tejido subcutáneo. Esto reduce al mínimo el riesgo de complicaciones graves  
20 asociadas a un dispositivo totalmente implantado.

Un método muy acertado que satisfaga todos los requisitos anteriores para una biodetección es la detección de electrodo amperimétrica basada en enzimas. Este método fue diseñado para funcionar en un entorno de oxígeno homogéneo con una alta disponibilidad de oxígeno, tal como un vaso sanguíneo principal en el cuerpo. El método  
25 empleado consumía oxígeno, manteniendo de manera efectiva una concentración de oxígeno nulo en la superficie del electrodo con el fin de medir el oxígeno. Sin embargo, este enfoque no es aplicable directamente al tejido subcutáneo.

Como suele ser el caso, el tipo de método de detección aplicado afectará a la capacidad de lograr el éxito en los nuevos entornos de detección. Muchos métodos de detección se realizarán bien *in vitro* o bajo condiciones cuidadosamente controladas, pero después no funcionarán bien en el cuerpo. Su fracaso se ha atribuido a la selectividad insuficiente, el envenenamiento del electrodo, y la insuficiente sensibilidad a la glucosa.  
30

La alta selectividad de la glucosa es esencial para proporcionar una medición precisa de la glucosa en el cuerpo. La selectividad de una medición se refiere al grado en el que un analito particular puede determinarse en una mezcla compleja sin la interferencia de otros componentes en la mezcla. En el cuerpo, hay una mezcla compleja que puede denominarse la matriz de tejido en la que se debe medir la glucosa. La matriz de tejido contiene muchos componentes que cambian constantemente y que pueden interferir con diferentes tipos de enfoques de medición. El estado constante de flujo de la matriz de tejido evita establecer una calibración para la medición selectiva a través de una técnica como la regresión múltiple para eliminar el impacto de los constituyentes de interferencia no medidos de la matriz.  
35  
40

Una amplia gama de enfoques de no invasivos a invasivos se están desarrollando en un intento por comercializar un nuevo tipo de sensor de glucosa. Sin embargo, mientras se espera, las mediciones ópticas no invasivas generalmente no son suficientemente selectivas para la glucosa sin un conocimiento detallado de la matriz que se sondea. La medición óptica se realiza centrando un haz de energía sobre el cuerpo. La energía se modifica por el tejido después de la transmisión a través de la zona diana. Una firma del contenido de tejido se produce por la energía que sale del tejido. La salida de energía es una función de componentes químicos encontrados, así como el grosor, el color y la estructura de la matriz de tejido a través del cual pasa la energía. En el cuerpo, la matriz de tejido está cambiando constantemente. Además, los constantes cambios en el entorno externo, y su impacto en la piel proporcionan un entorno no estacionario. Este es un grave problema para las mediciones puramente ópticas que son altamente selectivas para la glucosa.  
45  
50

Para lograr suficiente selectividad para la glucosa, la enzima glucosa oxidasa se puede emplear en un enfoque semi-invasivo. Clark y Lyons utilizan en primer lugar la estrategia de combinar la especificidad de un sistema biológico para conseguir la selectividad necesaria para las mediciones de glucosa en una matriz de tejido. La glucosa oxidasa tiene una alta especificidad para la glucosa. Esta enzima reduce la glucosa a ácido glucónico y peróxido en presencia de oxígeno y agua.  
55

Mediante el acoplamiento de la glucosa oxidasa con un transductor adecuado, la concentración de glucosa puede ser medida mediante el control de la producción de peróxido o el consumo de oxígeno.

Sin embargo, existen problemas en la aplicación directa de ambos enfoques. Las sondas de peróxido de hidrógeno a menudo tienen interferencia electroquímica por las especies oxidables en una matriz compleja tal como la encontrada en el cuerpo. El electrodo oxida estos otros constituyentes electroactivos, así como peróxido de hidrógeno, lo que se traduce en mediciones con un error positivo y variable neto. El peróxido de hidrógeno, si no se elimina, también puede tener una reacción indeseable con el tejido circundante, así como degradar la enzima oxidasa necesaria para el funcionamiento del sensor en el transcurso de la operación del sensor. Además, a menos que el oxígeno esté disponible en exceso para la glucosa que se va a reducir por la reacción, las variaciones en el oxígeno de masa entera también cambiarán la cantidad de glucosa que se oxida, dando lugar a mediciones erróneas si la concentración de oxígeno que influye en la reacción no se contabiliza directamente en una calibración, o se impide que afecte a la dinámica de reacciones. El problema de la sensibilidad a la variación de la concentración de oxígeno también está presente en los enfoques basados en la medición del consumo de oxígeno. Desgraciadamente, el entorno de tejido subcutáneo se ha demostrado que tiene tanto una concentración de oxígeno variable como heterogénea. Por tanto, estas mediciones deben abordar las variaciones de oxígeno de fondo para determinar con precisión la cantidad de oxígeno que se consume, necesario para la medición precisa de la glucosa.

Por lo tanto, para utilizar eficazmente la glucosa oxidasa, deben superarse una serie de problemas. En primer lugar, suficiente oxígeno debe estar disponible para que la reacción avance. En segundo lugar, independientemente de cómo se acopla la glucosa oxidasa a un transductor, si el oxígeno no está disponible en exceso, como será el caso en el tejido subcutáneo, se necesita entonces el conocimiento de la concentración de oxígeno para proporcionar una medición completamente selectiva de la glucosa. En tercer lugar, la glucosa oxidasa debe acoplarse a un detector de manera que cumpla los requisitos de los biosensores anteriormente indicados.

Gran parte del trabajo se ha hecho sobre el acoplamiento de la glucosa oxidasa a un electrodo. Sin embargo, los problemas de la estabilidad, la deriva, la selectividad y la sensibilidad deben ser superados si se utiliza un sistema de electrodos. Se han dedicado extensos esfuerzos para estabilizar el electrodo, minimizando el error de la interferencia electroactiva, y evitando el "envenenamiento del electrodo"; sin embargo, un enfoque alternativo consiste en evitar el uso de un electrodo como un transductor mediante la selección de un método de medición óptica. En el entorno subcutáneo, el oxígeno es escaso, haciendo que un método óptico que mida el resultado de la reacción de oxidación de la glucosa, sin consumir al mismo tiempo oxígeno sea incluso más deseable.

En el acoplamiento de la glucosa oxidasa con un transductor óptico, se plantea un problema adicional de la detección selectiva de oxígeno. Afortunadamente, los medios ópticos de detección de oxígeno selectivamente están bien establecidos.

El documento US 4.680.268 se refiere a un biosensor que contiene gas implantable y un método para medir un analito. En particular, un dispositivo típico de este documento de patente es uno con un sensor dotado de un bolsillo de gas con espacio de aire en el lateral de una membrana permeable de gas opuesta a la enzima que funciona como un depósito independiente del oxígeno para suministrar una reacción enzimática. Se incorpora en un recipiente cerrado del dispositivo un agente de transporte de oxígeno, tal como un perfluorocarbono o un derivado del mismo, aceites de silicona u otros disolventes de oxígeno orgánicos. En el caso de un perfluorocarbono o un derivado del mismo, se prefiere un perfluorociclocarbono.

El documento WO 03/059286A2 se refiere a métodos y composiciones para el transporte de oxígeno que comprenden hemoglobina modificada en plasma. En particular, este documento de patente se refiere a sustitutos de la sangre que comprenden vehículos de oxígeno a base de hemoglobina.

## 50 **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención se basa, al menos en parte, al descubrimiento de una matriz de transporte de oxígeno estabilizada que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible, tal como hemoglobina, inmovilizada a través de toda la matriz de transporte de oxígeno estabilizada. La matriz estabilizada recoge el oxígeno, estabiliza la dinámica del oxígeno, y transporta rápidamente oxígeno dentro de la matriz. Por ejemplo, la matriz estabilizada puede transportar oxígeno desde una región de oxígeno relativamente elevado que rodea una superficie de la matriz estabilizada, a una región de menor o nada de oxígeno sobre una segunda superficie. Además, la matriz estabilizada puede transportar oxígeno a un sitio dentro de la matriz o yuxtapuesto a la matriz, donde se produce una reacción en la que se consume el oxígeno.

La matriz de oxígeno estabilizada proporciona numerosas funciones, incluyendo un rápido transporte de oxígeno en un sensor implantable y un rápido transporte de oxígeno a un tejido artificial. Por consiguiente, se proporciona en el presente documento en una realización un método para transportar oxígeno desde una primera área que tiene una concentración de oxígeno relativamente alta a una segunda área que tiene una concentración de oxígeno relativamente baja, que incluye poner en contacto el oxígeno de la primera área, con una primera superficie de una matriz de transporte de oxígeno estabilizada que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada a través de toda la matriz de transporte de oxígeno estabilizada, y transportar oxígeno lejos de la primera superficie de la matriz de transporte de oxígeno estabilizada a una segunda superficie de la matriz de transporte de oxígeno, donde la segunda superficie de la matriz de transporte de oxígeno entra en contacto con la segunda área.

En realizaciones ilustrativas, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la matriz de transporte de oxígeno estabilizada puede usarse para transportar rápidamente oxígeno en un biosensor, especialmente un sensor de glucosa implantable, para superar los problemas de los sensores implantables, tales como cambios espaciales y temporales en la concentración de oxígeno en el sitio de un implante. Adicionalmente, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que una sonda que no consume sustancialmente oxígeno puede acoplarse con un mediador selectivo tal como glucosa oxidasa con condiciones de geometría y demarcación apropiadamente definidas para desarrollar un sensor de glucosa que funcionará con precisión a baja tensión de oxígeno tal como es típico en los tejidos subcutáneos. El transportador de proteína de unión a oxígeno reversible puede usarse para aumentar el suministro de oxígeno al sitio de reacción de la glucosa oxidasa de una manera más homogénea, proporcionando un entorno para que la reacción proceda que sea más adecuada para hacer mediciones de glucosa sensibles con un amplio rango dinámico. Además, puede usarse una proteína de unión a oxígeno reversible, o un tinte sensible al oxígeno adicional, para medir ópticamente los cambios en la concentración de oxígeno que son resultado de la reacción catalizada por glucosa-oxidasa de la glucosa que está siendo mediada por oxígeno. Escogiendo este enfoque, las cuestiones de la selectividad se superan cuando se toma una medición de oxígeno de referencia en una región en el sensor de glucosa que está distante de un sitio donde la glucosa entra en el sensor, pero que tiene una concentración de oxígeno (en la región de referencia) que proporciona una medida de la concentración de oxígeno que habría estado presente en el lugar donde la glucosa entra en el sensor en ausencia de glucosa.

En una realización, la presente invención proporciona un sensor de base enzimática capaz de controlar selectiva y sensiblemente la glucosa en los tejidos subcutáneos en bajas tensiones de oxígeno. El sensor incluye una región de transporte de oxígeno que comprende una matriz de transporte de oxígeno estabilizada, una primera proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada en la matriz de transporte de oxígeno estabilizada, una primera superficie permeable a oxígeno en comunicación con un entorno externo, y una segunda superficie permeable a oxígeno que es impermeable al analito diana; una región de reacción del analito diana en comunicación con la región de transporte de oxígeno en la segunda superficie permeable a oxígeno, donde la región de reacción del analito diana comprende una enzima oxidasa del analito diana, y una superficie permeable al analito diana; y una región de detección que comprende al menos una sonda detectora en comunicación con la región de reacción del analito diana. Típicamente, una superficie impermeable al analito diana y al oxígeno se sitúa en el sensor de tal forma que la región de detección está entre la superficie impermeable al analito diana y al oxígeno y la región de transporte de oxígeno.

El analito diana puede ser, por ejemplo, glucosa, galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol o ácido láctico. En ciertos ejemplos ilustrativos, el analito diana es glucosa y el sensor es un sensor de glucosa. Por ejemplo, el sensor de glucosa puede ser un sensor de glucosa implantable, tal como un sensor de glucosa transcutáneo.

La primera proteína de unión a oxígeno reversible puede ser una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo. En ejemplos ilustrativos, la primera proteína de unión a oxígeno reversible es mioglobina o hemoglobina.

La región de detección puede incluir adicionalmente una sonda de oxígeno. Por ejemplo, la sonda de oxígeno puede ser una segunda proteína de unión a oxígeno reversible, tal como una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo. En ejemplos ilustrativos, la primera y la segunda proteína de unión a oxígeno reversible es hemoglobina.

En ciertos sensores ejemplares proporcionados en el presente documento, se usa al menos una sonda detectora que no consume sustancialmente oxígeno. La sonda detectora puede incluir adicionalmente un espectrómetro. Al menos una sonda detectora, en ciertos ejemplos, es capaz de emitir y/o recibir luz a una longitud de onda de hemoproteína creada por ingeniería sensible a oxígeno, o derivado hemo. Por ejemplo, uno o más emisores pueden

emitir luz hacia uno o más receptores, y los emisores y los receptores pueden ambos entrar en el sensor a través de un primer extremo. El uno o más emisores pueden ser una o más fibras ópticas que se forman en un bucle de tal forma que la luz que sale de las fibras ópticas del emisor transcurren en una trayectoria que es sustancialmente opuesta a la luz de una fuente de luz que entra en las fibras ópticas del emisor.

5

En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para medir una concentración de un analito, que comprende transportar oxígeno desde un entorno externo a través de una región de transporte de oxígeno que comprende una matriz de transporte de oxígeno estabilizada dentro de un sensor a una región de reacción del analito del sensor usando una primera proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada en la matriz de transporte de oxígeno estabilizada; hacer reaccionar una porción del oxígeno transportado con el analito enzimáticamente en la región de reacción del analito para formar un producto; y medir el oxígeno o un producto de la reacción de oxígeno y el analito en una región de detección que comprende la región de reacción del analito o una región de detección en contacto con la región de reacción del analito, midiendo de esta manera la concentración del analito.

10

En aspectos ilustrativos, el analito que se mide es glucosa, galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol o ácido láctico. En una realización particularmente ilustrativa, el analito que se mide es glucosa. La medición puede realizarse repetidamente, por ejemplo, al menos en un primer punto temporal y un segundo temporal, proporcionando de esta manera información con respecto a los cambios en la concentración de analito con el tiempo. En ciertos ejemplos, el oxígeno se transporta desde el entorno externo que comprende tejido subcutáneo a la región de reacción del analito usando una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo como la primera proteína de unión a oxígeno reversible. Por ejemplo, el oxígeno se transporta desde el entorno externo a la región de reacción del analito usando hemoglobina como la primera proteína de unión a oxígeno reversible.

15

En aspectos ilustrativos, el analito que se mide es glucosa, galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol o ácido láctico. En una realización particularmente ilustrativa, el analito que se mide es glucosa. La medición puede realizarse repetidamente, por ejemplo, al menos en un primer punto temporal y un segundo temporal, proporcionando de esta manera información con respecto a los cambios en la concentración de analito con el tiempo. En ciertos ejemplos, el oxígeno se transporta desde el entorno externo que comprende tejido subcutáneo a la región de reacción del analito usando una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo como la primera proteína de unión a oxígeno reversible. Por ejemplo, el oxígeno se transporta desde el entorno externo a la región de reacción del analito usando hemoglobina como la primera proteína de unión a oxígeno reversible.

20

El oxígeno puede medirse, por ejemplo, midiendo la unión a oxígeno de una sonda de oxígeno. La unión a oxígeno puede medirse usando un espectrómetro que mide la absorción de la proteína de unión a oxígeno tal como una segunda proteína de unión reversible. La segunda proteína de unión a oxígeno reversible puede ser una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo, tal como hemoglobina. En aspectos ilustrativos, la hemoglobina es tanto la primera proteína de unión reversible como la segunda proteína de unión reversible.

25

La medición se realiza típicamente usando una o más sondas detectoras, por ejemplo, una población de sondas detectoras que no consumen sustancialmente oxígeno, emitiendo luz hacia uno o más receptores que no consumen oxígeno a una longitud de onda de hemoproteína creada por ingeniería sensible al oxígeno o derivado hemo. En ciertos aspectos, la luz viaja a través de una o más fibras ópticas del emisor de una fuente de luz que emite en una primera dirección, y después viaja en una segunda dirección que es sustancialmente opuesta a la primera dirección a través de al menos una porción de la región de detección donde se recibe por una o más fibras ópticas del receptor. En un aspecto relacionado, la luz viaja a través de una o más fibras ópticas del emisor de una fuente de luz que emite en una primera dirección a través de al menos una porción de la región de detección, y después viaja en una segunda dirección que es sustancialmente opuesta a la primera dirección donde se recibe por una o más fibras ópticas del receptor. En otras palabras, las fibras del emisor o los receptores pueden incluir un bucle en la fibra.

30

El método puede incluir una medición de referencia dentro del sensor de detección. Típicamente, el analito entra en la región de reacción a través de una entrada del analito y la concentración de analito se determina usando la señal de al menos una sonda de oxígeno que está suficientemente cerca de la entrada del analito para ser sensible a los gradientes de oxígeno derivados de analito dentro de la región de detección junto con la señal de al menos una segunda sonda de oxígeno que está suficientemente lejos de la entrada del analito para actuar como una sonda de referencia para el perfil de oxígeno. La sonda de referencia puede estar suficientemente lejos de la entrada del analito de manera que la señal de la sonda de referencia no se vea sustancialmente influenciada por el analito que entra en la entrada del analito.

35

En aspectos ilustrativos, una concentración de oxígeno sustancialmente uniforme espacialmente está presente en la demarcación de la región de reacción y la región de transporte de oxígeno. Además, la región de transporte de oxígeno proporciona típicamente un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción de tal forma que la reacción enzimática no se limita a oxígeno. Además, el tamaño de la entrada del analito, la concentración de una enzima en la región de reacción, y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción puede ajustarse para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada de tal forma que el intervalo dinámico deseado de las concentraciones de analito puede medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de oxígeno insensible a analito distal a la entrada.

40

En aspectos ilustrativos, una concentración de oxígeno sustancialmente uniforme espacialmente está presente en la demarcación de la región de reacción y la región de transporte de oxígeno. Además, la región de transporte de oxígeno proporciona típicamente un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción de tal forma que la reacción enzimática no se limita a oxígeno. Además, el tamaño de la entrada del analito, la concentración de una enzima en la región de reacción, y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción puede ajustarse para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada de tal forma que el intervalo dinámico deseado de las concentraciones de analito puede medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de oxígeno insensible a analito distal a la entrada.

45

En aspectos ilustrativos, una concentración de oxígeno sustancialmente uniforme espacialmente está presente en la demarcación de la región de reacción y la región de transporte de oxígeno. Además, la región de transporte de oxígeno proporciona típicamente un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción de tal forma que la reacción enzimática no se limita a oxígeno. Además, el tamaño de la entrada del analito, la concentración de una enzima en la región de reacción, y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción puede ajustarse para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada de tal forma que el intervalo dinámico deseado de las concentraciones de analito puede medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de oxígeno insensible a analito distal a la entrada.

50

En aspectos ilustrativos, una concentración de oxígeno sustancialmente uniforme espacialmente está presente en la demarcación de la región de reacción y la región de transporte de oxígeno. Además, la región de transporte de oxígeno proporciona típicamente un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción de tal forma que la reacción enzimática no se limita a oxígeno. Además, el tamaño de la entrada del analito, la concentración de una enzima en la región de reacción, y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción puede ajustarse para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada de tal forma que el intervalo dinámico deseado de las concentraciones de analito puede medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de oxígeno insensible a analito distal a la entrada.

55

En aspectos ilustrativos, una concentración de oxígeno sustancialmente uniforme espacialmente está presente en la demarcación de la región de reacción y la región de transporte de oxígeno. Además, la región de transporte de oxígeno proporciona típicamente un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción de tal forma que la reacción enzimática no se limita a oxígeno. Además, el tamaño de la entrada del analito, la concentración de una enzima en la región de reacción, y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción puede ajustarse para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada de tal forma que el intervalo dinámico deseado de las concentraciones de analito puede medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de oxígeno insensible a analito distal a la entrada.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 proporciona un diagrama esquemático de la geometría del sensor de glucosa de acuerdo con aspectos ilustrativos de la presente invención.

5

La figura 2 es un gráfico de la tensión de fotodiodo correspondiente a la transmisión del diodo láser a través de una película de Hemoglobina (Hb) unida en una membrana impermeable a oxígeno, salvo para una pequeña región en un extremo expuesto a sus entornos. La señal representa el cambio de la absorción de Hb a 635 nm de luz láser. En el tiempo anterior a la referencia "A", se aplicó aire ambiental en la región expuesta de la película de Hb. En la referencia "A", se aplicó una mezcla de gas oxígeno al 5 % a la región expuesta de la película de Hb, seguido de aire ambiental aplicado de nuevo a la región expuesta de la película de Hb en la referencia "B".

10

La figura 3A proporciona un diagrama esquemático de un ejemplo ilustrativo de un sensor de glucosa de la presente invención, como se desvela en el Ejemplo 2. La figura 3B proporciona un diagrama esquemático del sensor de glucosa ilustrativo del Ejemplo 2 conectado a un emisor de luz 490, un detector de luz 495, y una unidad de procesamiento de señal 498.

15

La figura 4A proporciona un dibujo esquemático que ilustra la trayectoria de haces de fibra óptica y la luz en un sensor de glucosa ilustrativo de la presente invención. La figura 4B proporciona un dibujo esquemático que ilustra haces de fibra óptica y la emisión de luz en un sensor de glucosa ilustrativo de la presente invención que incluye una vista más cercana de la región de acoplamiento 425 donde el haz de detección 415 recibe luz del haz emisor 410.

20

La figura 4C proporciona un diagrama esquemático de una vista en sección transversal de un haz de detección (también denominado un haz receptor) 415 y un haz emisor 410. En la figura 4B, se ilustra una separación entre el haz emisor y la región de reacción. Sin embargo, en otros aspectos de la invención, el haz emisor está en contacto con, y hace tope contra, la región de reacción.

25

Las figuras 5A y 5B proporcionan un diagrama esquemático y gráficos que ilustran los cambios de concentración de oxígeno y glucosa esperados en un sensor de glucosa de acuerdo con la presente invención. El gráfico superior en las figuras 5A y 5B representa las fluctuaciones espaciales esperadas en la concentración de oxígeno en el tejido subcutáneo fuera del sensor de glucosa en la superficie donde el oxígeno entra en la región de transporte de oxígeno 001 del sensor de glucosa. El gráfico inferior en la figura 5A ilustra las concentraciones de oxígeno esperadas a través de la superficie del inyector de oxígeno 6 y dentro de la zona de reacción de glucosa en ausencia de glucosa. El gráfico inferior en la figura 5B ilustra los cambios en la concentración de oxígeno espaciales esperados (línea discontinua) y la concentración de glucosa (línea continua) a través de la zona de reacción de glucosa 2 en un plano dentro de la zona de reacción de glucosa 2 después de la entrada de glucosa a través de una entrada de glucosa 7.

30

35

La figura 6 ilustra la detección de glucosa en una matriz fina de glucosa oxidasa-hemoglobina de glucosa estabilizada. Los resultados se presentan como gráficos de las concentraciones de glucosa en un baño de agua con una burbuja de mezcla de gas  $O_2$  al 5 % +  $N_2$  al 95 %, que se representa en relación con la tensión de fotodiodo correspondiente cuando el gel de reacción se interrogó en una ubicación de 50  $\mu m$  o 100  $\mu m$  de la entrada de glucosa 7.

40

La figura 7 muestra la respuesta calibrada del gel fino de glucosa oxidasa - hemoglobina de la figura 6 que se representa en relación con el medidor de glucosa TrueTrack™ que mide las mismas soluciones de glucosa.

45

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que una proteína de unión a oxígeno reversible, tal como hemoglobina, puede usarse como un conducto de oxígeno en una matriz de transporte de oxígeno estabilizada. La matriz estabilizada recoge el oxígeno, estabiliza la dinámica del oxígeno, y transporta rápidamente oxígeno lejos de una región de oxígeno relativamente elevado que rodea una superficie de la matriz estabilizada, a una región de menor o nada de oxígeno sobre una segunda superficie. La matriz de oxígeno estabilizada proporciona numerosas funciones, incluyendo un rápido transporte de oxígeno en un sensor implantable y un rápido transporte de oxígeno a un tejido artificial.

50

55

Por consiguiente, se proporcionan en el presente documento biosensores, especialmente sensores de glucosa implantables, que utilizan la matriz de transporte de oxígeno estabilizada como una región de transporte de oxígeno y una región de reacción para superar los problemas de los sensores implantables, tales como cambios espaciales y

temporales en la concentración de oxígeno en el sitio de un implante. El conducto de proteína de unión a oxígeno reversible puede usarse para aumentar el suministro de oxígeno a un mediador selectivo tal como glucosa oxidasa de una manera homogénea y medible. Además, la proteína de unión a oxígeno dentro de una matriz de transporte de oxígeno estabilizada puede usarse para medir ópticamente los cambios en la concentración de oxígeno dentro de regiones de la matriz que son resultado de las reacciones dentro de la matriz en la que se consume el oxígeno, tal como una reacción catalizada por glucosa-oxidasa de glucosa con oxígeno.

En una primera realización, la presente invención proporciona un sensor que incluye una región de transporte de oxígeno que comprende una primera proteína de unión a oxígeno reversible, una primera superficie permeable a oxígeno en comunicación con un entorno externo, y una segunda superficie permeable a oxígeno que es impermeable al analito diana; una región de reacción del analito diana en comunicación con la región de transporte de oxígeno en la segunda superficie permeable a oxígeno, donde la región de reacción del analito diana comprende una enzima oxidasa del analito diana, y una superficie permeable al analito diana y una región de detección que comprende al menos una sonda detectora en comunicación con la región de reacción del analito diana. Típicamente, una superficie impermeable al analito diana y al oxígeno se sitúa en el sensor de tal forma que la región de detección está entre la superficie impermeable al analito diana y al oxígeno y la región de transporte de oxígeno. La región de detección está típicamente en comunicación óptica, eléctrica o molecular con la región de reacción del analito diana.

En ciertos aspectos, el sensor incluye un medio de transporte de oxígeno para transportar oxígeno desde una superficie en contacto con un entorno externo a una región de reacción del analito diana y un medio de detección para detectar y/o medir el oxígeno, el analito diana, o un producto de la reacción de oxígeno y el analito diana dentro de una región de detección en la región de reacción o poner en contacto de la región de reacción. Se proporcionan en el presente documento numerosos ejemplos de los medios de transporte de oxígeno y los medios de detección.

La primera proteína de unión a oxígeno reversible puede ser, por ejemplo, una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo. En ejemplos ilustrativos, la primera proteína de unión a oxígeno reversible es mioglobina, o en ejemplos ilustrativos adicionales, hemoglobina.

Muchos analitos diana diferentes pueden detectarse y medirse por los sensores proporcionados en el presente documento con la condición de que el analito diana reaccione con oxígeno. Por ejemplo, el analito diana puede ser galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol o ácido láctico. En un ejemplo ilustrativo, el analito diana es glucosa y el sensor es un sensor de glucosa. Se entenderá que las enseñanzas proporcionadas en el presente documento con respecto a glucosa pueden usarse para fabricar y usar sensores para otros análisis que reaccionan con oxígeno.

Por consiguiente, como se ilustra en la figura 1, se proporciona en el presente documento un sensor de glucosa que incluye una región de transporte de oxígeno 001, que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible, una primera superficie permeable a oxígeno 004 y una superficie permeable al oxígeno opcional 005 en comunicación con un entorno externo, y una segunda superficie permeable a oxígeno 006, a veces denominada en el presente documento como el inyector de oxígeno 006; una región de reacción de glucosa 002 en comunicación de transporte de masa con la región de transporte de oxígeno 001 en la segunda superficie permeable a oxígeno, donde la región de reacción de glucosa incluye, la proteína de unión a oxígeno reversible, una enzima glucosa oxidasa y una superficie permeable a glucosa 007, a veces denominada en el presente documento como la entrada de glucosa 007, y una región de detección 003 en comunicación óptica o eléctrica con la región de reacción de glucosa 002, donde la región de detección 003 incluye una sonda, tal como una sonda de oxígeno, una sonda de glucosa, o una sonda que se une a, o está afectada de otro modo por, un producto de la reacción de oxígeno y glucosa. La región de detección 003 puede ser una región dentro de la región de reacción 002, o una región suficientemente en contacto con la región de reacción de glucosa para representar el perfil espacial y temporal de la glucosa u otro analito diana, oxígeno, y/o el producto de reacción dentro de la región de reacción, que se interroga por una o más sondas detectoras 009, que son elementos de detección individuales 009 dentro de una interfaz de detección. Además, el dispositivo puede tener un eje de simetría 010. La región de transporte de oxígeno 001 es una matriz de transporte de oxígeno estabilizada ejemplar de la presente invención. La comunicación entre la región de transporte de oxígeno 001 y la región de reacción de glucosa 002 se produce típicamente a través de una superficie 006 donde la región de transporte de oxígeno 001 y la región de reacción de glucosa 002 están en contacto. La comunicación entre la región de transporte de oxígeno 001 y la región de reacción de glucosa 002 puede ser cualquier tipo de comunicación que implique la difusión y permita el transporte de oxígeno desde la región de transporte de oxígeno 001 hasta la región de reacción de glucosa 002. La comunicación puede ser, por ejemplo, el movimiento del líquido, gas y/o iones de la región de transporte de oxígeno 001 a la región de reacción de glucosa 002.



En ciertos aspectos de un sensor de la presente invención, una membrana externa 011 puede rodear todo o una porción del dispositivo. La membrana es típicamente permeable al oxígeno y la glucosa, pero impermeable al menos a algunas biomoléculas, tales como proteínas, especialmente biomoléculas tales como proteínas dentro del sensor y de proteínas inmunes. Por lo tanto, la membrana tiene un corte, por ejemplo, de 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, o 25.

- 5 En algunos aspectos, los poros de la membrana puede ser de hasta aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o la membrana puede ser laminar con una capa externa con poros de hasta 10  $\mu\text{m}$  para facilitar la infiltración celular, y la capa interna puede tener tamaños de poro tan pequeños como de 10 kDa para impedir el transporte de proteína.

- En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para medir una concentración de un analito, que incluye transportar el oxígeno desde un entorno externo a través de una región de transporte de oxígeno dentro de un sensor a una región de reacción del analito del sensor usando una primera proteína de unión a oxígeno reversible; hacer reaccionar una porción del oxígeno transportado con el analito enzimáticamente en la región de reacción del analito para formar un producto; y medir el oxígeno o un producto de la reacción de oxígeno y el analito. La medición se realiza en una región de detección que incluye la región de reacción del analito o una región de detección en contacto con la región de reacción del analito. Como se analiza en el presente documento, virtualmente cualquier analito puede detectarse y medirse usando los métodos en el presente documento con la condición de que el analito reaccione con el oxígeno. En ciertos aspectos, el analito que se mide es galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol o ácido láctico. En aspectos ilustrativos, el analito que se mide es glucosa. Se entenderá que las enseñanzas con respecto a la medición de la glucosa pueden aplicarse a métodos para detectar virtualmente cualquier analito que reaccione con oxígeno.

- Por consiguiente, se proporciona en el presente documento un método para medir la concentración de glucosa, que incluye transportar el oxígeno de un entorno externo a través de una región de transporte de oxígeno **001** a una región de reacción de glucosa **002** usando una proteína de unión a oxígeno reversible, hacer reaccionar una porción del oxígeno transportado con glucosa en la región de reacción de glucosa **002** para formar un producto; y medir el oxígeno, la glucosa, o un producto de la reacción de oxígeno y glucosa en una región de detección **003** dentro de la región de reacción de glucosa **002** o en contacto con la región de reacción de glucosa **002**, midiendo de esta manera la concentración de glucosa. En ejemplos ilustrativos, el oxígeno se mide en la región de reacción para medir la concentración de glucosa.

- 30 En un aspecto ilustrativo, un sensor de glucosa **100** proporcionado en el presente documento es un sensor de glucosa implantable, por ejemplo, un sensor de glucosa transcutáneo. Típicamente, el sensor de glucosa transcutáneo puede retirarse por un usuario. Algunos sensores proporcionados en el presente documento pueden suministrarse como parte de, o conectarse a un catéter, a un vaso sanguíneo. Los métodos proporcionados en el presente documento miden las concentraciones relativas o absolutas de glucosa en el tejido, transportando el oxígeno del tejido en la región alrededor del sensor a la zona de reacción de glucosa usando un medio de transporte de oxígeno. En aspectos ilustrativos, el sensor implantable se implanta en el tejido subcutáneo y el oxígeno se transporta por el transportador de oxígeno a la zona de reacción del tejido que rodea al menos una porción de un lado del transportador de oxígeno, y típicamente todos los lados del transportador excepto para el lado que es adyacente a la zona de reacción de glucosa. En realizaciones donde el sensor se implanta en el tejido subcutáneo, el sensor puede ser un sensor subcutáneo, pero típicamente el sensor es un sensor transcutáneo en el que una porción del sensor atraviesa la piel de un animal, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano. Por ejemplo, las sondas conectadas al sensor pueden atravesar la piel para alcanzar una fuente de luz y un detector que se sitúan fuera del cuerpo. En realizaciones subcutáneas, todo el sensor, así como el detector pueden situarse de manera subcutánea. La fuente de luz puede situarse de manera subcutánea, o puede usarse una fuente de luz externa que no está físicamente conectada al sensor. El sensor también puede usarse para medir las concentraciones de glucosa, así como en la vasculatura, excreciones corporales, u otros tejidos tales como el músculo, o grasa, que pueden tener mayor o menor vascularización y tensión de oxígeno que el tejido subcutáneo.

- 50 El método y los sensores proporcionados en el presente documento pueden usarse para controlar los cambios en la configuración absoluta o relativa de la glucosa. Por ejemplo, los diabéticos pueden utilizar los sensores y los métodos para controlar sus niveles de glucosa para determinar si los cambios en las concentraciones de glucosa están siendo gestionadas adecuadamente por un régimen de tratamiento. Además, los diabéticos pueden utilizar el sensor **100** en el control de la administración de insulina. Por lo tanto, los métodos proporcionados en este documento típicamente incluyen al menos la medición de las concentraciones de glucosa en un primer punto de tiempo y un segundo punto de tiempo, proporcionando de esta manera información sobre los cambios en la concentración de glucosa en el tiempo. Los dispositivos y métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para medir los cambios relativos o absolutos de las concentraciones de glucosa, con alta sensibilidad y precisión en todo el intervalo de al menos 10 a 600 mg/dl que abarca las concentraciones clínicamente relevantes

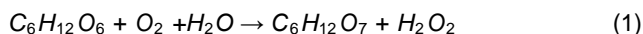
de 70 mg/dl y menos que definen la hipoglucemia, y 250-400 mg/dl y más que definen la hiperglucemia. El dispositivo explora la distribución espacial del oxígeno en una zona de reacción de glucosa en la que los cambios de la concentración de oxígeno se usan para inferir cambios de la concentración de glucosa de acuerdo con la cinética de la enzima glucosa oxidasa. La calibración del sensor, que puede incluir la medición de referencia de oxígeno que se describe en el presente documento, permite las mediciones de la concentración absoluta de glucosa en base a los cambios en la distribución de la concentración de oxígeno. Los pacientes pueden alertarse por el sensor si su glucosa en sangre desciende por debajo de las concentraciones de ajuste de fábrica o de usuario, por ejemplo, 90 mg/dl y/o si el descenso de la velocidad de concentración de glucosa excede las velocidades de ajuste de fábrica o de usuario, por ejemplo, 10 mg/dl\*min<sup>-1</sup> durante un periodo sostenido.

10

En ciertos ejemplos ilustrativos, los sensores y métodos proporcionados en el presente documento se usan para medir las concentraciones de glucosa en una base constante, tal como periódicamente en puntos temporales repetidos (por ejemplo, primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, etc., puntos temporales) o continuamente. Las mediciones de glucosa pueden tomarse virtualmente en cualquier intervalo, por ejemplo, en tiempo real para un control continuo, o a intervalos de menos de un segundo, segundos, minutos, horas o días. El control continuo incluye el uso de luz pulsada que se emite en la región de detección a una frecuencia relativamente alta (por ejemplo, una vez cada 5 o 10 segundos con 1 a 5 segundos de duración, o cada segundo con una duración de .1 - .5 segundos). Los sensores pueden insertarse fácilmente por debajo de la piel, por ejemplo, simplemente sosteniendo el alojamiento del sensor, que puede ser un cilindro de 2,54 cm (1 pulgada) de diámetro y 1,27 cm (1/2 pulgadas) de espesor del cual sobresale una aguja en la que se encuentra el sensor, y conduciendo la aguja a través de la piel hasta el tejido subcutáneo. Como alternativa, el alojamiento puede cargarse en un dispositivo cargado por resorte que se pone contra la piel, y tras el accionamiento de una palanca o botón, dicho dispositivo puede insertar la aguja bajo la piel. El dispositivo puede permanecer entonces en su ubicación transcutánea o subcutánea durante un periodo de horas, días, semanas, meses o incluso años, para permitir una detección periódica o continua de los niveles de glucosa en sangre.

Un biosensor 001 de acuerdo con la presente invención utiliza típicamente un sistema diseñado en torno a una reacción entre un compuesto y oxígeno que está mediada por una enzima oxidasa. Como una realización específica, la enzima glucosa oxidasa se usa para catalizar la reacción de oxidación de glucosa para dar ácido glucónico y peróxido en presencia de agua y oxígeno.

30



Esta reacción consume tanto el analito deseado (glucosa) como el oxígeno y crea productos distintos de oxígeno y analito deseado. Esta reacción depende tanto del analito como del oxígeno presente en el sitio catalítico de la enzima. Por lo tanto, una concentración de glucosa se acopla a una reducción de oxígeno y nuevas concentraciones de producto. Después, el sensor puede medir la concentración de glucosa midiendo la reducción en la concentración de oxígeno, glucosa, o un producto de la reacción de oxígeno y glucosa, según se consume o se produce en la reacción mediada por la enzima oxidasa. Esto requiere típicamente que se proporcione una medición de oxígeno de fondo en el sitio de la reacción de glucosa para interpretar los cambios en el campo de oxígeno.

40

Los ejemplos ilustrativos de los biosensores proporcionados en el presente documento pretenden operar en condiciones tisulares fisiológicas, en las que la disponibilidad de oxígeno es significativamente menor que la disponibilidad de la glucosa. La colocación del sensor intravenoso proximal al corazón ha demostrado ser un excelente entorno para la detección de la glucosa a largo plazo en cuanto la disponibilidad de oxígeno y el rechazo muy limitado por el cuerpo. Sin embargo, existen riesgos mortales asociados a la colocación intravenosa haciendo una colocación no vascular deseable, ya que es menos invasiva y no plantea ninguno de los riesgos amenazantes para la vida potenciales del sitio del implante vascular. Aún en los tejidos subcutáneos, se ha demostrado que la tensión de oxígeno del tejido es bastante baja en comparación con la tensión de oxígeno atmosférico o arterial. Muchos tejidos del cuerpo humano tienen una tensión de oxígeno equivalente a entre aproximadamente el 5 % de oxígeno en nitrógeno o menor, y puede haber una relación de la glucosa con respecto a oxígeno a veces tan alta como de 100 a 1 en los fluidos intersticiales subcutáneos.

50

Dado que la reacción de oxidación de la glucosa (ecuación 1) requiere cantidades molares iguales de oxígeno y glucosa, la reacción puede estar limitada por la falta de oxígeno. Si el oxígeno en volumen está considerablemente menos disponible que la glucosa en volumen (que es la norma en el entorno subcutáneo), entonces la disponibilidad de oxígeno con respecto al sitio catalítico regirá la reacción en lugar de la disponibilidad de la glucosa. Bajo estas condiciones, la cámara de reacción del sensor es como un motor de automóvil que tiene el carburador inundado de combustible, la reacción de combustión en el motor no procederá de manera eficiente con demasiado combustible y

55

sin suficiente oxígeno. La reacción de combustión todavía avanzará pero sólo en la medida en que hay oxígeno disponible ya que hay un exceso de combustible. Esto limita la sensibilidad del sistema de detección a la glucosa.

Para superar las limitaciones físicas de la glucosa, el oxígeno, y la enzima que trabajo en una solución no regulada sencilla, los biosensores de acuerdo con la presente invención se construyen muy parecidos a un motor. Dentro de esta analogía, el combustible es glucosa, la bujía de encendido es el sitio catalítico de la enzima, y el oxígeno es necesario para que la reacción avance. Esto crea un problema de transporte y de reacción. El objetivo es conseguir las cantidades equilibradas de oxígeno y glucosa con respecto al sitio catalítico de la enzima. Esto hará que la reacción en la enzima sea sensible a cambios en la concentración de glucosa, como un motor de automóvil es sensible a los cambios en el flujo de combustible controlado por el conductor, y no a los cambios en el oxígeno ambiente. Específicamente, el biosensor está diseñado para tener la reacción que sea sensible a las variaciones en la concentración de glucosa en volumen e insensible a las variaciones transitorias de la concentración de oxígeno en volumen.

15 La invención supera el problema de la sensibilidad a la glucosa limitada implementando las condiciones límites necesarias para que la reacción de la glucosa oxidasa se produzca fácilmente. Esto se logra transportando rápidamente el oxígeno necesario a una región de reacción **002** donde las condiciones límites que rigen la reacción de glucosa se regulan cuidadosamente.

20 La región de reacción **002** se forma a partir de múltiples límites (figura 1):

Un límite **006**, también denominado en el presente documento como el inyector de oxígeno, en la cámara de reacción que permite un elevado transporte de oxígeno pero no un transporte de glucosa.

25 Un límite **007**, también denominado en el presente documento como la entrada de glucosa, que permite la entrada de glucosa de la masa entera a la cámara de reacción yuxtapuesta al límite **006**. El límite **007** también puede permitir que el oxígeno entre. Todo el límite **007** puede ser permeable a la glucosa o puede contener una entrada o entradas que son permeables a la glucosa.

30 Un límite **008**, denominado la superficie de detección, que es impermeable tanto a la glucosa como al oxígeno permite la detección de la cámara de reacción y se desvía axialmente del inyector de oxígeno **006** y se yuxtapone a la entrada de glucosa **007**.

Además de los tres límites **006**, **007**, **008** que delimitan la cámara de reacción, el sistema de sensor completo contiene una región de transporte de oxígeno **001** y una región de detección **003** continua al límite **008**. En ciertos aspectos, la región de reacción **002** se interroga con una sonda de temperatura. Las lecturas de la sonda de temperatura pueden usarse en una determinación de la concentración absoluta de la glucosa, debido a la dependencia de la temperatura de la reacción de oxidación de la glucosa. La sonda de temperatura puede ser una sonda óptica por lo que la luz infrarroja se recoge por una fibra óptica o haz de fibra óptica que se acopla a un detector piroeléctrico situado en el mismo alojamiento que, y que comunica con, una unidad de señal de procesamiento. La sonda de temperatura puede usarse como una entrada con respecto a la calibración para la concentración de glucosa. Puede comunicar, por ejemplo, electrónicamente con una unidad de procesamiento de señal.

45 La región de transporte de oxígeno **001** está diseñada para recoger oxígeno, estabilizar la dinámica del oxígeno, y transportar rápidamente el oxígeno de una región extendida lejos de la cámara de reacción a la superficie de inyección de oxígeno, denominada el inyector de oxígeno, **006**, de la cámara de reacción. Por lo tanto, la región de transporte de oxígeno funciona como un medio de transporte de oxígeno. La región de transporte de oxígeno **001** proporciona un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción **002** de tal forma que la reacción enzimática no se limita al oxígeno. El elemento de detección interroga ópticamente la cámara de reacción la subregión o subregiones de la cámara de reacción para medir el oxígeno a través del límite **008**. La figura 5A demuestra la función de la región de transporte de oxígeno **001**, por lo que el oxígeno de un campo de oxígeno sustancialmente no nulo heterogéneo fuera de la primera superficie de la región de transporte de oxígeno se transporta a la segunda superficie de transporte de oxígeno **006** donde entrada en la región de reacción **002** como un campo de oxígeno uniforme que se representa por las gráficas de perfiles de concentración de oxígeno "[O<sub>2</sub>] exterior", y "superficie de detección de [O<sub>2</sub>]" (con fines de ilustración, la superficie de detección **008** y la superficie **006** tendrán perfiles suficientemente equivalentes en ausencia de glucosa).

Una "proteína de unión a oxígeno reversible" es una proteína portadora de oxígeno que se une de forma reversible a

- oxígeno a concentraciones de oxígeno fisiológicamente relevantes. La proteína de unión a oxígeno reversible se une a oxígeno a algunas presiones parciales más elevadas y libera oxígeno cuando las concentraciones de oxígeno disminuyen, el cambio en la saturación de la proteína en función de la presión parcial de oxígeno que se describe por una curva de saturación de oxígeno (también denominado disociación). Por ejemplo, las curvas de saturación de oxígeno de las proteínas de unión a oxígeno de forma reversible hemoglobina o mioglobina tienen características de carga y descarga muy diferentes como se resume por sus curvas de saturación sorprendentemente diferentes. La curva de saturación de hemoglobina es sigmoide, lo que refleja su unión cooperativa, mientras que para la mioglobina es hiperbólica, lo que refleja una unión no cooperativa. Comparando las curvas para hemoglobina con respecto a mioglobina, la saturación de la mioglobina es siempre mayor que la hemoglobina a todas las presiones parciales, lo que indica la afinidad más elevada de la mioglobina para oxígeno que la de la hemoglobina para el oxígeno. En consecuencia, en los capilares sanguíneos (la presión parcial del oxígeno es de aprox. 20 mmHg) la mioglobina liberará su oxígeno a los tejidos, permitiendo a la mioglobina almacenar el oxígeno para liberarlo posteriormente a los tejidos.
- 15 La proteína de unión a oxígeno reversible contiene un sitio de unión a oxígeno que se modula por al menos una unidad peptídica. Por ejemplo, un grupo hemo se modula en hemoglobina o mioglobina. Sin embargo, el sitio de unión a oxígeno reversible puede no emplear un grupo hemo como es el caso para algunos ortólogos de hemoglobina. Por ejemplo, las proteínas de unión a oxígeno reversibles que se encuentran en los invertebrados, tales como la hemocianina que se encuentra en los moluscos y artrópodos cangrejos que tiene dos iones de Cu para el sitio de unión a oxígeno reversible, o la hemeritina que se encuentra en algunos invertebrados marinos que tampoco contiene un grupo hemo. La proteína de unión a oxígeno también puede derivarse sintéticamente con múltiples funciones, tales como la albúmina sérica humana recombinante (rHSA) que incorpora la hemo sintética "albúmina-hemo" para formar una proteína de plasma portadora de oxígeno (J Biomed Mater Res. 15 de diciembre de 2004; 71A(4): 644-51), o tal como el polipéptido beta-globina de anti-formación humano recombinante, designado beta(AS3) (betaGly(16) --> Asp/betaGlu(22) --> Ala/betaThr(87) --> Gln), se designó para aumentar la afinidad para alfa-globina (J Biol Chem. 25 de junio de 2004; 279(26): 27518-24. Epub 14 de abril de 2004). Adicionalmente, pueden usarse otros cambios genéticos para conseguir diferentes variantes de proteínas de unión a oxígeno reversibles, tales como la hemoglobina recombinante producida por Escherichia coli (alfa 29leucina --> fenilalanina, alfa 96valina --> triptófano, beta 108asparagina --> lisina) que muestra baja afinidad a oxígeno y alta cooperatividad combinada con la resistencia a la auto-oxidación (Biochemistry. 5 de octubre 1999 5; 38(40); 13433-42.

La proteína de unión a oxígeno reversible en los ejemplos ilustrativos está presente en la región de reacción de glucosa (también denominada la zona de reacción de glucosa) y/o la región de detección, así como la región de transporte de oxígeno. La proteína de unión a oxígeno reversible está presente en la región de transporte de oxígeno típicamente a una concentración de 0,1 g/dl -100 g/dl, por ejemplo 7,5 g/dl. La proteína de unión a oxígeno reversible puede aumentarse o reducirse en concentración hasta tal punto en el que las extraordinarias velocidades de transporte de oxígeno, como se ilustra en los Ejemplos, ya no pueden conseguirse más. El límite superior de la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible también se limita por la capacidad máxima para cargar la proteína en base a la masa de la proteína.

- La proteína de unión a oxígeno reversible en realizaciones ilustrativas es un portador de oxígeno de origen natural, por ejemplo, un derivado hemo o una proteína de unión a oxígeno que no contiene hemo, o la proteína de unión a oxígeno reversible es una hemoproteína creada por ingeniería. Una hemoproteína creada por ingeniería es un portador de oxígeno basado en hemo de origen sintético o una proteína portadora de oxígeno basada en hemo de origen natural modificada adecuada para realizar la función de la proteína de unión a oxígeno reversible que se desvela en el presente documento. La proteína está diseñada típicamente usando tecnologías de ADN recombinante. Un derivado hemo es un portador de oxígeno basado en hemo de origen natural tal como una proteína de unión a oxígeno, que incluye, por ejemplo, hemoglobina y mioglobina, u ortólogos de origen natural y variantes de los mismos. En ciertos ejemplos ilustrativos, la proteína de unión a oxígeno reversible es hemoglobina.
- La proteína de unión a oxígeno reversible típicamente experimenta cambios relativamente grandes en la saturación de O<sub>2</sub> con respecto pequeños cambios en la presión parcial de O<sub>2</sub>. Por ejemplo, en las aplicaciones de sensor transcutáneo, la proteína de oxígeno reversible puede experimentar cambios relativamente grandes en la saturación en presiones parciales de O<sub>2</sub> hasta al menos, por ejemplo, de 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o el 10 %, de presiones parciales ilustrativas en ciertos tejidos subcutáneos. Por consiguiente, en los métodos proporcionados en el presente documento el oxígeno se transporta desde el entorno externo a la zona de reacción de glucosa usando hemoglobina, mioglobina o una hemo-proteína diseñada por ingeniería como la proteína de unión a oxígeno reversible. En realizaciones ilustrativas, la proteína de unión a oxígeno reversible tiene una saturación casi lineal a presiones de oxígeno esperadas para la aplicación del sensor. Por ejemplo, la proteína de unión a oxígeno reversible puede tener una respuesta de saturación casi lineal en presiones parciales de O<sub>2</sub> entre el 0 y el 1, 2, 2,5,

- 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o el 10 %, en sensores transcutáneos. En ciertos ejemplos particularmente ilustrativos, la proteína de unión a oxígeno reversible es hemoglobina a una concentración de entre 1 y 25 g/dl, por ejemplo entre 5 y 10 g/dl, o en un ejemplo ilustrativo a 7-8 g/dl, e incluso más particularmente, por ejemplo, a 7,5 g/dl. Se conocen variantes de hemoglobina dentro de y entre especies. Además, la hemoglobina o las hemo-proteínas diseñadas por ingeniería (Winslow R.M., .MP4, a new nonvasoactive polyethylene glycol-hemoglobin conjugate. *Artif Organs*. 2004 Sep; 28(9): 800-6; Komatsu T, y col., Physicochemical characterization of cross-linked human albumina sérica dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim Biophys Acta*. 18 de noviembre de 2004; 1675 (1-3): 21-31)) pueden diseñarse y producirse usando enfoque, tales como técnicas de ADN recombinante (Leon RG, y col., High-level production of recombinant sulfide-reactive hemoglobin I from *Lucina pectinata* in *Escherichia coli* High yields of fully functional holoprotein synthesis in the BLi5 *E. coli* strain. *Protein Expr Purif*. 2004 Dec; 38(2): 184-195) que pueden tener propiedades de unión a oxígeno normales o alteradas que son ideales para los biosensores proporcionados en el presente documento, dependiendo de la aplicación específica del biosensor. Adicionalmente, la hemoglobina o hemoproteína creada por ingeniería puede modificarse para conseguir diferentes curvas de saturación de oxígeno adecuadas para la administración o mejores propiedades de medición para un sensor transcutáneo que funciona a las tensiones de bajo oxígeno fisiológico esperado. Los ejemplos de modificaciones incluyen el entrecruzamiento como parte del proceso para crear la matriz estabilizada con hemoglobina usando glutaraldehído u otros agentes para cambiar la p50 de la curva de insaturación de hemoglobina. En el caso de la modificación de glutaraldehído, el grado del cambio de p50 dependerá de la fuente de hemoglobina (por ejemplo, humana o bovina), la relación molar de glutaraldehído con respecto a hemoglobina y si se incluyen cofactores adicionales durante el entrecruzamiento (Keipert, P.E., y col., Functional properties of a new crosslinked hemoglobin designed for use as a red cell substitute. *Transfusion*. 1989 Nov-Dec; 29(9): 768-73; y Eike, J.H., Effect of glutaraldehído concentration on the physical properties of polymerized hemoglobin-based oxygen carriers. *Biotechnol Prog*. 2004 Jul-Aug; 20(4): 1225-32). En ciertos aspectos, la región de transporte de oxígeno incluye una serie de bandas, comprendiendo cada una, una diferente hemoproteína creada por ingeniería, mioglobina, variante de hemoglobina, o hemoglobina, o una combinación de las mismas, con una curva de saturación de oxígeno alterada, de tal forma que las proteínas de unión a oxígeno reversibles en cada banda tienen diferentes características de carga y/o descarga de oxígeno. Tal diseño puede usarse para configurar el sensor de glucosa para una aplicación particular.
- 30 Se entenderá que aunque el sensor y los métodos proporcionados en el presente documento se ilustran usando la detección de glucosa, las enseñanzas en el presente documento pueden usarse en los sensores y los métodos también para detectar otros analitos. Por consiguiente, se proporcionan en el presente documento métodos y dispositivos de sensores para medir un analito, donde el dispositivo incluye una región de difusión de oxígeno que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible a una concentración suficiente para transportar el oxígeno de una o más superficies de entrada de oxígeno de la región de difusión de oxígeno a una zona de reacción de analito que incluye una enzima oxidasa que cataliza la reacción de oxígeno con el analito. El dispositivo típicamente incluye una región de sensor para medir el analito, oxígeno o un producto catalizado por la enzima oxidasa. El dispositivo en los ejemplos ilustrativos, mide el oxígeno midiendo los cambios en la absorción de la proteína de unión a oxígeno reversible (es decir, utiliza la proteína de unión a oxígeno reversible tanto como un transportador de oxígeno como una sonda de oxígeno). Puede medirse virtualmente cualquier analito usando los sensores y los métodos de la invención donde el oxígeno puede usarse como un cofactor para una reacción enzimática que implica el analito, y el O<sub>2</sub> no está presente tras la finalización de la reacción enzimática. Además de la glucosa oxidasa, como se ilustra en el presente documento, otros analitos que pueden medirse incluyen galactosa, usando galactosa oxidasa, lactosa, usando lactosa oxidasa, peróxidos, usando peroxidasa, colesterol usando colesterol oxidasa, aminoácidos usando aminoácido oxidasa, alcohol usando alcohol oxidasa, y ácido láctico usando lactato oxidasa.

Las características de una proteína de unión a oxígeno reversible pueden analizarse con respecto a la proteína de unión a oxígeno reversible ilustrativa hemoglobina. Las características de carga y descarga no lineales de hemoglobina y mioglobina facilitan en gran medida el transporte de oxígeno de la masa entera a través de la región de transporte de oxígeno **001** y hasta la cámara de reacción a través del inyector de oxígeno **006**. Las características de transporte de hemoglobina mueven el oxígeno a través de la región de transporte de oxígeno **001** a las regiones de tensión de oxígeno bajo a una velocidad muy por encima de la difusión normal. Este tránsito extremadamente rápido acoplado con las características de carga y descarga únicas de la hemoglobina crean una distribución espacialmente sustancialmente uniforme o auto-consistente que puede identificarse por el valor de referencia de oxígeno a través del perfil de la región de transporte de oxígeno **001** en la superficie del inyector **006**. Adicionalmente, estas características de carga y descarga únicas regulan las variaciones en el suministro de oxígeno que se transporta a través de la región de transporte de oxígeno **001**. Un valor en la referencia debería corresponder con la misma distribución de oxígeno independientemente de la distribución fuera de la primera superficie de la región de transporte de oxígeno. Aquí "corresponder" pretende significar que un valor de referencia

- codifica únicamente una distribución de oxígeno a través del inyector. Aunque un campo o perfil de oxígeno del inyector no espacialmente uniforme puede dar como resultado un campo de oxígeno no monotónico en la zona de reacción de glucosa que puede compensarse en una calibración apropiada, un campo o perfil de oxígeno del inyector espacialmente sustancialmente uniforme proporciona una calibración de oxígeno con respecto a glucosa más sencilla. Por lo tanto, la región de transporte de oxígeno **001** proporciona un perfil de concentración de oxígeno sustancialmente amortiguado temporalmente con respecto a la dinámica del oxígeno de masa entera en el límite **006** de la zona de reacción de glucosa **002** y la región de transporte de oxígeno **001**. Esas características únicas permiten que el conducto **001** se extienda hasta el entorno de tejido de masa entera, uniendo de forma eficaz un suministro de oxígeno de los capilares y las arteriolas a la región de reacción **002** donde se necesita para la reacción oxidativa mediada enzimáticamente. El área de recogida de oxígeno extensiva de la región de transporte de oxígeno, **001** mueve el oxígeno hasta el pequeño volumen de la región de reacción **002** que suministra oxígeno suficiente para la reacción de la glucosa oxidada. En este sentido, la región de transporte de oxígeno **001** actúa como una microcirculación artificial que acopla la región de reacción **002** a la microcirculación del tejido.
- 15 El potencial conductor de oxígeno de la región de transporte de oxígeno **001** también mejora otra barrera clave en la detección subcutánea a corto plazo. Se han hecho numerosos intentos para fabricar dispositivos implantados por vía subcutánea para medir la glucosa en los diabéticos. Sin embargo, los dispositivos experimentales han fracasado en última instancia debido a la falta de sensibilidad a la glucosa después de la implantación. La falta de sensibilidad se ha atribuido, entre otras cuestiones, al aislamiento del electrodo del biosensor por capas de tejido tipo cicatricial.
- 20 La escala y la composición biocompatible del exterior de la región de transporte de oxígeno **001** deben permitirle permanecer proximal a las arteriolas y numerosos capilares. Esto debe permitir que se siga transportando suficiente oxígeno al sitio de detección, incluso si el dispositivo está encapsulado. Por consiguiente, el sensor de glucosa implantable **100** de la presente invención en ciertas realizaciones ilustrativas, puede contener una gran gama de disposiciones geométricas diferentes de los componentes de sensor principales que producirán un dispositivo operativo. En ciertos aspectos, la geometría puede ser, por ejemplo, un cilindro de no más de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mm<sup>3</sup> de volumen total. Por ejemplo, en realizaciones donde el sensor de glucosa implantable tiene forma cilíndrica, el diámetro del sensor de glucosa implantable en ciertos aspectos no es mayor de 3,4 mm, 0,64 mm, o 0,31 mm. En ciertas realizaciones, el diámetro del sensor de glucosa implantable es el diámetro de una aguja hipodérmica de calibre 18, 23, o 30. En una realización ilustrativa, el diámetro puede ser tan pequeño como de 0,030 mm y tan grande como de 0,31 o 0,64 mm donde el menor representa la implantación de una única sonda de fibra óptica y el mayor representa haces de fibra óptica implantados en una jeringa de aguja que varía de calibre de 30 a 23. La longitud del sensor de glucosa implantable puede ser, por ejemplo, entre 1 mm y 100 mm, o en ciertos ejemplos ilustrativos preferidos, se encuentra entre 2 mm y 10 mm donde la longitud es una compensación entre la recogida de oxígeno y el confort.
- 35 Por consiguiente, las longitudes de los diversos límites y regiones con el sensor proporcionado en el presente documento son lo suficientemente pequeñas para permitir que el sensor tenga las dimensiones totales generales proporcionadas anteriormente. Por ejemplo, el inyector de oxígeno **006** puede tener, por ejemplo, entre 0,05 y 10 mm, 0,1 y 1 mm, o entre 0,1 y 0,3 mm de longitud. La entrada de glucosa **007** tiene típicamente entre 0,0001 y 1 mm, o en ejemplos ilustrativos, entre 0,001 y 0,1 mm de longitud. La superficie de detección **008** puede tener, por ejemplo, entre 0,05 y 10 mm de longitud y, en ejemplos ilustrativos, tiene entre 0,1 y 0,3 mm de longitud. La relación de la longitud del inyector de oxígeno **006** con respecto a la longitud de la entrada de glucosa **7**, tiene típicamente entre 1 y 1000 y, en una realización ilustrativa, tiene entre 5 y 100, o más específicamente entre 6 y 30. Sin embargo, se reconocerá que los biosensores proporcionados en el presente documento son escalables y pueden adoptar diversas formas. La entrada de glucosa es lo suficientemente pequeña para asegurar que una subregión dentro de la región de reacción **002** no tiene glucosa detectable. En ciertos aspectos, una longitud característica de la entrada de glucosa, definida como la raíz cuadrada de su área, no tiene más de 1/2 de una longitud característica de la región de reacción de glucosa donde la longitud característica se define como la distancia desde la entrada de glucosa al límite eficaz de la región de reacción de glucosa en una dirección que apunta a lo largo de la superficie normal de la entrada de glucosa. Con respecto a las relaciones de otras regiones del sensor de la presente invención, la longitud del inyector de oxígeno **006** puede ser, por ejemplo, aproximadamente idéntica, o idéntica a la longitud de la superficie de detección **008**. La relación del volumen de la región de transporte de oxígeno **001** y el volumen de la región de reacción **002** es típicamente al menos 2:1, y en aspectos ilustrativos es 5:1, 10:1, 100:1, 250:1, 500:1, o 1000:1. En realizaciones preferidas, las relaciones de al menos 5:1, y tanto como 200:1, pueden implantarse donde 200:1 representa una región de reacción de 0,050 mm de espesor **002** con una región de transporte de oxígeno de 10 mm **001**.

La región de transporte de oxígeno **001** en ciertos ejemplos tiene un área en sección transversal de entre 0,005 y 1 mm<sup>2</sup>, o en una realización ilustrativa, es entre 0,015 y 0,08 mm<sup>2</sup>, las áreas en sección transversal del diámetro

- interno de la aguja de calibre 30 y 23 respectivamente, y la región de reacción de glucosa **002** tiene típicamente un área en sección transversal correspondiente a lo largo del eje de la región de transporte de oxígeno **001**, al igual que la región de detección **003**, en ciertos aspectos. La región de detección en ciertos ejemplos, tiene un área en sección transversal ligeramente reducido en comparación con la región de transporte de oxígeno. En aspectos donde la
- 5 entrada de glucosa **7** es un orificio circular, el diámetro puede estar entre 1  $\mu$ m y 1 mm, pero se entenderá que la longitud de la entrada de glucosa **7**, independientemente de su forma puede ser tan grande como la distancia desde el inyector de oxígeno **006** a la superficie de detección **008**. La región de reacción de glucosa **002** tiene típicamente un área en sección transversal correspondiente a lo largo del eje de la entrada de glucosa **007** de entre aproximadamente 10  $\mu$ m y 1 mm, por ejemplo, entre 25  $\mu$ m y 250  $\mu$ m, o en ciertos ejemplos ilustrativos,
- 10 aproximadamente 100  $\mu$ m. Sin limitarse por la teoría, se cree que las grandes relaciones entre las áreas en sección transversal a lo largo del eje de la región de transporte de oxígeno **001** y a lo largo del eje de la entrada de glucosa **007** (y de la propia entrada de glucosa), explican al menos parte de la capacidad del sensor para operar en entornos de bajo oxígeno.
- 15 Dentro de la región de reacción **002**, también denominada como una zona de reacción o una cámara de reacción, se proporciona un medio para transportar rápidamente oxígeno desde el límite de la región de transporte de oxígeno (es decir, el inyector de oxígeno) **006** hasta la región de reacción y a los sitios catalíticos de las enzimas en la región de reacción. Esto puede realizarse de nuevo empleando una proteína de unión a oxígeno reversible tal como hemoglobina, mioglobina, o una hemoproteína creada por ingeniería para disminuir la resistencia al transporte de
- 20 oxígeno de la superficie del inyector de oxígeno hasta los sitios catalíticos de la enzima glucosa oxidasa. Adicionalmente, la presencia de una proteína de unión a oxígeno reversible dentro de la región de reacción también disminuirá la capacidad de difusión de la glucosa, ayudando a regular la reacción disminuyendo el flujo de glucosa por debajo del gradiente establecido en la región de reacción **002**, como se analiza en más detalle a continuación. El resultado neto es que la reacción enzimática sigue siendo sensible a los cambios en la concentración de glucosa de
- 25 masa entera en un amplio intervalo de concentraciones de glucosa de masa entera, y que la reacción acopla los cambios de masa entera en la concentración de glucosa a los cambios en el campo de oxígeno en la zona de reacción.
- En ciertos aspectos, la proteína de unión a oxígeno reversible dentro de la región de transporte de oxígeno **001**, y/o
- 30 la proteína de unión a oxígeno reversible y la glucosa oxidasa en la región de reacción de glucosa **002** pueden situarse en una emulsión estabilizada para asegurar la alta disponibilidad de los portadores de oxígeno a los sitios catalíticos de la enzima en la zona de reacción. Por ejemplo, la emulsión estabilizada puede ser una matriz estabilizada.
- 35 Las enseñanzas en el presente documento con respecto a una región de transporte de oxígeno **001** y una región de reacción **002** de un biosensor **100**, se aplicables más generalmente a cualquier método o dispositivo para transportar rápidamente oxígeno de una región de presión parcial de oxígeno relativamente elevada a una región de presiones parciales inferiores, como se ilustra en los Ejemplos proporcionados en el presente documento. Esta aplicabilidad general es especialmente cierta para aspectos de la invención donde la región de transporte de oxígeno y/o la región
- 40 de reacción son matrices estabilizadas. El transporte se produce típicamente sin convección. Por consiguiente, se proporciona en el presente documento en otra realización, una matriz de transporte de oxígeno estabilizada que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada en la matriz de transporte de oxígeno estabilizada. La proteína de unión a oxígeno reversible está estabilizada típicamente por toda la matriz. Sin embargo, como se indica en el presente documento, la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible puede cambiar
- 45 dentro de la matriz.
- La matriz estabilizada recoge el oxígeno, estabiliza la dinámica del oxígeno, y transporta rápidamente oxígeno dentro de la matriz. Por ejemplo, la matriz estabilizada puede transportar oxígeno desde una región de oxígeno relativamente elevado que rodea una superficie de la matriz estabilizada, a una región de menor o nada de oxígeno
- 50 sobre una segunda superficie. Además, la matriz estabilizada puede transportar oxígeno a un sitio dentro de la matriz o yuxtapuesto a la matriz, donde se produce una reacción en la que se consume el oxígeno, como se ilustra por la región de reacción **002** en los sensores de glucosa proporcionados en el presente documento. En realizaciones ilustrativas, la proteína de oxígeno reversible, como se indica en el presente documento para otras realizaciones de la invención, es hemoglobina, mioglobina, o una hemoproteína creada por ingeniería.
- 55 La matriz de transporte de oxígeno estabilizada puede adoptar virtualmente cualquier forma con la condición de que al menos 1 superficie de la región de transporte de oxígeno sea permeable a oxígeno y una segunda superficie sea permeable a oxígeno o el oxígeno se consuma en una región dentro de la matriz de transporte de oxígeno estabilizada. Por ejemplo, la matriz puede ser una o una serie de láminas o cilindros.

La matriz de oxígeno estabilizada puede incluir una diversidad de componentes además de la proteína de unión a oxígeno reversible, como se desvela en el presente documento con respecto a una región de transporte de oxígeno **001** y una región de reacción **002** de un sensor **100**. Por ejemplo, la matriz estabilizada puede incluir una proteína portadora para proteger la función de la proteína durante la estabilización de la matriz y durante el funcionamiento del sensor. La proteína portadora en ciertas realizaciones ilustrativas es albúmina sérica y/o gelatina. Se ha indicado que la adición de la proteína portadora del 1 al 15 % en peso de la concentración final protegerá la función de la proteína (Pat. de Estados Unidos n.º 6.815.186), especialmente para cargas enzimáticas relativamente bajas, típicamente igual a, o menor del, 70 % en la concentración final. En ciertos aspectos, la carga puede ser tan alta como de 15 g/l a 25 g/l a concentraciones finales. La estabilización de la matriz puede conseguirse, para un ejemplo no limitante, a través del entrecruzamiento por al menos uno de los siguientes agentes: un aldehído, tal como glutaraldehído o formalina, una carbodiimida, un imidoéster, un pirocarbonato, un epóxido o N-hidroxisuccinimida éster. En ciertos aspectos, la matriz estabilizada contiene la enzima catalasa o peroxidasas para disminuir los niveles de peróxido dentro de la matriz. En ciertos aspectos, la carga de catalasa puede ser de 1 a 20 unidades/ml (véase, por ejemplo, formulaciones de glucosa oxidasa disponibles en Biozyme, Reino Unido) o de 100 a 1000 unidades/ml; y la Sol. Pat. Pub. de Estados Unidos n.º 2002/0006634). Además, la matriz de oxígeno estabilizada puede incluir ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), PLLA, poli(caprolactona) (PCL), poli(dioxanona) (PDS), o un material inhibidor de la capsula fibrosa que promueve la neovascularización, tal como politetrafluoroetileno (PTFE), politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), polipropileno, y alcohol polivinílico (PVA). Estos componentes pueden usarse para estabilizar la proteína de unión a oxígeno reversible en la matriz de transporte de oxígeno. La concentración de proteína de unión a oxígeno reversible puede ser tan pequeña como del 10 % en masa dentro del polímero, o en ciertos ejemplos, usando polietilenglicol como el polímero, en el orden de 5 a 200 partes de proteína de unión a oxígeno reversible con respecto al polímero, y aún conservar sus características portadoras de oxígeno (véase, por ejemplo, Wettstein y col., "Resuscitation with polyethylene glycol-modified human hemoglobin improves microcirculatory blood flow and tissue oxygenation after hemorrhagic shock in awake hamsters", Crit Care Med 2003 Vol. 31, N.º 6; Moore, "Blood Substitutes: The Future Is Now", J Am Coll Surg., Vol. 196, N.º 1, enero de 2003, y Pat. de Estados Unidos N.º 5.585.484). La matriz de oxígeno estabilizada puede incluir silicio o puede revestirse con un revestimiento de silicio, caucho o un polímero. Además, en ciertos aspectos, toda o una porción de la matriz de transporte de oxígeno estabilizada puede encapsularse por una membrana, tal como una membrana no natural hecha de, por ejemplo, un material hidrófobo, tal como silastic. En ciertos aspectos, la matriz de transporte de oxígeno estabilizada incluye una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada en la matriz de transporte de oxígeno estabilizada dentro de los poros de una membrana permeable. La membrana puede hacerse virtualmente de cualquier tipo de material de membrana, pero en ciertos aspectos, es una membrana biocompatible que puede implementarse en un animal, especialmente un mamífero, tal como un ser humano. En ciertos aspectos, el material de membrana puede ser un material de origen natural tal como, pero sin limitación, colágeno, alginato, agarosa, derivados de ácido hialurónico, quitosano, pegamento de fibrina, o un polímero sintético, tal como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), PLLA, poli(caprolactona) (PCL), poli(dioxanona) (PDS), o un material inhibidor de la capsula fibrosa que promueve la neovascularización tal como politetrafluoroetileno (PTFE), politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), polipropileno, y alcohol polivinílico (PVA).

En una realización relacionada se proporciona en el presente documento un método para transportar oxígeno desde una primera área que tiene una concentración de oxígeno relativamente alta a una segunda área que tiene una concentración de oxígeno relativamente baja, que incluye poner en contacto el oxígeno de la primera área, con una primera superficie de una matriz de transporte de oxígeno estabilizada que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada a través de toda la matriz de transporte de oxígeno estabilizada, y transportar oxígeno lejos de la primera superficie de la matriz de transporte de oxígeno estabilizada a una segunda superficie de la matriz de transporte de oxígeno, donde la segunda superficie de la matriz de transporte de oxígeno entra en contacto con la segunda área. La matriz de transporte de oxígeno reversible es un ejemplo de un medio de transporte de oxígeno. El transporte de oxígeno desde una región de transporte de oxígeno **001** a una región de reacción **002** de un sensor **100**, es un ejemplo ilustrativo de esta realización.

En otra realización relacionada más, se proporciona en el presente documento un método para transportar oxígeno desde una primera área que tiene oxígeno hasta una área de reacción, que incluye poner en contacto el oxígeno de la primera área, con una primera superficie de una matriz de transporte de oxígeno estabilizada que incluye una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada a través de toda la matriz de transporte de oxígeno estabilizada, y transportar el oxígeno lejos de la primera superficie al área de reacción, donde el oxígeno se consume en una reacción en el área de reacción. El transporte del oxígeno dentro de una región de reacción **002** de un sensor **100** desde un sitio de concentración de oxígeno relativamente alta lejos de una entrada de glucosa a un sitio de glucosa



más cercano a la entrada de glucosa, es un ejemplo ilustrativo de esta realización. Los métodos de la presente invención pueden usarse para transportar oxígeno a través de distancias de entre **001** mm y 20 mm, por ejemplo, entre ,01 mm y 0,5 mm.

5 Las matrices de oxígeno estabilizadas proporcionan numerosas funciones, incluyendo no sólo el rápido transporte de oxígeno en un sensor implantable, sino también el rápido transporte de oxígeno a un tejido artificial. Como tal, las matrices de transporte de oxígeno estabilizadas proporcionadas en el presente documento se pueden usar como sistemas de suministro de oxígeno para los órganos artificiales o trasplantes de células/tejido. Las matrices de oxígeno estabilizadas son importantes para lograr respuestas deseadas del trasplante, tales como, pero sin  
10 limitación, viabilidad, diferenciación, y función, que depende de la disponibilidad de oxígeno. De hecho, una o más matrices de transporte de oxígeno estabilizadas pueden ser parte de una microvasculatura artificial, un tipo específico de región de transporte de oxígeno utilizado para recoger el oxígeno de las regiones de presiones parciales elevadas distales de un implante y descargar el oxígeno al implante donde la presión parcial de oxígeno es inferior. En estas realizaciones, las matrices de transporte de oxígeno estabilizadas pueden formar un conjunto en  
15 forma de araña de regiones de transporte de oxígeno o una malla reticulada de matrices, con el fin de maximizar el área de superficie de la matriz de transporte de oxígeno estabilizada que entra en contacto con las regiones de tejido que tienen oxígeno.

También pueden usarse microvasculaturas artificiales compuestas por matrices de transporte de oxígeno estabilizadas que se proporcionan en el presente documento para suministrar oxígeno a los tejidos endógenos, para  
20 un ejemplo no limitante, en una patología, en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en la cicatrización de heridas, en el tratamiento de la hipoxia cerebral o la encefalopatía hipóxica, o en la reinserción de miembros después de la amputación. Otras aplicaciones incluyen el suministro de oxígeno a tumores para evitar la radio y quimiorresistencia mediada por hipoxia, el tratamiento de afecciones médicas relacionadas con la hipoxia, tales  
25 como artritis reumatoide y otros tipos de artritis, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, enfermedades de la piel, tal como el eccema y psoriasis, vasculopatía inflamatoria diabética y la neuropatía diabética, y la degeneración del tendón.

Los biosensores de la presente invención, en ciertos aspectos ilustrativos, utilizan el descubrimiento de que un  
30 método óptico se puede acoplar con un mediador selectivo, tal como glucosa oxidasa, para desarrollar un sensor de glucosa que operará con precisión en los tejidos subcutáneos. El componente detector de oxígeno del biosensor se consigue mediante la interrogación del campo de oxígeno dentro de la región de reacción **002**. Esto se logra eléctrica u ópticamente, en el que los volúmenes de la región de reacción **002** unidos por el límite de la región de transporte de oxígeno **006** y el límite de detección **008** se muestrean por una o más sondas de detección. La figura  
35 5B ilustra la transformación del perfil de oxígeno de un perfil relativamente uniforme, como se muestra en la figura 5A en ausencia de glucosa, en un perfil sustancialmente no uniforme tras la entrada de la glucosa a través de la entrada. Como se ilustra en la figura, la glucosa en la entrada reacciona con el oxígeno, que se media por la enzima glucosa oxidasa, por lo que el oxígeno se consume. El consumo de oxígeno determina un perfil de oxígeno dentro de la región de reacción que es detectable dentro de la región de detección, que depende de la concentración de  
40 glucosa, la carga de la enzima, y el flujo de oxígeno en la superficie del inyector (para cualquier geometría de dispositivo dado de esta invención). Por el diseño, el perfil de oxígeno distal a la entrada de la glucosa es sensible a la concentración de oxígeno del inyector y no a la concentración de glucosa, y se puede usar como una entrada para mapear el perfil de oxígeno a una concentración de glucosa determinada. Las sondas detectoras, en aspectos ilustrativos, son una serie de sondas que no consumen oxígeno sustancialmente que, en ciertos aspectos,  
45 consumirán menos del 10 % del oxígeno dentro de la región de detección por tiempo característico en la que el tiempo característico es el tiempo de subida del 95 % para la concentración de oxígeno dentro de la región de detección después de un cambio de etapa de la concentración de oxígeno en su límite con la región de reacción, o en ciertos aspectos, con la superficie de inyector. En otros aspectos, el tiempo característico puede definirse como el tiempo de subida del 95 % de la concentración de oxígeno dentro de la región de detección después de un cambio  
50 de etapa de la concentración de glucosa en la entrada de la glucosa. Las sondas detectoras son típicamente conductos de luz que recogen la luz de un extremo y la guían de manera eficiente a un segundo extremo. Los emisores son sondas detectoras que emiten la luz que interactúa con un medio sensible a oxígeno dentro de la zona de reacción **002**. Los receptores recogen la luz que hace contacto con los medios sensibles al oxígeno, para su análisis. Por lo tanto, los emisores y receptores forman un medio de detección. Por ejemplo, las sondas detectoras  
55 pueden ser fibras de fibra óptica, haces de fibra óptica, o guías de luz, incluyendo guías de luz líquidas. Sin embargo, las sondas detectoras en ciertos aspectos, son sustancialmente electrodos que no consumen oxígeno sustancialmente que miden el oxígeno o un producto de la reacción a través de un sistema de detección de polarográfico. En otros aspectos, se utilizan una o más sondas amperimétricas como sondas detectoras para medir el oxígeno o un producto de la reacción de oxígeno y un analito tal como glucosa, utilizando un método de

- amperimétrico. El método amperimétrico típicamente no consume oxígeno, pero consume un producto de la reacción enzimática entre el analito diana y el oxígeno. En ciertos aspectos, la una o más sondas detectoras son electrodos de peróxido. El peróxido es un producto de una reacción catalizada por glucosa oxidasa. Los electrodos de peróxido se pueden usar junto con una referencia de oxígeno que podría ser polarográfica u óptica o cualquier sonda que sustancialmente no consume oxígeno. La profundidad de la interrogación se puede ajustar. Además, en los ejemplos ilustrativos, la región está espacialmente muestreada con más de una trayectoria de luz para proporcionar una mayor precisión en el control de cambios en el campo de oxígeno de la zona de reacción. Pueden detectarse oxígeno, glucosa, o un producto de la reacción de oxígeno y glucosa.
- 10 Dado que una proteína de unión a oxígeno reversible, tal como hemoglobina, está presente por toda la región de reacción **002**, puede servir tanto como un transportador de oxígeno como una sonda de oxígeno. En otras palabras, tanto la primera proteína de unión a oxígeno reversible, un transportador de oxígeno ejemplar, como la segunda proteína de unión a oxígeno reversible, una sonda de oxígeno ejemplar, pueden ser hemoglobina. Por lo tanto, en ciertos aspectos, la sonda de oxígeno es una molécula ópticamente sensible, por ejemplo un hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo, tal como hemoglobina.
- 15 En otros aspectos, la sonda de oxígeno es una sonda óptica, tal como un colorante, que en función del tinte específico utilizado, puede consumir oxígeno. Los medios ópticos de medición de la saturación de oxígeno de la hemoglobina están bien establecidos, lo que permite que la concentración de oxígeno se mida ópticamente de una manera sensible y selectiva. Esto proporciona mediciones de la concentración de oxígeno, a través de, y si es necesario, fuera de la zona de reacción de la enzima.
- 20 Por consiguiente, en ciertos ejemplos ilustrativos, las sondas emiten y reciben luz a una longitud de onda de absorción de hemoglobina sensible a oxígeno, o una longitud de onda de absorción sensible al oxígeno de otra proteína de unión a oxígeno reversible. Una longitud de onda de absorción de hemoglobina sensible al oxígeno es una longitud de onda que pertenece al subconjunto de las longitudes de onda del espectro de absorción de la hemoglobina para el que la absorción es una función de la saturación de oxígeno de la hemoglobina. Cuando se usa hemoglobina como la proteína de unión a oxígeno reversible, las sondas detectoras emiten y reciben luz a entre 600 y 800 nm.
- 25 Las longitudes de onda mayores de 800 nm también tienen las propiedades favorables de baja absorción y de los cambios en la absorción con la oxigenación. Las longitudes de onda más cortas de 600 nm tienen una absorción muy alta y son menos adecuadas para medir la oxigenación debido a un caudal de luz deficiente. Para el dispositivo ilustrado en los Ejemplos en el presente documento, se escogieron 635 nm por su bajo coste y ubicuidad en la fabricación y la industria de los chips de silicio, la optoelectrónica y circuitos integrados. Otras dos longitudes de onda de trabajo incluyen, por ejemplo, 660 nm o 905 nm, que se utilizan comúnmente para medir la oxigenación de la hemoglobina. Puede usarse una segunda longitud de onda, además de una longitud de onda primaria para mejorar la estabilidad de calibración. En particular, la longitud de onda isobéctica de la hemoglobina, 805 nm, se puede utilizar para proporcionar una medición independiente de la oxigenación que se realiza por y proporciona una medida de la cantidad de hemoglobina encontrada en la trayectoria de la luz.
- 30
- 35

- Las cuestiones de la selectividad se superan por métodos de biodetección y los dispositivos biosensores proporcionados en el presente documento, cuando se toma una medición de fondo de oxígeno en una región en el sensor de glucosa que está distante de un sitio **007** donde la glucosa entra en el sensor, pero que tiene una concentración de oxígeno que es similar a la inicialmente presente en el sitio donde la glucosa entra en el dispositivo. Por consiguiente, para tratar adicionalmente el tema de la sensibilidad y el rango dinámico de detección, se diseñan tres superficies **006**, **007**, y **008** de la región de reacción **002** para crear un gradiente de glucosa a lo largo del límite de detección **008**, que también se crea por la muy elevada normalización espacial lateral del oxígeno de la región de transporte de oxígeno. Por consiguiente, en un punto a lo largo de un límite de detección **008** en la zona de reacción, toda la glucosa medible se ha convertido en producto, mientras que en el límite de entrada de la glucosa **007**, la concentración de glucosa es mayor. Este diseño hace que la glucosa se extraiga por debajo de un gradiente de concentración desde el límite de entrada de la glucosa **007** hacia el centro de la cámara de reacción. En consecuencia, existe un gradiente de oxígeno en la cámara de reacción, ya que se consume junto con la glucosa por la glucosa oxidasa. Cuando este campo de oxígeno es espacialmente interrogado por los elementos de detección ópticos, el resultado es un perfil que depende de la concentración de glucosa de masa entera. El resultado es que la reacción enzimática sigue siendo sensible a los cambios en la concentración de glucosa de masa entera en un amplio intervalo de concentraciones de glucosa de masa entera, y esta reacción acopla los cambios de masa entera en la concentración de glucosa a los cambios en el campo de oxígeno en la zona de reacción.
- 40
- 45
- 50
- 55 La composición de la región de reacción **002** está diseñada para contener suficiente glucosa oxidasa y la proteína de unión a oxígeno reversible de manera que la glucosa se mueva de la entrada de la glucosa **007** a través de la región de reacción **002**. Su concentración se reduce de tal forma que en un punto a lo largo de la zona de reacción **002** lejos de la entrada de la glucosa **007**, la concentración de glucosa se reduce a un nivel que no reduce sensiblemente la concentración de oxígeno, incluso en presencia de glucosa oxidasa. La región de referencia **029** es la región

dentro de la región de reacción **007** donde la concentración de glucosa es suficientemente baja a fin de no reducir sensiblemente la concentración de oxígeno en la región de referencia **029**. El inicio exacto de la región de referencia **029** dentro de la región de reacción **002** depende de la velocidad de reacción de la glucosa cerca de la entrada de glucosa **007**, los que configurará a qué profundidad se extiende el gradiente de oxígeno. Esto se controla por el diseño a través de la carga de glucosa oxidasa, la concentración de proteína de unión a oxígeno reversible, el tamaño de la entrada de la glucosa **007**, el área de la zona de reacción **002**, y la relación del área de superficie del inyector de oxígeno **006**, con respecto a la entrada de la glucosa **007**. Por lo tanto, el aspecto de medición de oxígeno de referencia de la presente invención es ajustable y escalable. En ciertos aspectos, la concentración de una enzima en la región de reacción **002**, y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción **002** se ajustan para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada **007** de tal forma que el intervalo dinámico deseado de las concentraciones de analito puede medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de insensible a analito distal a la entrada. La región de referencia es al menos lo suficientemente grande como para incluir una región de la región de reacción **007** interrogada por uno o más emisores de referencia y/o uno o más detectores de referencia. Una región de referencia **029** se encuentra dentro de la región de reacción **002**. La región de referencia **029**, por ejemplo, puede extenderse en ciertos aspectos, desde el centro de la región de reacción **007** con respecto a un plano que se extiende desde la entrada de la glucosa **007**, a un límite distal **027** de la región de referencia, y puede extenderse a través del límite distal **027**. En ciertos aspectos, por ejemplo, la región de referencia puede comenzar a aproximadamente 200 micrómetros o menos de la entrada de la glucosa.

Una o más sondas detectoras de referencia **028**, tal como uno o más haces de fibra óptica emisores de referencia, pueden emitir luz en la región de referencia **029**. Por ejemplo, las sondas de referencia pueden estar situadas al menos 1/2, 2/3, o 4/5 de la longitud total de la zona de reacción de la entrada de la glucosa. En ciertas realizaciones, los 1, 2, 3, 4 o 5 haces de fibra óptica más alejados o pares adyacentes de haces de fibra óptica, en una serie de haces de fibra óptica emisores, pueden ser el haz de fibra óptica emisor de referencia. Por lo tanto, la luz puede ser emitida desde uno o más haces de fibra óptica de referencia para excitar una sonda de unión a oxígeno, tal como la hemoglobina, y la absorción o emisión de luz de la sonda de unión a oxígeno puede ser detectada por uno o más haces de fibra óptica del detector. Esta disponibilidad de la medición de fondo para el oxígeno dentro de la zona de reacción es útil, ya que proporciona una medición de fondo de gran relevancia de la disponibilidad de oxígeno a la enzima sin alterar la reacción que se produce en la zona de reacción. La medición de referencia se puede utilizar para determinar las concentraciones absolutas o relativas de analitos, y puede proporcionar una medida que puede utilizarse para mapear un perfil de oxígeno en la cámara de reacción.

En ciertas realizaciones ilustrativas, los emisores **410** y/o los receptores **415** son fibras de fibra óptica. En una implementación de este diseño, el límite de detección **008** es el extremo de un haz de fibra óptica. La superficie resultante satisface el requisito de una condición de límite sin flujo. El diámetro del haz de fibra óptica puede estar, por ejemplo, entre 100  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ . En ciertos aspectos, el receptor, a veces denominado como un optodo receptor, o el emisor, a veces denominado como un optodo emisor, es una fibra de fibra óptica conformada. Típicamente, el sensor incluye al menos 2 receptores y/o emisores. Esto permite el muestreo espacial de la zona de reacción **002** desvelada en el presente documento, que se puede realizar utilizando más de un receptor, más de un emisor, o más de un receptor y emisor. En ciertos aspectos, el receptor es un receptor óptico electrónico miniaturizado. Las sondas detectoras, tales como las fibras de fibra óptica o haces de fibras de fibra óptica, pueden revestirse con una molécula de bioadhesivo que aumenta la adhesión de las biomoléculas a la fibra o fibras. Por ejemplo, las sondas detectoras se pueden revestir con polilisina. La molécula de bioadhesivo sirve para aumentar la adhesión de la matriz de la región de reacción **002** a la sonda detectora. En ciertos ejemplos, el emisor y/o el detector son electrónica miniaturizada alojada dentro de una carcasa del sensor, en cuyo caso no se utilizan fibras ópticas. La física de la medición para estos ejemplos es la misma que cuando se usa fibra óptica, pero el método de interrogación podría cambiar, como se entenderá. En un aspecto, pueden usarse haces de fibras fusionadas (también denominados conductos de formación de imágenes). Por ejemplo, los haces de fibras fundidas que tienen un diámetro exterior de 50  $\mu\text{m}$ , pero contienen una matriz de fibras fundidas dentro de éste, cada una, por ejemplo, de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. En este aspecto, la región de reacción puede muestrearse con una resolución de 10  $\mu\text{m}$  o menos.

En un sensor de glucosa ilustrativo que utiliza fibra de fibra óptica, un tubo de membrana de micro-poros hueco biocompatible, tal como una membrana de fibras huecas microporosas **11** permeable a la glucosa rodea la punta del haz de fibras ópticas y se extiende más allá del haz de fibras ópticas. La membrana de fibra hueca de microporos **11** cubre el límite de entrada de la glucosa **007** (es decir, la entrada de glucosa). Después, la cámara de reacción **002** se forma mediante la colocación de una mezcla de glucosa oxidasa, albúmina sérica bovina, y glucosa, y la hemoglobina oxigenada en el interior de la membrana de de microfibras hueca **11** y en la superficie del haz de fibra

óptica **008**. La mezcla se llena hasta un espesor de 50  $\mu\text{m}$  y a continuación se entrecruza usando glutaraldehído. A continuación, se añade de silicona líquida de calidad médica a la hemoglobina en una cantidad suficiente para formar una suspensión que llenará la membrana de microfibra hueca **11** creando la región de transporte de oxígeno **001** y poniendo en contacto la superficie expuesta de la cámara de reacción **002** para formar un límite **006**.

5

Se produce entonces la detección en este sensor de glucosa ilustrativo dirigiendo la luz láser a través de subregiones del haz de fibra óptica para interrogar el campo de oxígeno de la cámara de reacción mediante el control de la saturación de oxígeno de la hemoglobina. Esta luz se refleja a continuación en el inyector de oxígeno **006** de vuelta a través del haz de fibra óptica y se mide por un fotodiodo.

10

En ciertos ejemplos ilustrativos, tal como el sensor de glucosa ilustrado en la figura 3, la figura 4, y el Ejemplo 2, una matriz de fibras de fibra óptica se utilizan como los emisores **410** para emitir luz hacia un haz circular de 1/2 de fibras de fibra óptica, los receptores **415**. La matriz de fibras de fibra óptica del emisor **410** se puede formar en un bucle de tal forma que la luz emitida desde el extremo de las fibras de fibra óptica emisoras **410** se desplaza en una segunda dirección **478** que es sustancialmente opuesta, u opuesta, a la luz que entra en las fibras de fibra óptica del emisor en una primera dirección **475** producida por una fuente de luz **490**. Por lo tanto, en estos aspectos, los emisores y los receptores pueden entrar en el sensor de glucosa **400** a través de un primer extremo **482** del sensor de glucosa **400**. Este diseño lo hace mucho más conveniente para conectar el sensor de glucosa a una fuente de luz **490**, el fotodetector **495**, y/o la unidad de procesamiento de señales **498**. Además, este diseño mejora la relación señal-ruido del dispositivo sobre una que se basa en mediciones de dispersión, reflexión, absorción u otros fenómenos ópticos en los que la luz se emite y se detecta a partir de/mediante el mismo haz. Puesto que las fibras de fibra óptica del emisor se alinean fácilmente con las fibras de fibra óptica del receptor, la cantidad de luz recogida puede ser de órdenes de magnitud mayores. El haz de fibra óptica del emisor y el haz de fibra óptica del receptor puede ser un haz circular, 1/2 de haz circular, o una matriz de lado a lado, pero en los ejemplos ilustrativos, el haz emisor es una matriz de lado a lado y el haz receptor es un haz de fibras circular o de 1/2 círculo.

En otra realización, se proporciona en el presente documento un espectrómetro que comprende una fuente de luz, un fotodetector, una fibra de fibra óptica de emisor o un haz de fibra óptica de emisor de fibras, para emitir luz desde la fuente de luz a una región de detección, y una fibra de fibra óptica del receptor, o un haz de fibra óptica de receptor de fibras, para recibir la luz emitida por la fibra óptica del emisor y transmitir la luz al fotodetector, donde la fibra de fibra óptica del emisor forma un bucle de tal forma que la luz que se emite desde la fibra de fibra óptica del emisor viaja en una segunda dirección que es sustancialmente opuesta, u opuesta, a la luz producida por una fuente de luz que entra en las fibras de fibra óptica del emisor en una primera dirección. Como se comprenderá, muchas de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento dirigidas a la región de detección de un biosensor se aplican a la región de detección del espectrómetro de la presente invención. De hecho, se entenderá que un sensor de acuerdo con la presente invención utiliza un espectrómetro de la presente invención para su detección y funciones de medición de analitos. Por ejemplo, en ciertos aspectos del espectrómetro, así como en los aspectos de un biosensor de la presente invención, tal como un sensor de glucosa, la fibra de la fibra óptica del emisor y la fibra de la fibra óptica del receptor pueden introducirse en el microespectrómetro a través de un primer extremo. En una realización relacionada, se proporciona en el presente documento un método para analizar ópticamente una muestra mediante la transmisión de luz de una fuente de luz a una fibra de fibra óptica del emisor a través de una muestra hasta una fibra de fibra óptica del receptor en comunicación óptica con la fibra de fibra óptica del emisor, donde la luz viaja de la fuente de luz a través de un bucle en la fibra de fibra óptica del emisor, o haz de fibras de fibra óptica, de tal forma que la luz que sale de las fibras ópticas del emisor viaja en una segunda dirección que es sustancialmente opuesta, o contraria, a la luz producida por una luz fuente que entra en las fibras ópticas del emisor en una primera dirección. Por lo tanto, en estos aspectos, la luz puede entrar y salir del espectrómetro desde un primer extremo, que, combinado con el pequeño tamaño del dispositivo, simplifica y mejora los posibles usos de un espectrómetro proporcionado en el presente documento.

Puede usarse prácticamente cualquier fuente de luz y fotodetector para el espectrómetro o sensor de la presente invención, tal como un sensor de glucosa. La fuente de luz puede ser de banda amplia o estrecha en el espectro de luz y puede ser de entre una selección de múltiples bandas disponibles para la fibra o fibras de fibra óptica del emisor. En ciertos aspectos, la fuente de luz es una fuente de luz láser, un LED, una bombilla incandescente, una lámpara de arco, y en las realizaciones ilustrativas, la fuente de luz es un diodo láser. Las fibras de fibra óptica del emisor se pueden conectar a óptica u optoelectrónica interna o externa para controlar la longitud de onda, la intensidad, la polarización, el ancho de pulso, u otras características ópticas de la luz. La fibra receptora se puede conectar a óptica u optoelectrónica interna o externa adicional para medir la intensidad, la polarización, la decadencia fluorescente u otras propiedades ópticas en bandas estrechas o anchas del espectro de luz. Se entenderá que aunque la invención se ilustra en el presente documento por el uso de una fuente de luz y un

fotodetector, pueden usarse otros tipos de fuentes de energía y detectores, respectivamente.

En un esquema de detección alternativa, un colorante sensible al oxígeno se puede colocar en el límite de detección **008** de un biosensor o espectrómetro que se proporciona en el presente documento. El colorante puede sondarse 5 después ópticamente para controlar el campo de oxígeno y evaluar la concentración de glucosa.

El detector **495**, la fuente de luz **490**, y la unidad de procesamiento de señales **498** están conectados a un extremo del biosensor o espectrómetro que se proporciona en el presente documento. En algunos ejemplos ilustrativos, el detector **495**, la fuente de luz **490**, y la unidad de procesamiento de señales **498** están alojados dentro del mismo 10 conjunto. Para los sensores de glucosa proporcionados en el presente documento, típicamente sondas de los sensores, o tubos finos o cables u otros revestimientos que albergan las sondas, pasan a través de la piel y se conectan a un alojamiento fuera de la piel que incluye el detector **495**, la fuente de luz **490**, la unidad de procesamiento de señal **498** y, en el caso de electrónica internalizada, electrónica de soporte. Por consiguiente, en estos ejemplos ilustrativos, el dispositivo es un dispositivo transdérmico. En ciertos aspectos de un dispositivo 15 transdérmico, una unidad no desechable externa a la piel se conectoriza para conectarse con un sensor de tipo aguja implantable desechable conectorizado en su extremo posterior. En tal escenario, las dos unidades están conectadas entre sí de tal manera que, en un ejemplo ilustrativo, las fuentes de luz y los fotodetectores dentro de la unidad no desechable están alineados, a través de la conexión, con guías de luz alojadas en el sensor de tipo aguja desechable que terminan apropiadamente cerca o adyacentes a la zona de reacción de la glucosa dentro del 20 implante desechable. La unidad no desechable gestiona la sincronización de las mediciones, el análisis de datos, la fuente de alimentación, la comunicación con el paciente, etc., que la unidad desechable aloja la sonda detectora.

En ciertos aspectos ilustrativos, como se ilustra en el Ejemplo 2, el muestreo espacial de la región de reacción se consigue mediante la activación de ciertas fibras emisoras en diferentes momentos. Por ejemplo, las fibras emisoras 25 individuales **412**, pares adyacentes de fibras emisoras, o tríos adyacentes de fibras dentro de un conjunto emisor **410** pueden activarse y desactivarse en orden del más cercano o el más lejano de la entrada de la glucosa 7, al extremo opuesto. En estos aspectos, puede usarse un único fotodetector **495** para medir la luz en cada punto de tiempo en el que un par de conjuntos emisores **410** se enciende. Estas mediciones se pueden utilizar para volver a crear el contenido de oxígeno y glucosa espacial de la zona de reacción **002**, y proporcionar un aumento sustancial 30 de la relación señal-ruido sobre aspectos donde todas las fibras emisoras se encienden simultáneamente.

En ciertos aspectos, debido a que la reducción de la glucosa da como resultado peróxido, los tejidos circundantes pueden protegerse de cualquier secreción del sensor. Esto se puede lograr mediante la reducción del peróxido en 35 agua y oxígeno en el espacio que rodea inmediatamente la cámara de reacción a través de la reacción enzimática de peróxido con la catalasa.

Para evitar la deriva en el proceso de detección de oxígeno, pueden añadirse agentes (por ejemplo, catalasa, deshidrogenasa) para evitar que cualquier radical libre que se cree durante la interrogación óptica degrade la emulsión de la hemoglobina. Uno de dichos agentes es albúmina sérica sanguínea, que también se puede utilizar 40 como proteínas portadoras solubles para la reticulación de la glucosa oxidasa. La enzima glucosa oxidasa se reticula con la albúmina sérica bovina para estabilizar la actividad enzimática durante el período de control. En ciertos aspectos, la proteína portadora soluble puede ser albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana y/o gelatina. A concentraciones de glucosa oxidasa (en el orden del 70 % o más), puede ser necesario añadir las proteínas portadoras solubles para formar un hidrogel (véase, por ejemplo, Clark, Pat. de Estados Unidos N.º 6.815.186). 45 Como un método general de acuerdo con la presente invención, pueden usarse concentraciones de albúmina iniciales de 15 g/l a 25 g/l en la formación de la matriz o el hidrogel. Este valor se basa en el intervalo de albúmina humana normal que es 35-47 g/l, dividido por dos (suponiendo un hematocrito del 50 %) (datos de la web en [hoslink.com/LabResults/refrangles.htm](http://hoslink.com/LabResults/refrangles.htm)).

50 Los sensores de glucosa proporcionados en el presente documento pueden calibrarse antes de la implantación exponiéndolos a concentraciones de oxígeno de masa entera del 3 % al 7 % y de concentraciones de glucosa de 30 mg/dl a 500 mg/dl. Los perfiles individuales controlados se usan entonces para cuantificar con precisión las mediciones de glucosa desconocidas en presencia de tensiones de oxígeno de masa entera variables.

55 Los siguientes pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

### **EJEMPLO 1**

#### **ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE CONDUCCIÓN DE OXÍGENO DE LA HEMOGLOBINA**

El siguiente ejemplo ilustra la capacidad de conducir oxígeno de la hemoglobina y la funcionalidad prevista de la proteína de unión a oxígeno reversible. Se preparó una película de la hemoglobina como se indica a continuación. Se extrajo sangre humana con un dispositivo de punción en el dedo. Una gran gota de sangre se depositó en un extremo de un portaobjetos de vidrio de microscopio rectangular. Se creó un frotis de sangre de 1/8 pulgadas por 1 1/2 pulgadas de dimensión deslizando una cubierta de vidrio de microscopio de la gota de sangre, a través de un portaobjetos de vidrio para crear una fina película de sangre por el portaobjetos de vidrio. A continuación, la portaobjetos de vidrio se cubrió de celofán dejando aproximadamente 6,35 mm (1/4 pulgada) del frotis de de sangre expuesto en el eje largo. Un cubreobjetos de vidrio se colocó en el celofán para asegurar un buen sellado. Esta configuración garantiza la ausencia de límites de flujo de oxígeno en todas las superficies y los bordes del frotis de sangre, a excepción de los 6,35 mm expuestos (1/4 de pulgada) al final. Un haz de láser de diodo se dirigió a través del portaobjetos, el frotis de sangre, el celofán, y la cubierta de vidrio en un punto de 2,54 cm (1 pulgada) de los límites expuestos. Luz que sale de la muestra se midió por un fotodiodo. La tensión de fotodiodo, que es proporcional a luz recogida se controló con el tiempo antes, durante y después de cambio de las concentraciones de oxígeno en el límite expuesto.

La señal de la figura 2 representa el cambio de la absorción de la hemoglobina a 635 nm de luz láser. Esta figura muestra la respuesta del fotodiodo primero para la transición de aire ambiental en el límite con respecto a una mezcla de oxígeno al 5 %, gas nitrógeno al 95 % (flecha A), y después para la transición de esa mezcla de gas de nuevo al aire ambiental (flecha B). Como se puede ver, la tensión de fotodiodo cambia sólo segundos después del cambio de la condición límite: Por lo tanto, una cantidad significativa de oxígeno se movió 1 pulgada en cuestión de segundos, una velocidad mucho más allá de la esperada por difusión. Este experimento es fundamentalmente idéntico al escenario el transporte de oxígeno en el sensor implantado en el cuerpo; la región de transporte de oxígeno será proximal a las arteriolas y capilares de alta tensión de oxígeno y se acoplará a la zona de reacción donde se consumirá el oxígeno. Este experimento demuestra que el oxígeno del cuerpo se puede dirigir rápidamente al lugar de la reacción enzimática donde se necesita.

## EJEMPLO 2

### 30 **SENSOR DE GLUCOSA IMPLANTABLE ILUSTRATIVO**

Este Ejemplo desvela ciertas características de un sensor de glucosa ilustrativo **400** de la presente invención, como se ilustra en la figura 3 y la figura 4, e ilustra un método para fabricar el sensor de glucosa ilustrativo **400**. En el sensor de glucosa ilustrativo **400** proporcionado en este ejemplo e ilustrado en la figura 3, la fuente de luz electrónica **490** y el fotodetector **495** se comunican a través de una serie de haces de fibra óptica **410**, **415** con el sensor de la glucosa ilustrativo **400**. En el método utilizado para crear el sensor de glucosa **400**, una matriz de emisores individuales de fibra óptica **410** se dobló en forma de gancho de manera que la luz que emanaba de la red de emisores **410** viajase a través de la zona de reacción **402** y se recogiera por un haz de fibra óptica de detección **415** (es decir, un conjunto de receptores de fibra óptica). En este sensor de glucosa ilustrativo **400**, todo el extremo posterior del haz de detección **415** se acopló a un fotodetector de tipo fotodiodo **495**.

Durante el uso del sensor de glucosa **400**, se realizó un muestreo espacial de la zona de reacción **402** cambiando el patrón de emisión por debajo de la matriz de emisión **410**. En un método ejemplar, pares adyacentes de fibras emisoras dentro de la matriz **410** se encendieron en orden del más cercano al límite de la entrada de glucosa (es decir, entrada de glucosa) **407** hacia dentro, hacia la región de referencia de oxígeno donde la región de referencia de oxígeno está al menos tan lejos de la entrada de la glucosa como la distancia, en una dirección que apunta a lo largo de la superficie normal de la entrada de la glucosa, en la que los cambios de concentración de oxígeno son independientes de la glucosa, registrando cada vez la salida del único fotodiodo. La región de referencia de oxígeno era la región dentro de la región de reacción de la glucosa **402**, que transcurría entre 200 um desde la entrada de glucosa al límite **427** de la región de reacción de la glucosa opuesta a la entrada de la glucosa **407**. Esta región fronteriza **427** opuesta a la región de reacción de la glucosa en el sensor de glucosa ilustrativo era de aproximadamente 300 um desde la entrada de la glucosa **407**. Al conocer la fuente de emisión correspondiente a cada resultado de salida, el contenido espacial de la zona de reacción puede ser reconstruido. Una ventaja clave de este modo de funcionamiento sobre aquel en el que todas las fibras de emisión están encendidas al mismo tiempo y el haz de detección se divide en subconjuntos, cada uno con su propio fotodetector **495**, es el aumento sustancial de la señal por encima del ruido. Los detalles del método que se usó para hacer el sensor de glucosa ilustrativo **400** se proporcionan en los siguientes párrafos.

### La aguja de implante 480

Las agujas de implante **480** se fabrican de forma personalizada modificando agujas de jeringa de calibre 23 disponibles en el mercado. Una ventana **470** se talló en un punto en el lado o en la pared de la aguja entre la punta **481** de la aguja **480** y el extremo posterior **482** de la aguja **480** utilizando una herramienta rotativa de alta velocidad con una punta de cerámica. La ventana **470** se cortó de 1 mm de longitud, y se extendió aproximadamente 1/2 de la curvatura o la circunferencia de la aguja **480**. La punta de la herramienta rotativa se eligió para suavizar el borde de la ventana entre la pared exterior e interior de la aguja, mientras cortaba la herramienta rotativa. El objetivo de la suavización era reducir al mínimo los límites de tensión superficial, y facilitar la entrada de tejido en el espacio entre las paredes interiores y exteriores del límite de la ventana para reducir al mínimo las distancias de difusión con respecto a la zona de reacción.

### **La matriz de emisión 410**

La matriz de emisión **410** era un conjunto lineal de fibras individuales **412** con un diámetro del revestimiento (es decir, un diámetro exterior) de 40  $\mu\text{m}$  o 50  $\mu\text{m}$  y una apertura numérica de 0,54, 0,57, o 0,64. Las fibras **412** tenían una apertura numérica de **0,54**. La longitud total de la matriz **410** era ligeramente más pequeña que el diámetro interior de la aguja de implante **480**. Para este ejemplo ilustrativo, que correspondía a aproximadamente 10 fibras. Se descubrió que al acoplar las fibras de emisión **412** al acoplador de fibra de salida del láser primario utilizando un conector FC multimodo con un 125  $\mu\text{m}$  de diámetro, los pares de fibras se acoplan tan eficientemente como tripletes. Adicionalmente, las fibras individuales **412** se acoplaron mal, probablemente como resultado de la flexión alrededor del eje óptico debido a las tensiones en la fibra **412**, y el espacio extra en el conector. Tríos de fibras no se ajustan linealmente dentro del acoplador, y la muestra de un mayor volumen de la zona de reacción. Como tal, se optó por acoplar pares de fibras individuales **412** dentro de la matriz de emisión **410**, cada uno a su propia fuente de láser.

Una característica notable de este sensor de glucosa ilustrativo **400** es la curva de 180 grados en la matriz de emisión **410** permitiendo que la matriz de emisión **410** entre en la parte posterior **482** de la aguja de implante **480**, para pasar la ventana de reacción **470** tallada en la aguja **480**, y después girar en torno a la aguja **480** y alinearse en una orientación paralela adyacente al haz de detección, también denominado en el presente documento como el haz receptor **415**, como se ilustra en la figura. 3. Por lo tanto, el haz de emisión **410** y el haz de detección **415**, transcurren paralelos para un tramo del sensor de glucosa ilustrativo **400** en el extremo posterior **482** donde el haz de emisión **410** y el haz detector **415** se introducen en el sensor de glucosa **400**. La curva **414** en una sola fibra **412** se forma mediante la inserción en una aguja de calibre 30 para formar un bucle y reduciendo el tamaño del bucle hasta que sea justo ligeramente más grande que su punto de ruptura. Se aplicó una fuente de calor, en este caso una llama de un mechero, momentáneamente para fundir la fibra y hacer que cediera a las tensiones aplicadas inducidas por la flexión. Del mismo modo un conjunto de fibras se puede doblar como un grupo suministrándolas en una aguja de calibre 28 y formando un bucle ligeramente mayor que el tamaño en el que se rompen. Una vez más, se aplicó brevemente la llama de un mechero a las fibras para hacer que cedieran a las tensiones aplicadas por el bucle. En ambos casos, si el bucle resultante es demasiado grande en su radio de curvatura, el proceso puede repetirse al retraer aún más el bucle en la aguja para poner una tensión adicional en el bucle formado y calentando momentáneamente el bucle con la llama de un mechero, en realidad un encendedor Quicker Clicker™ para un tronco de chimenea. Después de probar la llama de una variedad de fuentes, incluyendo un lápiz soldador de butano, una cerilla, un soplete de propano, y un soplete, se descubrió que era necesario sólo una llama muy pequeña, y que una llama demasiado grande causaba una flexión involuntaria fuera del plano pretendido del bucle. El área de la matriz de emisión es suficientemente pequeña en comparación con el área total del sensor de glucosa y el volumen total dentro del lumen de la aguja de tal manera que una región de transporte de oxígeno **401** puede rodear la matriz de emisión en el lumen de la aguja **480** más allá de la ventana de reacción **470** y aún funcionar según lo previsto originalmente.

### **El haz de detección 415 (también denominado en el presente documento como un haz receptor)**

El haz de detección **415** en el ejemplo ilustrativo es un haz circular de fibras individuales **416**, en el que se elimina la mitad de la sección transversal circular. Es decir, en sección transversal el haz forma un 1/2 círculo. La geometría facilita la fabricación a mano a una alta tasa de rendimiento. Para un gran volumen de fabricación, pueden usarse geometrías alternativas. Se construyeron dos haces a la vez mediante la construcción de un haz circular y, a continuación, dividiendo el haz en dos haces transversales semicirculares, cada uno utilizado en su propio dispositivo. Los haces circulares se construyeron rellenando una aguja de calibre más pequeño (calibre 28) con el mayor número de fibras individuales posibles. Se usaron fibras de 50  $\mu\text{m}$  como se ha descrito anteriormente en la sección de la matriz de emisión **410**. A continuación, las fibras individuales **416** se mantienen unidas mediante esmalte de uñas de acuerdo con el siguiente protocolo. Las fibras individuales **416** están roscadas en la aguja desde

el extremo puntiagudo **481** de la aguja **480**, y salen por el extremo posterior romo **482** en al menos una pulgada. Se deposita una generosa cantidad de esmalte de uñas en la parte posterior **482** de la aguja **480**, mantenida en su lugar por la tensión superficial de la interfaz aguja/fibra/esmalte. El haz **415** se arrastra después de vuelta a la aguja, pasado el extremo romo **482**, y después se hace avanzar de nuevo de modo que el extremo del haz **415** se alinee con el extremo romo de la aguja. Un momento antes de que el endurecimiento del esmalte de uñas se haya completado, el haz **415** se hace avanzar de nuevo fuera de la aguja **480**, permitiendo que las fibras **416** se curen pero sin estar adheridas a la aguja **480**. Antes de la finalización de la curación, el haz **415** se divide cuidadosamente por la mitad con una hoja de cuchillo afilado Exacto™, a lo largo de un diámetro de la sección transversal y se deja curar. El resultado final es dos haces transversales semicirculares.

#### **Depositar la región de reacción 402 sobre el haz de detección 415**

En este sensor de glucosa ilustrativo, la región de reacción (también denominada la zona de reacción) **402** se deposita sobre la superficie del haz de detección **408** que se describe a continuación.

1. El par de haces de detección se vuelve a insertar en el extremo en punta de una aguja de calibre 28 o se mantiene en la aguja de calibre 28 utilizada para formar el par de haces, y se alinea con el extremo posterior romo **482**.

2. El extremo del haz de detección **415** y el haz emisor **410** fue pulido para aumentar la eficiencia de recogida de luz. Se ha descubierto que puede conseguirse un aumento en la eficiencia de recogida de luz de aproximadamente 3 veces mediante el pulido del extremo de recogida del haz de detección **415** y el extremo de emisión del haz emisor **410**. El pulido se logró en primer lugar por el avance ligeramente del haz más allá del extremo romo **482** de la aguja de calibre 28 y después por deslizamiento del extremo del haz en una serie de papeles de pulido para aumentar la finura según el uso de técnicas conocidas para pulir fibras a mano. "Thor's Guide to Connectorization and Polishing Optical Fibers" Thor Labs, Newton, NJ, 1997.

3. La punta del haz de fibras se sumergió en una solución del 0,1 % (p/v), o equivalentemente 1 µg/ml, de poli-lisina en agua desionizada. La poli-1-lisina se usó para facilitar la adhesión de biomoléculas al extremo del haz de detección **415**. El vidrio pulido tiene una pobre adhesión a las biomoléculas.

4. La mezcla de la región de reacción preparada se deposita sobre la punta del haz **408**. La mezcla de reacción es una matriz estabilizada compuesta por la hemoglobina, un hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo, tal como mioglobina, la enzima glucosa oxidasa, una proteína portadora, tal como albúmina, y un fijador tal como glutaraldehído. Esto se logra arrastrando en primer lugar el haz **415** de nuevo a la aguja de calibre 28 aproximadamente 2 mm desde el extremo romo de la aguja. El extremo romo de la aguja se utiliza para cortar la matriz de la zona de reacción, que se ha depositado sobre una superficie plana, tal como un portaobjetos de vidrio, en la forma exacta del lumen interior de la aguja, análogo a un cortador de galletas. Se usaron dos variaciones para realizar esta etapa.

a. Se usó un haz circular en su totalidad **415**, y se dividió en dos haces después de depositar la zona de reacción

b. Se usó un par de haces semicirculares **415**

5. El haz **415** se empuja cuidadosamente de vuelta a través del extremo romo de la aguja de calibre 28, transportando la zona de reacción cortada **402** con éste.

6. La aguja se retira del paquete **415**, y el haz **415** se sumerge en un adhesivo de silicio se diluyó con tolueno en una relación de 6:1 de tolueno para adhesivo, para recubrir la punta del haz y la zona de reacción **402** con una membrana permeable al oxígeno, e impermeable a la glucosa.

#### **Montaje del sensor de glucosa ilustrativo 400**

El sensor de glucosa ilustrativo **400** se ensambló mediante la alineación de la matriz de emisión **410** con la matriz de detección **415** fuera de la aguja de implante **480** de tal forma que la región de reacción **402** está entre la matriz de emisión **410** y la matriz de detección **415**, y luego deslizándolo la matriz de emisión alineada **410**, la región de reacción **402**, y la matriz de detección **415** (es decir, el sistema de luz acoplado) de nuevo a la aguja **480** de tal forma que la región de acoplamiento (es decir, la región entre la matriz de emisión **410** y la matriz de detección **415**, que incluye la zona de reacción de glucosa y en la que la luz de la matriz de emisión **410** se recibe por el haz de detección **415**) está dentro de la ventana de reacción **470** cortada en la aguja **480**. Las etapas se describen a continuación con más detalle.

1. El haz de detección **415** y el haz emisor **410** están ambos avanzado a través de la aguja de implante **480**, o retrocedidos a través de la aguja **480** de manera que unas pocas pulgadas de ambos se extiendan más allá del



extremo puntiagudo **481** de la aguja **480**, incluyendo la curva **414**, y el extremo de emisión **413** del haz emisor **410** y el extremo de recepción **408** del haz de detección **415**, y la longitud del haz de detección **415** y el haz emisor **410** se extiende mucho más allá del extremo posterior de la aguja de implante.

2. El extremo emisor **413** del haz de emisión **410** se coloca cerca del extremo receptor **408** del haz de detección **415** hasta que la transmisión máxima se consigue a través del extremo posterior del haz de detección **415**. Esta posición corresponderá a una geometría en la que la disposición lineal del haz de emisión **410** está alineada transversalmente con respecto al límite lineal del haz semicircular. Ese mismo límite, junto con la forma lineal del haz de emisión **410** eliminan los grados de libertad de rotación del procedimiento de alineación. De forma ideal, si sistema se construye de forma que únicamente la colocación axial sea crítica, pero puede requerirse algo de traslación transversal del haz emisor **410** con respecto al haz detector **415**.

3. Un adhesivo tal como el silicio o el esmalte de uñas, se aplica a lo largo del acoplamiento longitudinal del haz de emisión **410** y el haz de detección **415** detrás de la región acoplada óptica. Esta etapa bloquea de forma estable los dos sistemas de fibra juntos.

4. El sistema de iluminación acoplado se apoya en la aguja **480** de modo que el acoplamiento esté dentro de la ventana de reacción de **470** cortada en la aguja **480**.

5. La longitud de la aguja **480** entre la ventana de reacción **470** y la punta **481** de la aguja se llena con el material de la región de transporte de oxígeno **401** y se deja secar. La región de transporte de oxígeno es una matriz estabilizada compuesta por la hemoglobina, una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo tal como la mioglobina, una proteína portadora, tal como albúmina y un fijador tal como glutaraldehído. La mezcla se aplica al sensor antes de la finalización de su tiempo de curado de tal manera que aún se comporta como un líquido.

6. Un orificio de entrada de glucosa **407** se corta en el lado de la zona de reacción **402** usando la punta puntiaguda de una pequeña aguja de jeringa para permitir que la glucosa entre en la zona de reacción.

7. La ventana de reacción **470** se cubre con una membrana permeable a la glucosa y el oxígeno.

25 Toda la aguja **480**, o sólo la región de la ventana de reacción **470**, se cubre con una membrana biocompatible. Por ejemplo, la membrana puede ser una membrana con poros de aproximadamente 5 µm para promover la resistencia de la reacción inmune.

### **EJEMPLO 3**

30

#### **MEDICIONES DE GLUCOSA USANDO UN SENSOR ILUSTRATIVO**

Este Ejemplo demuestra la detección de glucosa en un sensor de glucosa relativamente sencillo que incluye dos matrices de transporte de oxígeno estabilizadas en comunicación entre sí. Una de las matrices de transporte de oxígeno estabilizadas ilustrativas era una región de transporte de oxígeno y la otra era una región de reacción de la glucosa que incluía un gel fino de glucosa oxidasa-hemoglobina estabilizado.

Una región de transporte de oxígeno y una región de reacción de la glucosa contiguas se depositaron sobre un portaobjetos de vidrio, se cubrieron con silicio, y una entrada de la glucosa estaba presente en una superficie de la región de reacción de la glucosa. La región de reacción de glucosa se hizo con 20 mg de glucosa oxidasa y 0,1 ml de sangre humana reticulada con una solución diluida de formaldehído. Las etapas para la construcción de la región de reacción de la glucosa se describen a continuación con más detalle.

1. Se combinaron 0,1 ml de sangre humana entera con 0,3 ml de una solución que contenía una relación 1:3 de alcohol isopropílico al 70 % con respecto a agua destilada para lisar las membranas de los glóbulos rojos.

2. Se añadieron 20 mg de glucosa oxidasa a la mezcla de células sanguíneas lisadas de la etapa 1. La mezcla no contenía ningún precipitado visible de glucosa oxidasa tras la mezcla adecuada

3. Usando el borde de un cubreobjetos de vidrio, una porción de la mezcla de la etapa 2 se transfirió a la parte inferior un portaobjetos de vidrio para formar una tira delgada a través de la dimensión corta del portaobjetos. La anchura de la tira fue de 2 mm.

4. La mezcla se dejó secar sobre el portaobjetos.

55

5. El portaobjetos de vidrio se sumergió en una solución al 4 % de formaldehído durante 10 minutos y después se aclaró con alcohol isopropílico al 70 % y se dejó secar.

La región de transporte de oxígeno se realizó con 0,1 ml de sangre humana reticulada con una solución diluida de

formaldehído. Las etapas para la construcción de la región de reacción de transporte de oxígeno y la finalización del sensor se describen a continuación con más detalle.

1. Se combinaron 0,1 ml de sangre humana entera a una relación 1:3 con respecto a una solución que contenía una  
5 relación 1:3 de alcohol isopropílico al 70 % con respecto a agua destilada para lisar las membranas de los glóbulos rojos.

2. La mezcla se mezcló hasta obtener una consistencia uniforme y aproximadamente la mitad se aplicó al  
10 portaobjetos de vidrio que contenía la región de reacción de glucosa de manera que la mezcla cubriese la mayor parte del portaobjetos de vidrio a través de su dimensión corta y formase una capa contigua a la zona de reacción de la glucosa. La mezcla se dejó secar.

3. Toda la preparación en el portaobjetos de vidrio se cubrió con una capa fina de caucho de silicona. Utilizando una  
15 cuchilla muy afilada, se cortaron ranuras paralelas a través del caucho de silicio y las capas depositadas. Un sensor se define así por las regiones contiguas entre dos ranuras paralelas. El silicio se secó por soplado con aire frío para acelerar el curado.

4. Con la punta de una aguja de jeringa, una entrada de glucosa se cortó a través de la silicona en la intersección de  
20 una de las ranuras y la región de reacción de glucosa justo debajo de donde se conectan la región de transporte de oxígeno y la región de reacción de la glucosa.

El portaobjetos de vidrio se suspendió en un baño de agua con una mezcla de gas [O<sub>2</sub> al 5 % + N<sub>2</sub> al 95 %] en burbujeo. La zona de reacción se sondeó ópticamente por luz láser enfocada en un punto de aproximadamente  
10 um de diámetro situado 50 um o 100 um de la entrada de glucosa a lo largo del eje de la superficie del inyector.  
25 La luz láser se recogió en un fotodiodo cuya corriente eléctrica se convirtió en tensión y se registró en una amplia gama de soluciones de glucosa clínica en el baño. La figura 6 muestra gráficos de las concentraciones de glucosa dentro del baño representado en relación con la tensión de fotodiodo correspondiente cuando el gel de reacción se interrogó en una ubicación de 50 um o 100 um de la entrada para la glucosa (es decir, la entrada de glucosa). Los gráficos demuestran la utilidad del muestreo espacial dentro de la zona de reacción. El punto de interrogación 50 um  
30 de la entrada de glucosa demostró una buena sensibilidad a los cambios de concentración de glucosa en concentraciones de glucosa inferiores, pero pierde la sensibilidad cerca de 150 mg/dl, momento en el que la relación de la función de potencia hizo la transición en pendiente. El punto de interrogación situado 100 um la entrada de la glucosa demostró una buena sensibilidad a 150 mg/dl hasta al menos 300 mg/dl. La información de las dos  
35 ubicaciones juntas produce una buena sensibilidad en toda la gama clínica de las concentraciones de glucosa. Las soluciones de glucosa se midieron por triplicado utilizando un medidor de glucosa de venta libre TrueTrack™ de marca compartida por Sav-On/Osco/Albertson y Home Diagnostics, Inc.

La figura 7 muestra la respuesta calibrada del gel fino de glucosa oxidasa - hemoglobina de la figura 6 representada  
40 en relación con el medidor de glucosa TrueTrack™ que mide las mismas soluciones de glucosa. Un ajuste lineal produce un valor R<sup>2</sup> de 0,99, demuestra así que los resultados se obtuvieron utilizando lo ilustrativo.

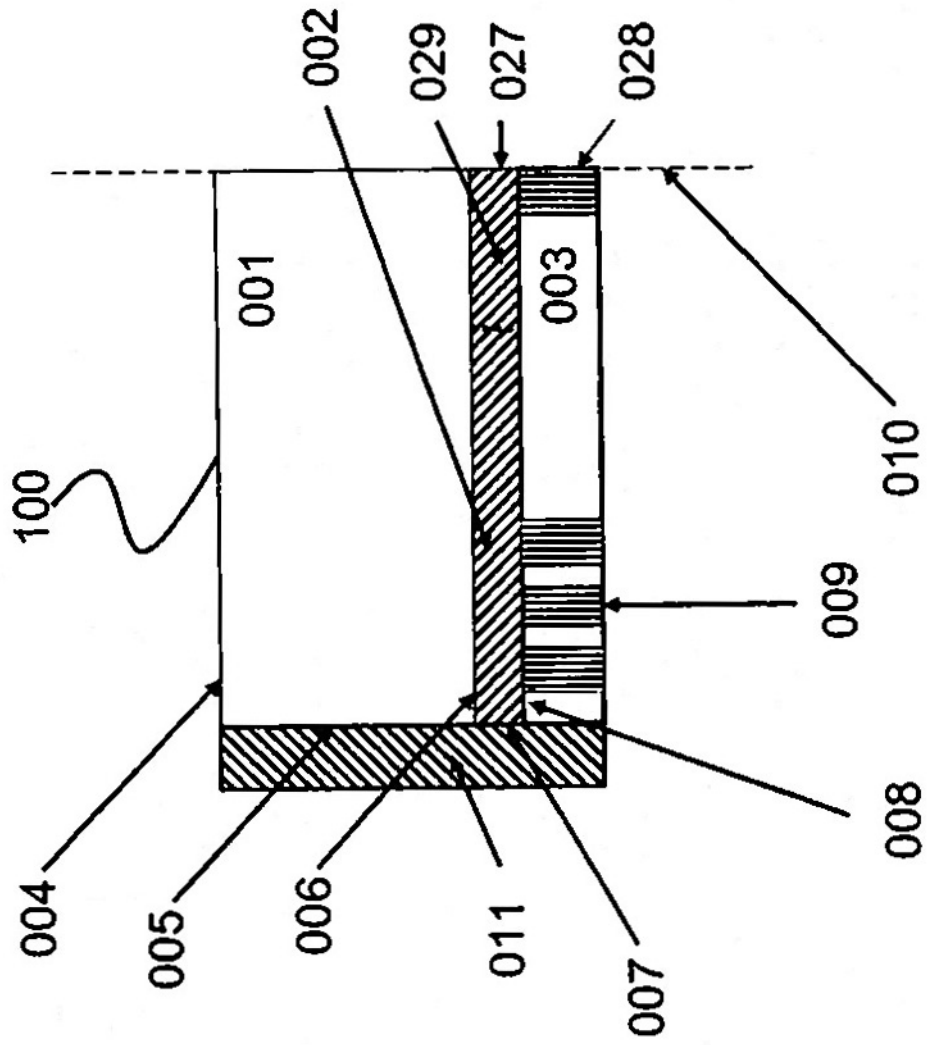
**REIVINDICACIONES**

1. Un sensor (100), que comprende
- 5 a) una región de transporte de oxígeno (001) que comprende una matriz de transporte de oxígeno estabilizada, una primera proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada en la matriz de transporte de oxígeno estabilizada, una primera superficie permeable a oxígeno (004) en comunicación con un entorno externo, y una segunda superficie permeable a oxígeno (006) que es impermeable al analito diana;
- 10 b) una región de reacción de analito diana (002) en comunicación con la región de transporte de oxígeno (001) en la segunda superficie permeable a oxígeno (006), donde la región de reacción de analito diana (002) comprende una enzima oxidasa del analito diana, y una superficie permeable al analito diana (007); y
- c) una región de detección (003) que comprende al menos una sonda de detector (009) en comunicación con la  
15 región de reacción de analito diana (002).
2. Un sensor de acuerdo con la reivindicación 1, donde la matriz de transporte de oxígeno estabilizada comprende una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada a través de la matriz de transporte de oxígeno estabilizada.
- 20 3. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la superficie impermeable al analito diana y al oxígeno se sitúan en el sensor de tal forma que la región de detección (003) está entre la superficie impermeable al analito diana y al oxígeno y la región de transporte de oxígeno (001).
- 25 4. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el analito diana se selecciona del grupo que consiste en glucosa, galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol, ácido láctico y mezclas de los mismos.
5. El sensor de la reivindicación 4, donde el analito diana es glucosa y el sensor es un sensor de  
30 glucosa.
6. El sensor de glucosa de la reivindicación 5, donde el sensor de glucosa es un sensor de glucosa implantable.
- 35 7. El sensor de glucosa de la reivindicación 6, donde el sensor de glucosa es un sensor de glucosa transcutáneo.
8. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la primera proteína de unión a oxígeno reversible es una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo.
- 40 9. El sensor de la reivindicación 8, donde la primera proteína de unión a oxígeno reversible es hemoglobina.
10. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde al menos una de la región de transporte de  
45 oxígeno (001), la región de reacción de analito diana (002), y la región de detección (003) comprenden una matriz estabilizada.
11. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la al menos una sonda de detector (009) es al menos una sonda detectora que no consume sustancialmente oxígeno.
- 50 12. El sensor de la reivindicación 11, donde la región de detección (003) comprende adicionalmente una sonda de oxígeno.
13. El sensor de la reivindicación 12, donde la sonda de oxígeno es una segunda proteína de unión a  
55 oxígeno reversible.
14. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la sonda detectora (009) comprende adicionalmente un espectrómetro.

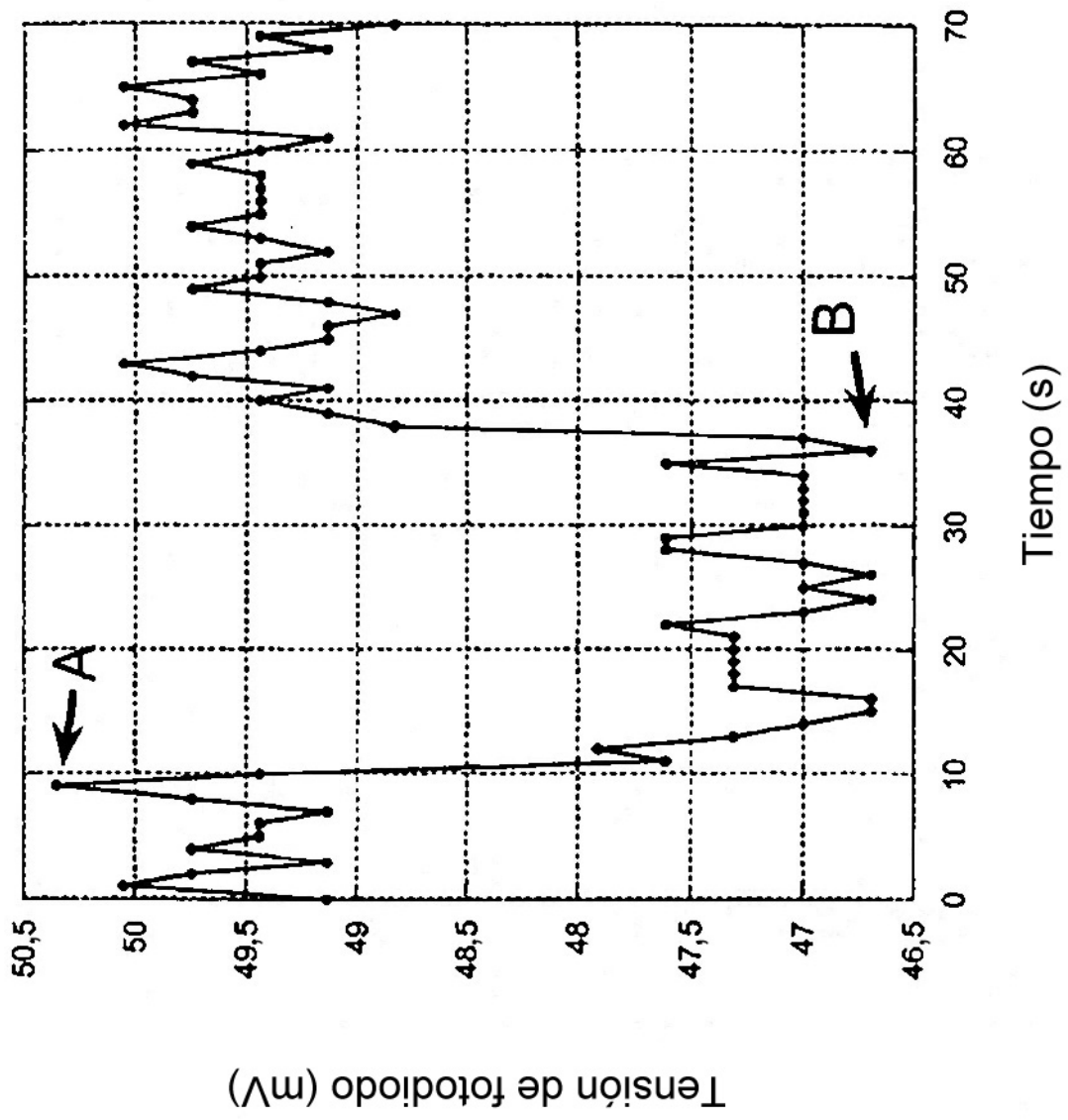
15. El sensor de la reivindicación 13, donde la segunda proteína de unión a oxígeno reversible es una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo.
16. El sensor de la reivindicación 15, donde la segunda proteína de unión a oxígeno reversible es hemoglobina.
17. El sensor de la reivindicación 13, donde la primera proteína de unión a oxígeno reversible es idéntica a la segunda proteína de unión a oxígeno reversible.
- 10 18. El sensor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la al menos una sonda de detector (009) es capaz de emisor y/o recibir luz.
19. El sensor de la reivindicación 18, donde la al menos una sonda de detector (009) es capaz de emitir y recibir luz a una longitud de onda de absorción de una hemoproteína creada por ingeniería sensible al oxígeno, o derivado hemo.
20. El sensor de la reivindicación 19, donde la al menos una sonda de detector (009) incluye uno o más emisores (410) que emiten luz hacia uno o más receptores (415), donde los emisores (410) y los receptores (415) entran ambos en el sensor (100) a través de un primer extremo.
- 20 21. El sensor de la reivindicación 20, donde el uno o más emisores (410) están compuestos por una o más fibras de fibra óptica que se forman en un bucle de tal forma que la luz que sale de las fibras de fibra óptica del emisor transcurre en una dirección (478) que es sustancialmente opuesta a la luz (475) de una fuente de luz (490) que entra en las fibras de fibra óptica del emisor.
- 25 22. El sensor de la reivindicación 20, donde el uno o más receptores (415) están compuestos por una o más fibras de fibra óptica que se forman en un bucle de tal forma que la luz que sale de las fibras de fibra óptica del emisor viaja en una dirección (478) que es sustancialmente opuesta a la luz de una fuente de luz (475) que entra en las fibras de fibra óptica del emisor.
- 30 23. El sensor de la reivindicación 18, donde la región de reacción de analito (002) comprende una entrada de analito (007) sustancialmente ortogonal a la superficie en la que la región de transporte de oxígeno (001) entra en contacto con la región de reacción de analito (002).
- 35 24. El sensor de la reivindicación 23, donde la serie de sondas comprende una sonda de referencia para medir la concentración de oxígeno de referencia en la región de reacción de analito (002), donde la concentración de oxígeno de referencia es una medición de la concentración de oxígeno en la región de reacción en ausencia del analito.
- 40 25. El sensor de la reivindicación 24, donde la sonda de referencia se comunica con la región de reacción de analito (002) más allá o en el punto en el que los efectos del analito sobre un perfil de oxígeno dentro de la región de reacción no son detectables.
26. Un método para medir una concentración de un analito, que comprende
- 45 transportar oxígeno de un entorno externo a través de una región de transporte de oxígeno (001) que comprende una matriz de transporte de oxígeno estabilizada dentro de un sensor (100) a una región de reacción de analito (002) del sensor usando una primera proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada en la matriz de transporte de oxígeno estabilizada;
- 50 hacer reaccionar una porción del oxígeno transportado con el analito enzimáticamente en la región de reacción de analito (002) para formar un producto; y
- medir el oxígeno o un producto de la reacción de oxígeno y el analito en una región de detección (003) que comprende la región de reacción de analito (002) o una región de detección (003) en contacto con la región de reacción de analito (002), midiendo de esta manera la concentración del analito.
- 55 27. Un método para medir una concentración de un analito de acuerdo con la reivindicación 26, donde la matriz de transporte de oxígeno estabilizada comprende una proteína de unión a oxígeno reversible inmovilizada a través de toda la matriz de transporte de oxígeno estabilizada.

28. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde el analito que se mide es glucosa, galactosa, lactosa, peróxido, colesterol, aminoácidos, alcohol, o ácido láctico.
29. El método de la reivindicación 28, donde el analito que se mide es glucosa.
- 5 30. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde la medición se realiza al menos en un primer punto temporal y un segundo punto temporal, proporcionando de esta manera información con respecto a los cambios en la concentración de analito.
- 10 31. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde el oxígeno se transporta desde el entorno externo que comprende el tejido subcutáneo a la región de reacción de analito (002).
32. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde el oxígeno se transporta desde el entorno externo a la región de reacción de analito (002) usando una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo como la primera proteína de unión a oxígeno reversible.
- 15 33. El método de la reivindicación 32, donde el oxígeno se transporta desde el entorno externo a la región de reacción de analito (002) usando hemoglobina como la primera proteína de unión a oxígeno reversible.
- 20 34. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde el oxígeno se mide midiendo la unión a oxígeno de una sonda de oxígeno.
35. El método de la reivindicación 34, donde la unión a oxígeno se mide usando un espectrómetro que mide al menos una longitud de onda.
- 25 36. El método de la reivindicación 35, donde el espectrómetro mide la absorción de la proteína de unión a oxígeno.
37. El método de la reivindicación 34, donde se mide la unión a oxígeno de una segunda sonda de oxígeno de proteína de unión reversible.
- 30 38. El método de la reivindicación 35, donde la segunda proteína de unión a oxígeno reversible es una hemoproteína creada por ingeniería o un derivado hemo.
- 35 39. El método de la reivindicación 38, donde la segunda proteína de unión a oxígeno reversible es hemoglobina.
40. El método de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde la medición se realiza usando una o más sondas detectoras (028).
- 40 41. El método de la reivindicación 40, donde la medición se realiza usando una población de sondas detectoras que no consumen sustancialmente oxígeno (009).
42. El método de la reivindicación 34, donde la luz se emite y se recibe por la sonda detectora (028) a una longitud de onda de hemoproteína creada por ingeniería sensible a oxígeno, o derivado hemo.
- 45 43. El método de la reivindicación 34, donde la luz se emite por uno o más emisores (410) hacia uno o más receptores (415).
- 50 44. El método de la reivindicación 43, donde la luz viaja a través de una o más fibras de fibra óptica del emisor de una fuente de luz que emite en una primera dirección (475) y después viaja en una segunda dirección (478) que es sustancialmente opuesta a la primera dirección a través de al menos una porción de la región de detección (003) donde se recibe por una o más fibras de fibra óptica del receptor.
- 55 45. El método de la reivindicación 44, donde la luz viaja a través de un bucle en las fibras de fibra óptica del emisor antes de que entre en al menos una porción de la región de detección (003).
46. El método de la reivindicación 40, donde el analito entra en la región de reacción (002) a través de una entrada de analito (007).

47. El método de la reivindicación 46, donde la concentración de analito se determina usando la señal de al menos una sonda de oxígeno que está lo suficientemente cerca de la entrada de analito (007) para ser sensible a los gradientes de oxígeno derivado de analito dentro de la región de detección (003) junto con la señal de al menos una segunda sonda de oxígeno que está lo suficientemente lejos de la entrada de analito (007) para actuar como una sonda de referencia para el perfil de oxígeno.
48. El método de la reivindicación 47, donde una sonda de referencia está lo suficientemente lejos de la entrada de analito (007) de manera que la señal de la sonda de referencia no se vea sustancialmente afectada por el analito que entra en la entrada de analito (007).
49. El método de la reivindicación 46, donde la región de transporte de oxígeno (001) proporciona un flujo de oxígeno suficiente a la región de reacción (002) de tal forma que la reacción enzimática no esté limitada en oxígeno.
50. El método de la reivindicación 49, donde el tamaño de la entrada de analito (007), la concentración de una enzima en la región de reacción (002), y la concentración de la proteína de unión a oxígeno reversible en la región de reacción (002) se ajustan para proporcionar un gradiente de oxígeno sensible a analito cerca de la entrada (007) de tal forma que el intervalo dinámico deseado de concentraciones de analito pueda medirse, y para proporcionar una concentración de referencia de oxígeno insensible a analito distal a la entrada (007).



**FIG. 1**



**FIG. 2**



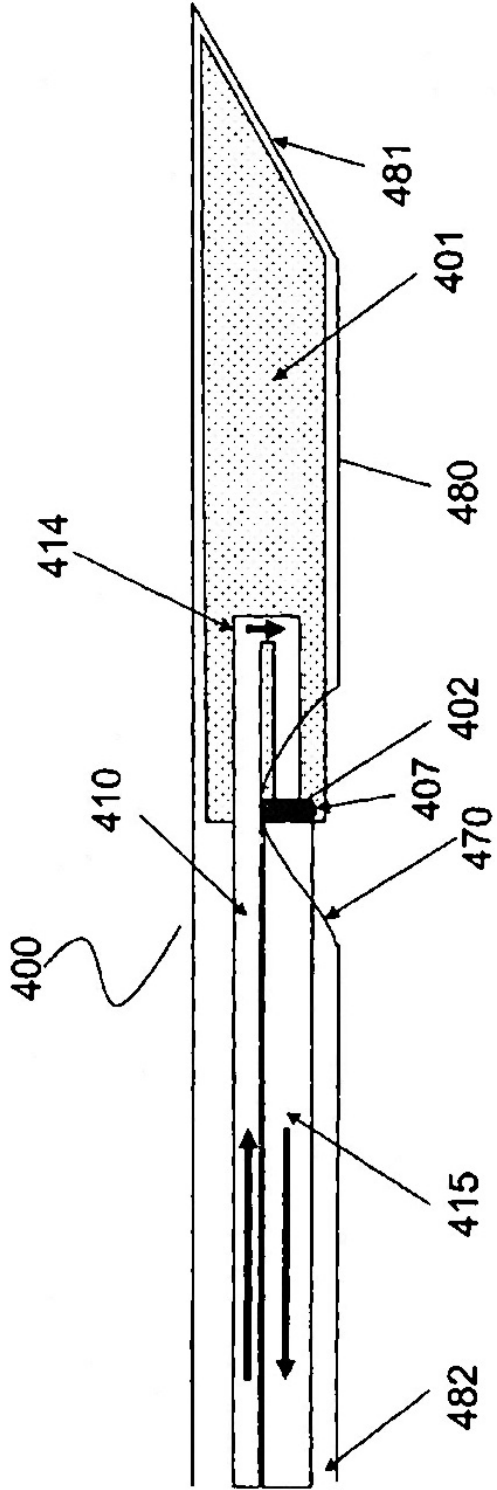


FIG. 3A

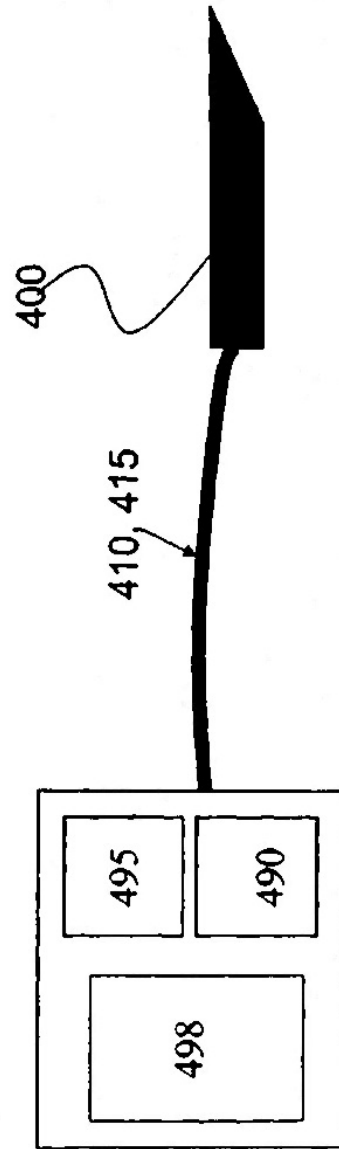


FIG. 3B

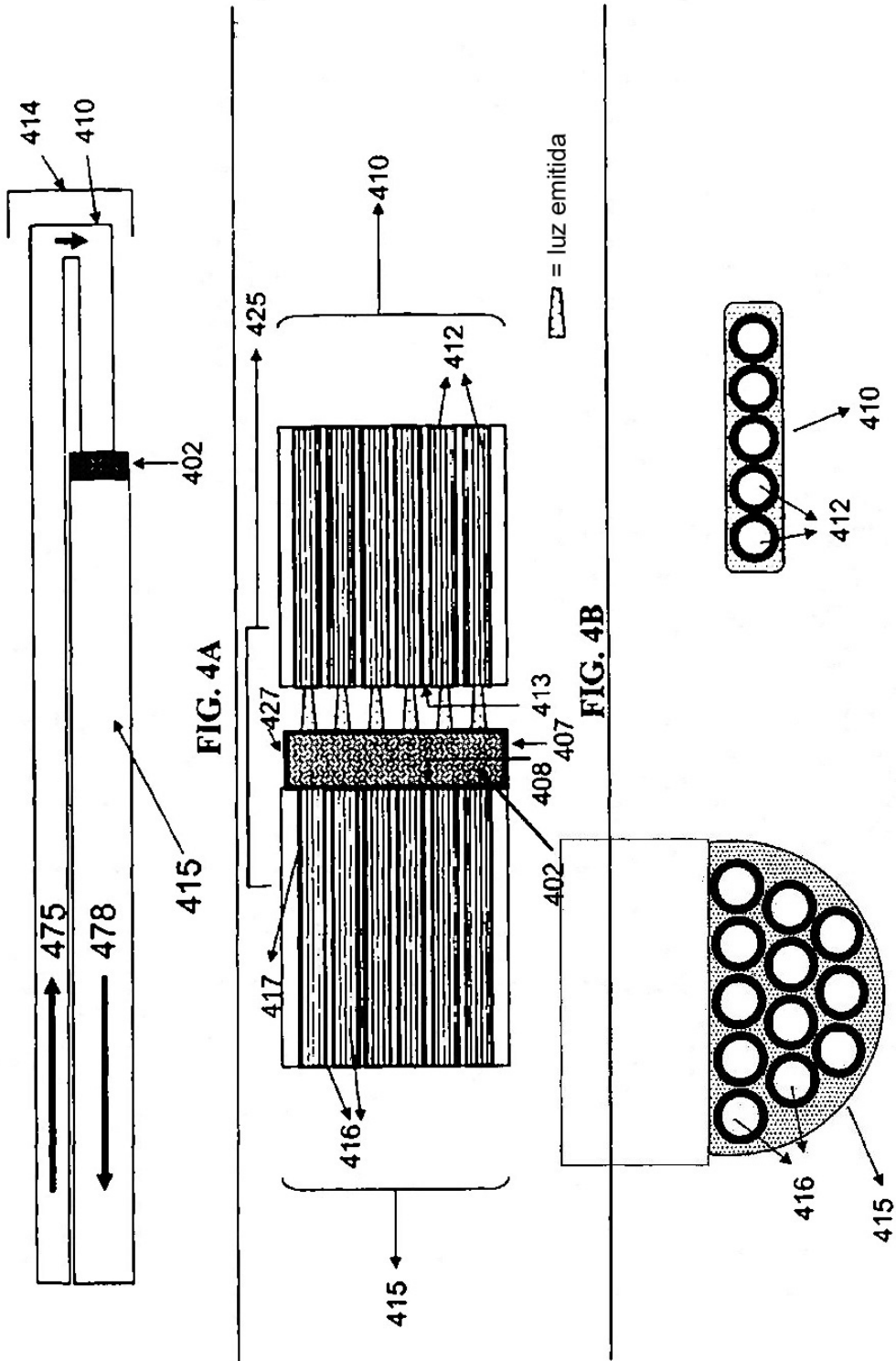


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

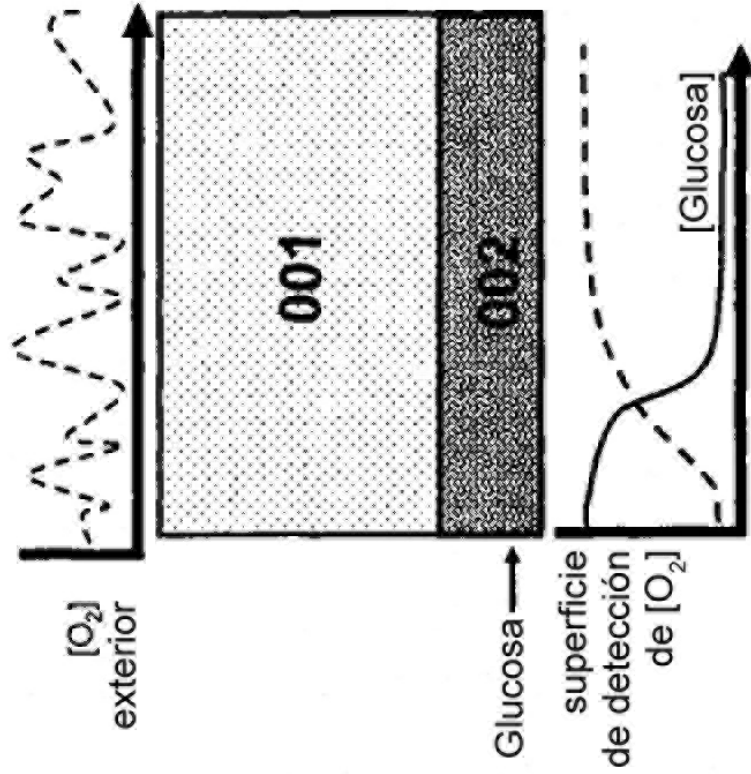


FIG. 5B

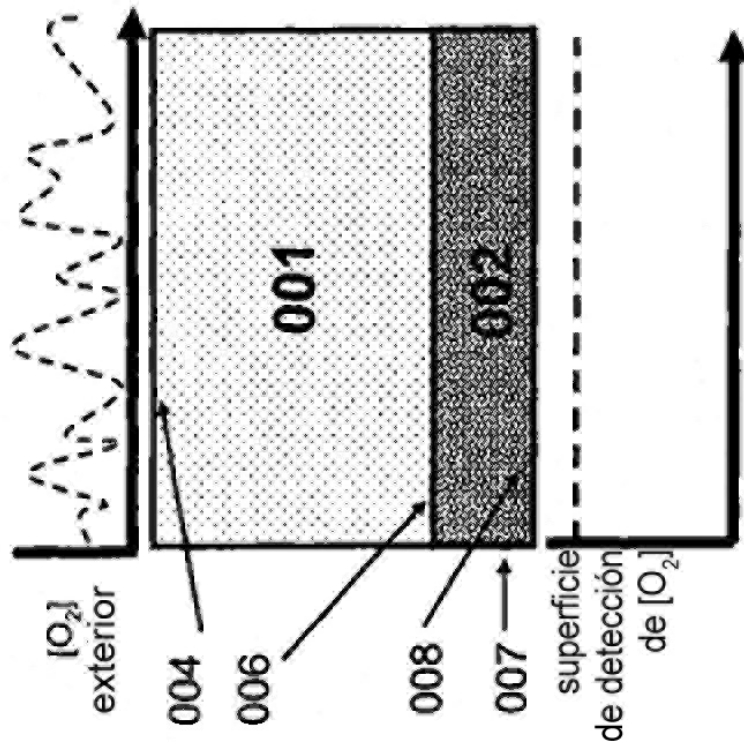


FIG. 5A

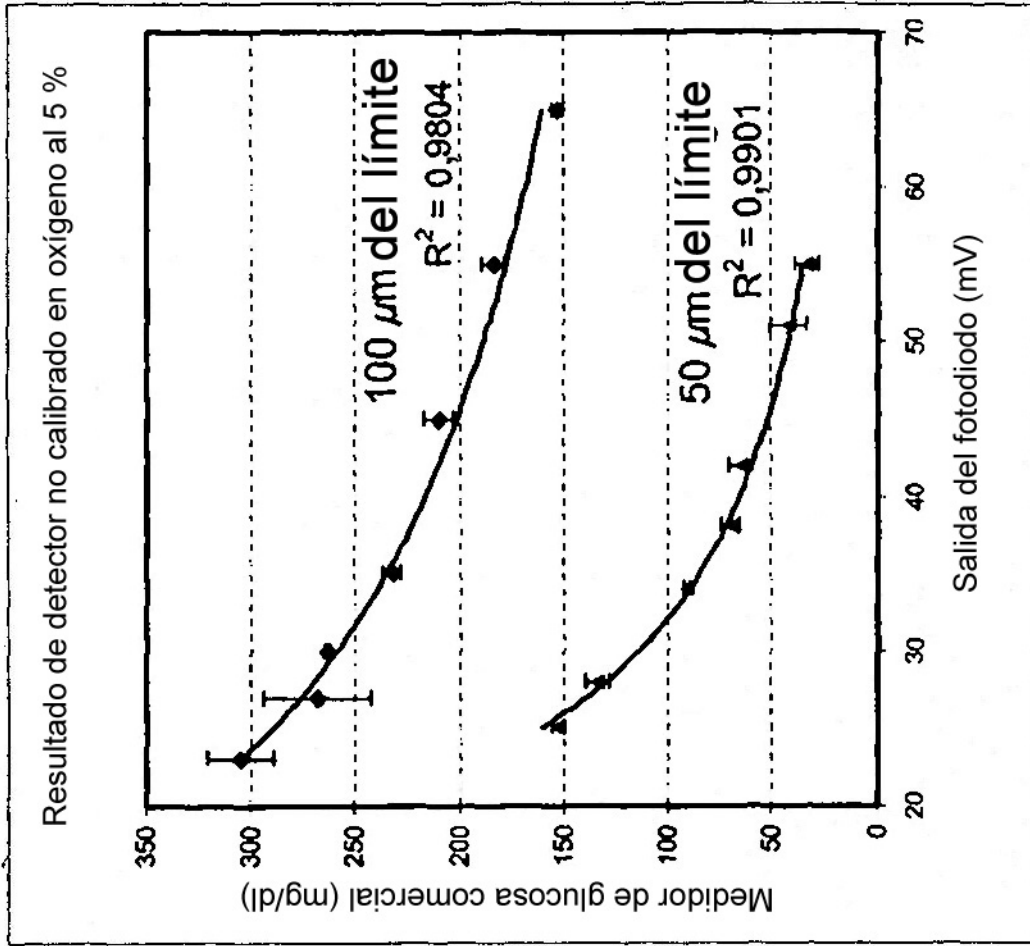


FIG. 6

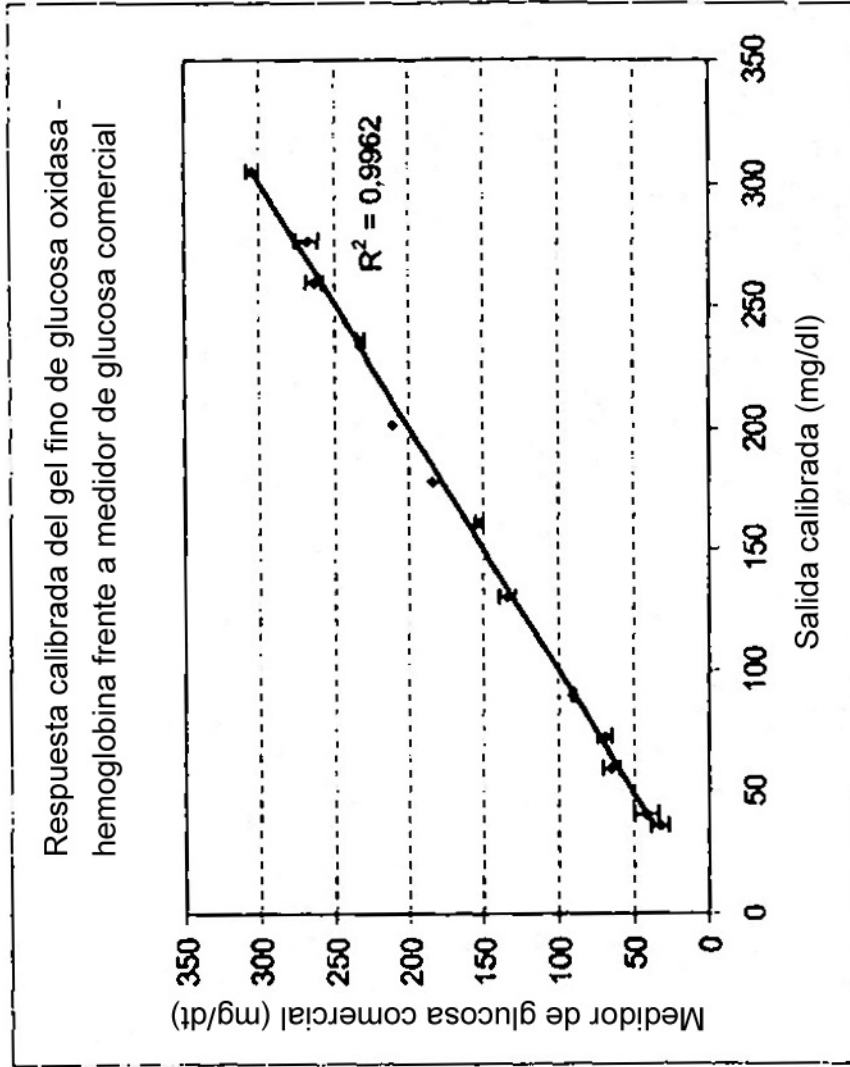


FIG. 7