

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 205**

51 Int. Cl.:

A61B 10/02 (2006.01)
A61M 5/32 (2006.01)
G01N 21/17 (2006.01)
G01N 21/45 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2017 PCT/PL2017/050030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2018 WO18132022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2017 E 17891762 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 3612102**

54 Título: **Dispositivo para detectar y/o determinar la concentración de un analito presente en un tejido y método y uso de este dispositivo**

30 Prioridad:

14.01.2017 PL 42018917

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2023

73 Titular/es:

**SDS OPTIC SPOLKA AKCYJNA (100.0%)
ul. Gleboka 39
20-612 Lublin, PL**

72 Inventor/es:

**STANISZEWSKA, MAGDALENA;
STANISZEWSKI, MARCIN;
FIDELUS, JANUSZ;
BUDNICKI, DAWID;
NAPIERALA, MAREK;
WYSOKINSKI, KAROL;
SZOSTKIEWICZ, LUKASZ y
NASIŁOWSKI, TOMASZ**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 935 205 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para detectar y/o determinar la concentración de un analito presente en un tejido y método y uso de este dispositivo

5

CAMPO TÉCNICO

El objeto de la invención es un dispositivo para la detección y/o determinación cuantitativa de un analito presente en un tejido, que comprende un sensor, que es un interferómetro de fibra óptica, y también un método para la detección y/o determinación cuantitativa de un analito presente en tejido por medio de este dispositivo y uso de este dispositivo para la detección y/o determinación cuantitativa de un analito presente en tejido.

10

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

En el estado de la técnica se ha descrito un dispositivo para la detección de toxinas en muestras de leche basado en un biosensor, en el que la superficie de un interferómetro de tipo Fabry-Perot, al ser una microplaca de vidrio con flujo capilar, ha sido recubierta con fragmentos de anticuerpos, los llamados Fab' (Chalyan T et al., *Asymmetric Mach-Zehnder Interferometer Based Biosensors for Aflatoxin M1 Detection*, *Biosensors* 2016, 6, 1; doi:10.3390/bios6010001).

20

La solicitud US 10/483.586 (publicación n.º US20040186359 A) describe un dispositivo de diagnóstico que utiliza la detección por medio de una fibra óptica recubierta; que, sin embargo, requiere implantarse en el cuerpo.

El documento *Clinical Chemistry*, 1991, Evaluation of the Fiber-Optic Antibody-Based Fluoroimmunosensor for DNA Adducts in Human Placenta Samples, T. Vo-Dinh, J. P. Alarie, R. W. Johnson, M. J. Sepaniak y R. M. Santella describe la medición de aductos de ADN mediante la detección de una señal fluorescente por una sola pieza de fibra óptica con anticuerpos colocados en un bolsillo en el extremo de la fibra. El dispositivo utiliza luz láser para excitar y detectar la señal fluorescente. La medición de aductos requiere la preparación de una muestra por su hidrólisis para lograr la sensibilidad requerida.

30

Asimismo, el dispositivo y el método de medición presentado en el documento *Biosensors and Bioelectronics* 2007, Chemiluminescent optical fiber immunosensor for detection of autoantibodies to ovarian and breast cancer-associated antigens. Orly Salama, Sebastien Herrmann, Alina Tzikovsky b, Benjamin Piura, Michael Meirovich, Ilya Trakht, Brent Reed, Leslie I. Lobel, Robert S. Las marcas requieren el uso de una etiqueta (etiqueta, marcador), por ejemplo, anticuerpos secundarios y quimioluminiscentes para la detección. El dispositivo está preparado para realizar la medición en una solución.

35

El documento *Nature Biotechnology* 2000, Antibody-based nanoprobe for measurement of and fluorescent analyte in and single cell, Tuan Vo-Dinh, Jean-Pierre Alarie, Brian M. Cullum y Guy D. Griffin describe otro dispositivo que usa una fibra óptica recubierta con anticuerpos, adecuada para usarse en una sola célula. Sin embargo, en este dispositivo la medida también se basa en la detección de una señal fluorescente, y el dispositivo comprende una sola pieza de fibra óptica conectada a un microscopio de fluorescencia.

40

En el estado de la técnica ya se han indicado algunas soluciones que permiten renunciar al uso de etiquetas durante la detección. El documento *Scientific Reports* 2014, Nanoscale Label-free Bioprobes to Detect Intracellular Proteins in Single Living Cells, Wooyoung Hong, Feng Liang, Diane Schaak, Marko Loncar y Qimin Quan describe un dispositivo que utiliza una fibra óptica recubierta de anticuerpos, que no requiere el uso de marcadores fluorescentes, y se basa en la técnica de resonancia de plasmones superficiales. El dispositivo ha sido adaptado para realizar una medición en una sola célula y comprende un trozo de fibra óptica rematado por un nanotubo de oro recubierto de anticuerpos. La adición de un analito provoca un cambio en la señal de LSPR. Asimismo, el documento *Biosensors and Bioelectronics* 2014, An enhanced LSPR fiber-optic nanoprobe for ultrasensitive detection of protein biomarkers, Mollye Sanders, Yongbin Lin, Jianjun Wei, Taylor Bono, Robert G. Lindquist describe una solución analógica, también basada en una sonda de fibra óptica y el uso de una señal de LSPR de un nanodisco de oro recubierto con anticuerpos en el extremo de la sonda. El dispositivo está adaptado para medir el analito en una solución. No se han descrito enseñanzas que permitan realizar la medición directamente en el tejido.

50

55

Las soluciones actualmente conocidas no ofrecen la posibilidad de una determinación simple y mínimamente invasiva de analitos directamente en tejidos, incluyendo tejidos sólidos, por ejemplo, pero no exclusivamente en un tumor sólido, aislado o in situ directamente en el cuerpo del paciente, sin necesidad de utilizar etiquetas y sin la preparación previa de tejidos. Las soluciones diagnósticas actuales requieren la recogida de muestras, la conservación y/o el procesamiento, por lo que no reflejan el estado real del tejido. Además, los dispositivos que utilizan el flujo de la sustancia estudiada a través del dispositivo (como en el caso de microplacas) requieren cantidades considerables de la muestra. El uso de una microsonda utilizada para una medición in situ garantiza la seguridad de uso y limita la cantidad de material necesario para la determinación.

60

65

Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado una modificación de un dispositivo que permite la detección

y/o la determinación de la concentración de sustancias presentes en los tejidos en su estado y lugar natural. El dispositivo de acuerdo con la invención permite la medición in vivo o en un tejido aislado, también en un tejido sólido, sin necesidad de su preparación. El método de medición utilizado es rápido y sensible, no requiriendo el uso de etiquetas (marcas) fluorescentes o quimioluminiscentes.

El dispositivo modificado es un sensor óptico que utiliza la interacción selectiva de la sustancia estudiada con los agentes de unión inmovilizados en la superficie de una fibra óptica que constituye un brazo de interferómetro, en el que la fibra óptica, que comprende el agente de unión inmovilizado, que constituye el brazo de interferómetro montado en el interior de la guía, preferentemente una guía de metal, que permite la punción del tejido y una medición directa de una sustancia presente en el tejido, posibilitando su detección y/o la determinación de la concentración. Debido a tal construcción del dispositivo de acuerdo con la invención, es posible utilizar un sensor basado en la fibra óptica, que permite la introducción del sensor de manera que no interrumpa la medición y no dañe el sensor, directamente en el tejido. El dispositivo de acuerdo con la invención también permite una medición in situ mediante una sonda basada en la fibra óptica de forma segura y mínimamente invasiva para el paciente. La guía también permite proteger al paciente de que quede un fragmento del sensor de fibra óptica en el tejido, por ejemplo, en el caso de una posible fractura o rotura del sensor. La fibra óptica se puede montar en la guía y así protegerla en parte o en toda su longitud, lo que permite reducir el impacto de posibles golpes (movimientos) sobre el resultado de la medición.

El sensor preparado de acuerdo con la invención y utilizado en el método de acuerdo con la invención es un interferómetro. El interferómetro en el dispositivo de acuerdo con la invención se coloca en una guía, preferiblemente de metal, con una longitud que oscila entre aproximadamente 0,5 y 30 cm de diámetro interno, por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 5 mm, diámetro exterior, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 a 7 mm y una forma, por ejemplo, similar a una aguja de biopsia. El interferómetro se conecta al extremo de entrada de la guía de cualquier manera adecuada que permita la esterilización del sensor, por ejemplo, con una cola epoxi especializada. Tal método de fijación asegura la entrada libre de la sustancia estudiada, y al mismo tiempo asegura mantener el sensor de fibra óptica a una distancia de las paredes de la guía, para que el movimiento de la guía no afecte la medición realizada y no cause una interrupción en la medición. El método de fijación proporciona una barrera contra la penetración de contaminantes y sustancias biológicas y químicas que podrían interrumpir la medición.

La combinación del interferómetro con la guía se logró de tal manera que el interferómetro se colocó centralmente dentro de la guía, de modo que el eje del núcleo del interferómetro no se desplace con respecto al eje de la guía en un valor superior a 100 μm (micrómetros). Posteriormente, el espacio entre el interferómetro y la guía se llenó con, por ejemplo, cola epoxi y fue sometida a calentamiento en un intervalo de temperatura entre 50 $^{\circ}\text{C}$ y 200 $^{\circ}\text{C}$ hasta lograr el completo fraguado de la cola. El enfriamiento del interferómetro combinado con la guía se realizó de manera controlada, es decir, la caída de temperatura no supera los 10 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$. El control de la tasa de enfriamiento del interferómetro combinado con la guía permitió obtener una pérdida en la potencia óptica/atenuación del interferómetro a un nivel por debajo de 0,02 dB.

Por lo tanto, el objeto de la invención es un dispositivo para la detección y/o la determinación de la concentración de un analito presente en el tejido, que comprende un sensor que es un interferómetro de fibra óptica, estando revestido un brazo del interferómetro con un agente de unión inmovilizado que permite la unión selectiva del analito presente en el tejido, en el que dicho brazo de interferómetro revestido con un agente de unión inmovilizado está montado dentro de una guía que permite perforar el tejido y realizar una medición in situ sin necesidad de recoger o preparar una muestra, estando la guía provista de una cara de guía cerrada, perforaciones longitudinales en las paredes laterales que permiten que el analito llegue al agente de unión, y una abertura en el extremo de la guía de entrada para introducir el interferómetro con el brazo recubierto con el agente de unión en la guía, en el extremo de entrada de la guía, estando sellada la abertura, permitiendo aislar el interior de la guía del entorno, y estando el interferómetro montado en una posición en la que el interferómetro no toque las paredes interiores de la guía.

En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el interferómetro está montado centralmente dentro de la guía, de modo que el eje del núcleo del interferómetro no se desplace con respecto al eje de la guía en un valor superior a 100 μm .

En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el interferómetro está montado en la guía mediante cola epoxi.

En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el interferómetro se monta en la guía mediante cola epoxi, habiéndose conseguido el fraguado de la cola epoxi por calentamiento, con lo que se produce el enfriamiento del interferómetro combinado con la guía que se ha realizado de forma controlada, de forma que el descenso de temperatura no supere los 10 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$.

En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, al menos un brazo de interferómetro tiene una longitud diferente al resto de brazos de interferómetro, estando esta diferencia de longitud (ΔL) comprendida en un intervalo de 5 a 100 μm .

En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, la guía tiene una longitud de un intervalo de

0,5 a 30 cm, un diámetro interno de 0,1 mm a 5 mm, un diámetro externo de, por ejemplo, 0,2 - 7 mm y una forma parecida a una aguja de biopsia. Tal forma preferida de la guía permite perforar incluso tejidos duros.

5 En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el agente de unión son anticuerpos, sus fragmentos de unión a antígeno o aficuerpos de unión a antígeno.

10 En una realización particularmente preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, los anticuerpos, sus fragmentos de unión a antígeno o aficuerpos de unión a antígeno son anticuerpos, sus fragmentos de unión a antígeno o aficuerpos de unión a antígeno para un antígeno HER2, PSA, AFP, CA19-9, CA125 o CEA, respectivamente.

15 En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el analito es un marcador tumoral u otro marcador de enfermedad, que puede usarse en el diagnóstico de enfermedades o en la monitorización del tratamiento.

20 En una realización particularmente preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el analito es un marcador tumoral HER2, PSA, AFP, CA19-9, CA125 o CEA.

25 En otra realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, el agente de unión es un ácido nucleico.

30 También es objeto de la invención un método de detección y/o determinación cuantitativa de un analito presente en un tejido, que comprende una etapa de análisis de la presencia y/o concentración de dicha sustancia mediante un interferómetro en el dispositivo de acuerdo con la invención.

35 En una realización preferida del método de acuerdo con la invención, la etapa de analizar la presencia y/o la cantidad de dicho analito está precedida por una etapa de aislamiento de la muestra de tejido y una etapa de punción de la muestra recogida utilizando el dispositivo de acuerdo con la invención.

40 El objeto de la invención es también un uso del dispositivo de acuerdo con la invención para detectar y/o determinar la cantidad de un analito presente en un tejido.

45 En una realización del uso para detectar y/o determinar la cantidad de un analito presente en un tejido de acuerdo con la invención, la detección y/o la determinación de la cantidad del analito se realiza en un tejido de muestra aislado.

50 En una realización del uso para detectar y/o determinar la cantidad de un analito presente en un tejido de acuerdo con la invención, el analito es un marcador tumoral u otro marcador de enfermedad que se puede usar en el diagnóstico de enfermedades o en la monitorización de tratamiento.

55 En una realización del uso para detectar y/o determinar la cantidad de un analito presente en un tejido de acuerdo con la invención, el analito es un marcador tumoral HER2, PSA, AFP, CA19-9, CA125 o CEA.

60 Las perforaciones longitudinales en las paredes laterales de la guía en el dispositivo de acuerdo con la invención deben tener un tamaño menor que los tamaños previstos de posibles astillas (fragmentos) en el caso de dañar y fracturar o romper un fragmento de la fibra óptica. Por lo tanto, el tamaño óptimo dependerá del material del que esté hecha la fibra óptica. La determinación del tamaño óptimo de la perforación cae dentro del alcance de las habilidades de una persona experta en la técnica.

65 En la realización preferida descrita, en la que al menos un brazo de interferómetro tiene una longitud diferente al resto de brazos de interferómetro, estando esta diferencia de longitud (ΔL) dentro de un intervalo entre 5 y 100 μm , dicho al menos un brazo de interferómetro cuyo extremo está recubierto con el agente de unión o sus fragmentos que se unen al antígeno, puede ser tanto más largo como más corto que el brazo restante (los brazos restantes) del interferómetro. La presencia de una diferencia de longitud que se encuentre dentro del intervalo mencionado anteriormente es significativa para esta realización particularmente preferida.

70 En el dispositivo para detectar un analito usando un interferómetro de fibra óptica, se logra un efecto particularmente preferido empleando un desequilibrio adecuado entre los brazos del interferómetro, que permite detectar cambios correspondientes a la unión del analito con los agentes de unión, por ejemplo, antígenos con anticuerpos con un nivel de espesor de capa tan pequeño como 10 nm.

75 En el caso de utilizar un interferómetro de fibra óptica con brazos iguales, la detección de cambios que ascienden a un espesor de capa de 10 nm es imposible. La figura 1 presenta un interferograma para el caso de un interferómetro con brazos iguales y un cambio en este interferograma al unirse con una capa de analito de 10 nm de espesor.

80 Por otro lado, introducir un desequilibrio demasiado grande (por ejemplo, $\Delta L = 1 \text{ mm}$) también es desventajoso, ya que el interferograma (figura 2) observado en la salida no permite una identificación clara del desplazamiento espectral correspondiente a la unión con una capa del analito estudiado de aproximadamente 10 nm de espesor.

85 Solo un desequilibrio adecuadamente seleccionado (ΔL) permite que el dispositivo se adapte para detectar el analito

unido, a saber, la unión de capas a escala nanométrica. Entonces es posible realizar una medición sensible y precisa del espesor de la capa unida a la fibra óptica que se encuentra dentro de un intervalo de aproximadamente 1 a 50 nm.

5 La figura 3 presenta un gráfico para un desequilibrio de $\Delta L = 20 \mu\text{m}$ y una comparación del espectro antes y después de la unión con una capa de analito de 10 nm de espesor.

10 Dicho sensor de fibra óptica preferido para la detección y/o la determinación cuantitativa de un analito para su uso en un dispositivo de acuerdo con la invención comprende una fuente de luz, un detector y un acoplador, pudiendo la fuente de luz, el detector y el acoplador estar posiblemente conectados a un circulador, dividiéndose la señal detrás del acoplador en al menos dos fibras ópticas - brazos de interferómetro, estando al menos un brazo revestido con un agente de unión capaz de unir el analito, y en el que la señal luminosa:

- 15 (i) se refleja desde las caras de los brazos del interferómetro, sobre los cuales la señal se dirige a través del acoplador y posiblemente a través del circulador hacia el detector,
o
(ii) ingresa al divisor de potencia óptica manteniendo la polaridad, y posteriormente al detector que es un analizador de espectro óptico,

20 en el que al menos uno de los brazos del interferómetro tiene una longitud diferente a los restantes brazos del interferómetro, y en el que esta diferencia de longitud (ΔL) está dentro de un intervalo entre 5 y 100 μm , por ejemplo, es 10 μm o 38,9 μm o 100 μm .

25 Un sensor de fibra óptica particularmente preferido para la detección y/o la determinación cuantitativa de un analito para su uso en el dispositivo de acuerdo con la invención comprende una fuente de luz, un detector y un acoplador, pudiendo la fuente de luz, el detector y el acoplador estar posiblemente conectados a un circulador, dividiéndose la señal detrás del acoplador en al menos dos fibras ópticas - brazos del interferómetro, y en el que la señal de luz se refleja en las caras de los brazos del interferómetro, estando al menos un brazo del interferómetro recubierto con un agente de unión capaz de unir el analito, sobre el cual se dirige la señal a través del acoplador, y posiblemente a través del circulador, hacia el detector, y en el que al menos uno de los brazos del interferómetro tiene una longitud diferente de los brazos del interferómetro restantes, y en el que esta diferencia de longitud (ΔL) está dentro de un intervalo entre 5 y 100 μm , por ejemplo, es 10 μm o 38,9 μm o 100 μm .

35 El método para detectar un analito en la muestra, utilizando un sensor de fibra óptica provisto de una fuente de luz, un acoplador y un detector, así como brazos de interferómetro, al menos uno de los cuales está recubierto con un agente de unión que es capaz de unir el analito, puede comprender, por ejemplo, etapas de:

- 40 a) emitir una señal de luz desde la fuente de luz;
b) detectar las ondas de luz reflejadas desde las caras de los brazos del interferómetro o propagarse a través de los brazos del interferómetro;
c) detectar un primer patrón de interferencia para las ondas de luz reflejadas o propagadas;
d) poner en contacto la muestra con al menos un brazo de interferómetro recubierto con el agente de unión;
e) emitir una señal de luz desde la fuente de luz;
45 f) detectar las ondas de luz reflejadas desde las caras de los brazos del interferómetro o propagarse a través de los brazos del interferómetro;
g) detectar un segundo patrón de interferencia para ondas de luz reflejadas o propagadas;
h) registrar la presencia del analito en la muestra estudiada en el caso de detectar un desplazamiento espectral entre el primer y segundo patrones de interferencia.

50 Adicionalmente, puede estar presente la siguiente etapa:

- i) determinar la cantidad del analito en la muestra basándose en el tamaño del cambio entre el primer y segundo patrones de interferencia. En una realización preferida del dispositivo de acuerdo con la invención, la guía es de metal.

55 Los agentes de unión utilizados en el dispositivo de acuerdo con la invención pueden ser proteínas, preferentemente anticuerpos o sus análogos. Los anticuerpos utilizados en el método de acuerdo con la invención pueden ser cualquier anticuerpo que permita la detección de un antígeno. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, inmunoglobulinas G, por ejemplo, IgG de suero de conejo. Estos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, humanos, animales, quiméricos, humanizados, biespecíficos o pertenecientes a cualquier otro grupo de anticuerpos conocidos por el experto en la materia. En el método de acuerdo con la invención, también se puede usar un fragmento del anticuerpo que se une al antígeno, que es cualquiera de sus fragmentos que mantiene la capacidad de unirse al antígeno. Dichos fragmentos son conocidos por un experto en la materia y comprenden, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ o scFv y otros.

65 El análogo usado de un anticuerpo también puede ser un aficuerpo. Dentro del significado de la presente descripción, el término "aficuerpo" significa una proteína recombinada compuesta por una cadena polipeptídica, que comprende

un dominio responsable de la interacción selectiva con un antígeno, por ejemplo, un marcador tumoral HER2, que se puede unir con otra proteína asegurando mejores propiedades para unirse con el antígeno, mayor estabilidad y funciones adicionales, por ejemplo, la posibilidad de unirse de forma controlada con otra sustancia o una superficie sólida. Su masa suele estar dentro de un intervalo entre varios y más de una docena de kilodaltons.

5 Los anticuerpos se usan comúnmente en el diagnóstico de tumores, por ejemplo, en el método inmunohistoquímico para teñir secciones de tejido, y los anticuerpos son análogos de los anticuerpos, conservan las propiedades de unión con antígenos específicos, pero tienen tamaños considerables, por ejemplo, 10 veces más pequeño. Debido a esto, son más resistentes a factores físicos y biológicos, por ejemplo, temperatura, condiciones estrictas de unión con la fibra óptica (reactivos químicos) y degradación por enzimas proteolíticas durante la penetración del tejido. Estas propiedades hacen que el revestimiento de la fibra óptica, recubierto de partículas tal como los anticuerpos, sea más estable con respecto a la actividad de unión al antígeno específico, por ejemplo, marcadores tumorales. Además, preferiblemente es posible una inmovilización dirigida de sustancias en la superficie de la fibra óptica debido a un resto de cisteína introducido al final del anticuerpo. Esto asegura una mayor actividad y mantiene la especificidad del marcador medido en el tejido.

En otra realización, el agente de unión pueden ser ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN.

20 Los agentes de unión se pueden inmovilizar de diversas maneras conocidas en la técnica. Preferiblemente, los agentes de unión se unen covalentemente con la superficie de la fibra óptica.

Los analitos determinados en el tejido pueden ser diversas sustancias cuya concentración es deseable detectar y/o determinar. En una realización preferida, las sustancias determinadas en el tejido pueden ser marcadores tumorales, por ejemplo, HER2, PSA, AFP, CA19-9, CA125, CEA u otros marcadores conocidos en la técnica que pueden usarse en el diagnóstico de enfermedades o en la monitorización del tratamiento.

25 El dispositivo de acuerdo con la invención se puede utilizar para realizar mediciones ex vivo o in situ en un individuo. El individuo puede ser un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

30 El recubrimiento con anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno se puede realizar de varias maneras. Un proceso ejemplar, que no limita el alcance de la invención, de recubrir una pieza de fibra óptica con anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno puede llevarse a cabo de acuerdo con el método que se presenta a continuación.

35 Se sumerge el extremo revestido de la fibra óptica en una solución alcalina y posteriormente se aclara en agua desmineralizada y se seca. Luego se mantiene durante 10-30 minutos a alta temperatura en una solución ácida de silano. Posteriormente, la punta (extremo) de la fibra óptica se enjuaga, se seca y posteriormente se sumerge en una solución del agente de acoplamiento, luego se enjuaga nuevamente y se incuba con una solución que comprende anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno. La fibra óptica así preparada se almacena refrigerada.

40 En una realización más particular, no limitativa, se sumerge el extremo revestido de la fibra óptica en una solución de NaOH con una concentración entre 1 M y 1,3 M durante un tiempo de 5 minutos a 10 minutos, y posteriormente se enjuaga con agua purificada y se seca al aire durante aproximadamente 15 minutos.

45 Luego se mantiene durante aproximadamente 3 horas a una temperatura de aproximadamente 90 °C en una solución al 10 % de (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (GOPS) con agua (fracción volumétrica) con pH = 2 a pH = 2,5, ajustado por medio de, por ejemplo, una solución 1 M de HCl. Posteriormente, la punta de la fibra óptica se enjuaga en etanol, después de lo cual se seca durante 10 h a 13 h a una temperatura de aproximadamente 105 °C en vacío o en una atmósfera de argón. Posteriormente, se sumerge en una solución de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) en acetonitrilo (ACN) de 100 mg/ml durante aproximadamente 20 minutos, luego se enjuaga con acetonitrilo y una solución de tampón fosfato (PBS) y se incuba en una solución de 1,2 mg/ml de PBS que comprende anticuerpos, por ejemplo, inmunoglobulinas G de suero de conejo durante 4 días a una temperatura de aproximadamente 4 °C o durante 1-2 días a temperatura ambiente, después de lo cual se almacena en una solución de PBS durante 12 h a una temperatura de 4 °C. La fibra óptica así preparada se asegura adecuadamente y se almacena a una temperatura de 4 °C con su punta sumergida en una solución de PBS.

55 Las ventajas de dicho método de recubrimiento son: el mantenimiento de la actividad de los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno a un nivel superior al 95 %, un gran número de anticuerpos unidos o sus fragmentos de unión a antígeno, costes de material relativamente bajos y la posibilidad de escalar la producción.

60 El proceso de recubrir una pieza de fibra óptica con anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno también se puede realizar usando métodos alternativos. Por ejemplo, después de desengrasar, la fibra óptica se sumerge en agua destilada y se hierve. Al retirarla del agua, se coloca en una solución de silano. Posteriormente, la fibra óptica se enjuaga en un solvente y posteriormente se sumerge en una solución del agente de acoplamiento. Al enjuagar, la fibra óptica se coloca en una solución de anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno.

65 En una realización más particular, no limitativa, la fibra óptica se desengrasa primero mediante alcohol isopropílico

para eliminar los contaminantes. Posteriormente, la fibra óptica se sumerge en agua destilada y se hierve durante aproximadamente 10-20 minutos. Tras retirarla del agua, la fibra óptica se coloca en una solución al 1-3 % de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTS) en tolueno. Después de 20-45 minutos, se retira la fibra óptica y se enjuaga en tolueno, y posteriormente se sumerge en una solución de N-succinimidil 4-maleimido-butilato (GMBS) con una concentración de 4-8 mg/10 ml de etanol con una concentración del 96 %. La fibra óptica se mantiene en esta solución durante 60-90 minutos. Posteriormente se enjuaga una vez en etanol y tres veces en agua destilada. Posteriormente, la fibra óptica se coloca en una solución de anticuerpos con una concentración de 0,2-1 mg/ml en una solución de tampón de fosfato. La fibra óptica recubierta se retira de la solución después de 12 a 18 horas y se enjuaga con agua destilada.

Por lo tanto, la invención proporciona la posibilidad de medir partículas biológicamente importantes de manera directa, sin el uso de etiquetas, inmediata (en tiempo real), sin necesidad de preparar el tejido y mínimamente invasiva debido a el tamaño del sensor utilizado (preferiblemente aproximadamente 0,1 - 50 micrómetros de diámetro). Debido a la unión covalente de anticuerpos o sus derivados (aficuerpos), se minimiza su liberación en el cuerpo, lo que aumenta el potencial clínico de dicho dispositivo.

El dispositivo de acuerdo con la invención comprende un sensor de fibra óptica, siendo un interferómetro especialmente preparado, una fuente de luz y un detector. El sensor se prepara mediante la inmovilización del agente de unión sobre la superficie de una pieza de fibra óptica, por ejemplo, en una realización preferida, una sustancia proteica capaz de interactuar específicamente con un marcador tumoral. La cantidad de la sustancia determinada unida al interferómetro (por ejemplo, en una realización preferida, un marcador tumoral) se mide como un desplazamiento espectral.

La magnitud del desplazamiento espectral se determina por medio de una sustancia estándar con una concentración conocida y el valor dado del desplazamiento se atribuye a una cantidad específica del marcador.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 presenta un interferograma para el caso de un interferómetro conocido en el estado de la técnica con brazos iguales y un cambio en este interferograma al unirse con una capa de antígeno de 10 nm de espesor.

La figura 2 presenta un interferograma para el caso de un interferómetro con un desequilibrio de brazos $\Delta L = 1$ mm y un cambio en este interferograma al unirse con una capa de antígeno de 10 nm de espesor.

La figura 3 presenta un interferograma para un desequilibrio de $\Delta L = 20$ μ m y una comparación del espectro antes y después de la unión con una capa de antígeno de 10 nm de espesor.

La figura 4 presenta una realización de un sensor de fibra óptica para detectar el analito.

La figura 5 presenta una distribución espectral observada en el detector para el sensor de la figura 4.

La figura 6 presenta una realización preferida alternativa del sensor de fibra óptica para detectar el analito.

La figura 7 presenta una distribución espectral observada en el detector para el sensor de la figura 6.

La figura 8 presenta una realización preferida alternativa del sensor de fibra óptica para detectar el analito.

La figura 9 presenta una distribución espectral observada en el detector para el sensor de la figura 8.

La figura 10 presenta un esquema constructivo del dispositivo según una realización de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Un sensor para detectar un analito.

Ejemplo 1A.

En una realización preferida presentada en la figura 4, un sensor para detectar un analito comprende una fuente de luz 1, un detector 2 y un acoplador 4 conectado a un circulador 3. La fuente de luz 1, en este caso particular, es un diodo superluminiscente SLED 1550 nm Exalos número EXS210048-02, y el detector 2, en este caso particular, es un analizador de espectro óptico OSA ANDO AQ-6315B. Se utilizó una fibra óptica Corning SMF-28e y un acoplador FBT 50:50 producido por Fibrain.

La señal de la fuente de luz 1 se entrega al circulador 3, desde el cual se entrega posteriormente al acoplador 4 mediante piezas de fibra óptica monomodo. La señal detrás del acoplador 4 se divide en dos fibras ópticas - brazos de interferómetro. La señal se refleja desde las caras de la fibra óptica, estando uno de los brazos 5 recubierto de anticuerpos. La señal regresa a través del acoplador 4 al circulador 3, desde donde se conduce al detector 2.

El brazo del interferómetro cuyo extremo no está revestido es más largo en $\Delta L = 38,9$ μ m.

Uno de los brazos del interferómetro está recubierto de anticuerpos, que en este caso particular es inmunoglobulina G (IgG) de suero de conejo. Estos anticuerpos permiten la detección de un antígeno, que en este caso particular es la inmunoglobulina anti-conejo (obtenida como resultado de colocar IgG de conejo en plasma sanguíneo de cabra y separar el antígeno) marcado con un marcador luminiscente FITC (Anti-IgG-FITC). Las franjas de interferencia en el dominio de la longitud de onda, cuyo cambio indica la unión de antígenos con anticuerpos, son visibles en el detector.

El proceso de recubrir una pieza de fibra óptica con anticuerpos se llevó a cabo según el método que se presenta a continuación. El extremo revestido de la fibra óptica se sumergió en una solución de NaOH con una concentración superior a 1 M durante 10 minutos, y posteriormente se enjuagó en agua purificada y se secó al aire durante 15 minutos. Luego se mantuvo durante 3 horas a una temperatura de 90 °C en una solución al 10 % de (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (GOPS) con agua (fracción volumétrica) con pH = 2, establecida mediante una solución 1 M de HCl. Posteriormente, la punta de la fibra óptica se enjuagó en etanol, después de lo cual se secó durante 13 h a una temperatura de 105 °C en vacío o en atmósfera de argón. Posteriormente, se sumergió en una solución de 1,1' - carbonildiimidazol (CDI) en acetonitrilo (ACN) de 100 mg/ml durante 20 minutos, luego se enjuagó en acetonitrilo y una solución de tampón de fosfato (PBS) y se incubó en una solución de 1,2 mg/ml de PBS que comprende los anticuerpos de inmunoglobulina G de suero de conejo durante 4 días a una temperatura de 4 °C, tras lo cual se almacenó en una solución de PBS durante 12 h a una temperatura de 4 °C.

Para realizar la medición, el dispositivo se pone en contacto con la muestra, de modo que el analito presente en la muestra pueda unirse con el agente de unión.

La figura 5 presenta la distribución espectral observada en el detector. La unión de antígenos provocó un desplazamiento espectral de 0,6 nm. Para determinar la cantidad del analito, se preparan soluciones estándar con concentraciones conocidas del analito y se establece una curva de calibración para la dependencia del cambio en el desplazamiento espectral de la cantidad del analito. La concentración del analito en la muestra se determina mediante una curva de calibración así establecida.

Cálculo del espesor óptico de capas unidas en un sistema de interferómetro:

Lista de referencias:

λ_1 - La longitud de onda a la que se produce un mínimo espectral antes de un aumento del espesor de las capas

λ_2 - La longitud de onda a la que se produce un mínimo espectral tras un aumento del espesor de las capas

ϕ - Fase de luz para la longitud de onda dada al pasar por el sistema óptico

L_p - Longitud inicial del desequilibrio del interferómetro

n_p - El índice de refracción del material que asegura el desequilibrio inicial del interferómetro.

ΔL - cambio en la longitud del material en la cara del interferómetro

n_Δ - El índice de refracción del material que es el material creciente

Se considera que el mínimo antes del crecimiento (aumento) de las capas es la fase de luz inicial ϕ_1 . Después del crecimiento del espesor óptico de la capa, la misma condición de fase ϕ_2 se cumplirá para otra longitud de onda. Tal condición se puede escribir como:

$$\varphi_1 = \frac{2\pi(L_p n_p)}{\lambda_1}$$

$$\varphi_2 = \frac{2\pi(L_p n_p + \Delta L(n_\Delta - 1))}{\lambda_2}$$

Suponiendo

$$\varphi_1 = \varphi_2$$

Obtenemos

$$\frac{2\pi(L_p n_p)}{\lambda_1} = \frac{2\pi(L_p n_p + \Delta L(n_\Delta - 1))}{\lambda_2}$$

Debido a esto, se puede alcanzar la siguiente dependencia después de las transformaciones:

$$|\Delta L| = \frac{L_p n_p \left(\frac{\lambda_2}{\lambda_1} - 1 \right)}{n_\Delta - 1}$$

Esta dependencia describe el cambio en la longitud física de la capa que se unió en el sistema. También se pueden encontrar explicaciones más detalladas sobre el método de cálculo en Hariharan, P. (2007). Basics of Interferometry. Elsevier inc.

Ejemplo 1B.

En una realización preferida alternativa presentada en la figura 6, el sensor para detectar el analito comprende una fuente de luz 1, un detector 2 y un acoplador 4. La fuente de luz 1 en este caso particular es una fuente de tipo supercontinuo SLED 1540 nm Yenista OSICS SLD 1550, y el detector 2 en este caso particular es un espectrómetro OSA Yokogawa AQ6370D. Se utilizó una fibra óptica de fibra de un solo modo estándar (SSMF) cumpliendo con los lineamientos de ITU-T, G.652 de la empresa Draka y un acoplador 10202A-50 de la empresa Thorlabs.

La señal desde la fuente de luz 1 se envía al acoplador 4 a través de fibras ópticas. La señal detrás del acoplador 4 se divide en dos fibras ópticas - brazos de interferómetro. La señal se refleja desde las caras de la fibra óptica, estando uno de los brazos 5 recubierto de anticuerpos. La señal regresa a través del acoplador 4 al detector 2.

El brazo del interferómetro cuyo extremo está revestido es más largo en $\Delta L = 10 \mu\text{m}$.

Uno de los brazos del interferómetro está recubierto de anticuerpos, que en este caso particular es inmunoglobulina G (IgG) de suero de conejo. Estos anticuerpos permiten la detección de un antígeno, que en este caso particular es la inmunoglobulina anti-conejo (obtenida como resultado de colocar IgG de conejo en plasma sanguíneo de cabra y separar el antígeno) marcado con un marcador luminiscente FITC (Anti-IgG-FITC). Las franjas de interferencia en el dominio de la longitud de onda, cuyo cambio indica la unión de antígenos con anticuerpos, son visibles en el detector.

El proceso de cubrir uno de los brazos del interferómetro con anticuerpos consistía de varios etapas. La fibra óptica se desengrasó primero con alcohol isopropílico para eliminar los contaminantes. Posteriormente, la fibra óptica se sumergió en agua destilada y se hirvió durante 15 minutos. Tras retirarla del agua, la fibra óptica se colocó en una solución al 2 % de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTS) en tolueno. Después de 30 minutos se retiró la fibra óptica y se enjuagó en tolueno, y posteriormente se sumergió en una solución de N-succinimidil 4-maleimido-butilato (GMBS, n.º CAS 8-307-12-6) con una concentración de 6 mg/10 ml de etanol con una concentración del 96 %. La fibra óptica se mantuvo en esta solución durante 60 minutos. Posteriormente se enjuagó una vez en etanol y tres veces en agua destilada. Posteriormente, la fibra óptica se colocó en una solución de anticuerpos con una concentración de 1 mg/ml en una solución de tampón de fosfato. La fibra óptica revestida se retiró de la solución después de 12 horas y se enjuagó con agua destilada.

La figura 7 presenta la distribución espectral observada en el detector. La unión de antígenos provocó un desplazamiento espectral de 0,5 nm. Para determinar la cantidad del analito, se preparan soluciones estándar con concentraciones conocidas del analito y se establece una curva de calibración para la dependencia del cambio en el desplazamiento espectral de la cantidad del analito. La concentración del analito en la muestra se determina mediante la curva de calibración así establecida. El método para calcular el espesor de la capa del analito unido es como el del Ejemplo 1A.

Ejemplo 1C

En una realización preferida presentada en la figura 8, el dispositivo para la detección del analito comprende un diodo superluminiscente 1 (S5FC1018S - SM Benchtop SLD Source) que emite una luz polarizada con una longitud de onda espectral central de 1310 nm y un semiancho espectral de 50 nm, conectado a una fibra óptica monomodo tipo PANDA a una longitud de onda de 1260 nm o más manteniendo la polaridad (PM1300-XP de la empresa Thorlabs), un divisor de potencia óptica tipo PLC 6 con una división de potencia óptica de 50 %:50 % para una longitud de onda de 1310 nm, dos monomodo tipo PANDA a una longitud de onda de 1260 nm y más fibras ópticas manteniendo la polaridad con longitudes de $L_1 = 50 \text{ mm}$, $L_2 = 50 \text{ mm}$, una de las cuales comprende en el medio de su longitud una rotura 9, un divisor de potencia óptica 7 que mantiene la polaridad y un analizador de espectro óptico 8. Se utilizó un acoplador PMC1310-50B-FC de la empresa Thorlabs.

La señal desde la fuente de luz 1 se entrega al divisor 6. La señal detrás del divisor 6 se divide en dos fibras ópticas - brazos de interferómetro. La señal se propaga a través de los brazos del interferómetro, cuyas diferentes longitudes aseguran el desequilibrio inicial del interferómetro. Una de las fibras ópticas comprende una rotura 9 en la mitad de su longitud, y los extremos a ambos lados de la rotura 9 están situados a una distancia de 0,1 mm entre sí. A través del

acoplador 7, la señal ingresa al analizador de espectro óptico 8.

Se recubre una de las puntas de la fibra óptica cortada con anticuerpos como en el Ejemplo 1A, que en este caso particular es inmunoglobulina G (IgG) de suero de conejo. Estos anticuerpos permiten la detección de un antígeno, que en este caso particular es la inmunoglobulina anti-conejo (obtenida como resultado de colocar IgG de conejo en plasma sanguíneo de cabra y separar el antígeno) marcado con un marcador luminiscente FITC (Anti-IgG-FITC). El extremo revestido de la fibra óptica se ha movido de nuevo a la segunda punta a la misma distancia que antes.

La medida se realiza poniendo en contacto el extremo revestido de la fibra óptica con la muestra estudiada, de forma que el analito pueda unirse al agente de unión.

Las franjas de interferencia en el dominio de la longitud de onda, cuyo desplazamiento de 0,5 nm indica la unión de una capa de antígeno con un espesor de 115 nm con anticuerpos, son visibles en el detector (figura 9). Para determinar la cantidad del analito, se preparan soluciones estándar con concentraciones conocidas del analito y se establece una curva de calibración para la dependencia del cambio en el desplazamiento espectral de la cantidad del analito. La concentración del analito en la muestra se determina mediante la curva de calibración así establecida. El método para calcular el espesor de la capa del analito unido es como el del Ejemplo 1A.

Ejemplo 1D. Recubrimiento con anticuerpos

En una realización preferida presentada en la figura 4, el dispositivo para detectar el analito comprende una fuente de luz 1, un detector 2 y un acoplador 4 conectado a un circulador 3. La fuente de luz 1 en este caso particular, es un diodo superluminiscente SLED 1550 nm Exalos número EXS210048-02, y el detector 2 en este caso particular, es un analizador de espectro óptico OSA ANDO AQ-6315B. Se utilizó una fibra óptica Corning SMF-28e y un acoplador FBT 50:50 producido por Fibrain.

La señal de la fuente de luz 1 se entrega al circulador 3, desde el cual se entrega posteriormente al acoplador 4 mediante piezas de fibra óptica monomodo. La señal detrás del acoplador 4 se divide en dos fibras ópticas - brazos de interferómetro. La señal se refleja desde las caras de la fibra óptica, estando uno de los brazos 5 recubierto de anticuerpos. La señal regresa a través del acoplador 4 al circulador 3, desde donde se conduce al detector 2.

El brazo del interferómetro cuyo extremo no está revestido es más largo en $\Delta L = 38,9 \mu\text{m}$.

En el caso de los anticuerpos, se aplica la inmovilización mediante grupos tiol utilizando los reactivos disponibles (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Para ello se sumerge el extremo del interferómetro en ácido sulfúrico 1 M durante 1 h y posteriormente se enjuaga con agua destilada y se sumerge durante 15 minutos en etanol y otros 15 minutos en acetona. El extremo limpio de la fibra óptica se sumerge posteriormente en acetona anhidra que comprende un 2 % de APTES (3-aminopropiltrióxido de silano) durante 0,5 a 5 minutos. Al final de la reacción, la fibra óptica se enjuaga en acetona anhidra y se seca al aire durante 15 a 30 minutos. Posteriormente, la fibra óptica se incuba en un tampón de reticulación (50 mM de fosfato de sodio, 0,15 M de NaCl, 10 mM de EDTA, pH 7,2) que comprende 2 mg/ml de Sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-(N -maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de enjuagar en el tampón de reticulación y secar al aire durante 30 minutos, la fibra óptica se almacena a 4 °C en un desecador hasta el momento de la incubación con el anticuerpo.

Para reducir los grupos tiol terminales, a una solución de anticuerpo con una concentración de 1 mg/ml en un tampón reductor (50 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, pH 7,5), se añade DTT (ditiotreitól) para obtener la concentración final de 20 mM con una incubación posterior durante 1-2 horas a temperatura ambiente o durante 45 min a 37 °C. El excedente de DTT debe eliminarse mediante filtración en columna, por ejemplo, con Sephadex G-25, equilibrado con el tampón de reticulación. El eluyente recogido que comprende el anticuerpo con un grupo tiol reducido debe usarse inmediatamente para modificar la fibra óptica previamente preparada. Para ello, se incuba el extremo de la fibra óptica en una solución de anticuerpo durante 2-4 h a temperatura ambiente y posteriormente se enjuaga mediante el tampón de reticulación y se almacena en una solución de suero fisiológico (PBS) en 4 °C

Ejemplo 2. El dispositivo para realizar mediciones directamente en el tejido.

El interferómetro 10 según el Ejemplo 1A o 1B o 1C o 1D se coloca en una guía metálica 30 de longitud comprendida entre 0,5 y 30 cm, diámetro interior de 0,1 mm a 5 mm, diámetro exterior de 0,2 a 7 mm y una forma parecida a una aguja de biopsia. El interferómetro 10 se introduce a través de la abertura 32 en el extremo de entrada 34 de la guía y se une al extremo de entrada 34 de la guía 30 con cola epoxi especializada, por ejemplo, MULTIBOND-1101 de la empresa MULTIBOND, para que la superficie del interferómetro no toque las paredes de la guía (como en la figura 10). La unión del interferómetro con la guía se logró de tal manera que el interferómetro se colocó centralmente dentro de la guía, de modo que el eje del núcleo del interferómetro no se desplace con respecto al eje de la guía en un valor superior a 100 μm (micrómetros). Posteriormente, el espacio entre el interferómetro y la guía se llenó con cola epoxi y fue sometida a calentamiento en un intervalo de temperatura entre 50 °C y 200 °C hasta lograr el completo fraguado de la cola. El enfriamiento del interferómetro combinado con la guía se realizó de manera controlada, es decir, la caída

ES 2 935 205 T3

de temperatura no fue superior a 10 °C/s. El control de la tasa de enfriamiento del interferómetro combinado con la guía permitió obtener una pérdida en la potencia óptica/atenuación del interferómetro a un nivel por debajo de 0,02 dB.

5 Se han realizado pruebas que presentan el impacto del sellado en la atenuación/pérdida. El equipo de medición utilizado:

Un conjunto para la medición y la monitorización de los cambios en la pérdida de inserción (atenuación de inserción):

10 Las mediciones utilizaron un dispositivo de la empresa EXFO-IQ203 integrado en forma de panel, provisto de:

□ una fuente láser (IQ2123 ORL) con dos longitudes de onda: 1310 nm +20/-25 nm y 1550 nm +10/-40 nm, con un ancho espectral de 45/65 nm (1310/1550 nm), con una estabilidad de temperatura de 0,03 dB (t=8 h T=0...50°C,

15 y

□ un detector InGaAs (IQ1103) intervalo de medición 800-1700 nm, precisión relativa de la medición de potencia 0,015 dB,

20

Los resultados de las pruebas realizadas se presentan en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1.

Los resultados de los estudios de cambios en la pérdida de inserción_Δ IL en conexiones herméticas realizadas después de la prueba				
Muestra n.º	P _{entrada} [μW] [antes del sellado]	P _{salida} [μW] [después del sellado]	A IL [dB]	Resultados de la prueba (El cambio en la atenuación después de la prueba no debe exceder los 0,2 dB para los criterios de Telcordia GR1221) P-positivo N-negativo
1	5,373	5,342	0,00	P
2	6,338	6,338	0,00	P
3	6,695	6,679	0,01	P
4	6,203	6,177	0,02	P
5	6,811	6,790	0,01	P
6	6,510	6,513	0,00	P
7	6,708	6,709	0,00	P
8	6,614	6,613	0,00	P
9	6,844	6,834	0,01	P
10	6,371	6,359	0,01	P
11	5,831	5,827	0,00	P
12	5,750	5,755	0,00	P
13	6,227	6,231	0,00	P
14	6,285	6,275	0,01	P
15	6,502	6,488	0,01	P
16	5,968	5,945	0,02	P
17	6,281	6,285	0,00	P
18	6,330	6,324	0,00	P
19	6,480	6,451	0,02	P
20	6,524	6,520	0,00	P
21	6,174	6,173	0,00	P
promedio			0,01	

5 El interferómetro unido al extremo de entrada de la guía asegura la capacidad de esterilizar el sensor y asegura el libre flujo de la sustancia analizada, y al mismo tiempo asegura mantener el sensor de fibra óptica a una distancia de las paredes de la guía, de modo que el movimiento de la guía no afecte la medición realizada. Tal método de unión proporciona una barrera contra la penetración de contaminantes y sustancias biológicas y químicas que podrían interrumpir la medición.

10 La guía 30 tiene una cara de guía cerrada 31 y perforaciones longitudinales 33 en las paredes laterales, lo que permite que el analito llegue al interferómetro 10. La abertura 32 en el extremo de entrada de la guía, que constituye una entrada para la pieza de fibra óptica, del interferómetro 10 en la guía 30 está sellada, lo que permite un aislamiento hermético del interior de la guía 30 del entorno.

El dispositivo en esta realización también comprende, además de la fuente de luz 1 y el detector 2, un monitor 21 y una impresora 22.

15 Ejemplo 3. Medición de la concentración del marcador tumoral HER2

Ejemplo 3A. Medición con anticuerpos

20 Para la medición del marcador tumoral HER2, se prepara una pieza de fibra óptica inmovilizando los anticuerpos que se unen selectivamente al marcador tumoral HER2 (anticuerpos monoclonales anti-HER2, R&D Systems, Minneapolis, MN), como se describe en el Ejemplo 1, siendo la diferencia que el agente de unión es inmunoglobulina que se une selectivamente al marcador tumoral HER2 (anticuerpos monoclonales anti-HER2, R&D Systems, Minneapolis, MN).

25 La medición de la concentración del marcador tumoral se realiza introduciendo durante 5 segundos - 15 minutos la sonda óptica descrita en el Ejemplo 1A o 1B o 1C, colocada dentro de una guía de metal, como se describe en el Ejemplo 2, en el tejido mediante punción directa con la misma en el tejido tumoral en el cuerpo del paciente (similar a una biopsia diagnóstica realizada con una aguja de biopsia) o directamente después de extirpar el tumor o sumergiéndolo en un homogeneizado de tejido obtenido por dispersión mecánica del mismo. La concentración del marcador presente en el tejido corresponde a la cantidad de marcadores unidos a la superficie del interferómetro, y el valor de la concentración se determina en base al desplazamiento espectral.

30 Ejemplo 3B. Medición con anticuerpos

35 El método para hacer una sonda óptica es diferente al del Ejemplo 3A en que, en lugar de los anticuerpos, los anticuerpos se inmovilizan usando grupos tiol, como se describe en el Ejemplo 1D. El sensor se coloca en la guía como se describe en el Ejemplo 2. La medición de un marcador tumoral, por ejemplo, HER2, se realiza de manera similar al Ejemplo 3A.

LISTA DE REFERENCIAS

- 1 - fuente de luz
- 2 - detector
- 3 - circulador
- 4 - acoplador
- 5 - brazo de interferómetro recubierto con un agente de unión
- 6 - divisor de potencia óptica
- 7 - divisor de potencia óptica manteniendo la polaridad
- 8 - analizador de espectro óptico
- 9 - rotura en el curso de la fibra óptica
- 10 - interferómetro
- 21 - monitor
- 22 - impresora
- 30 - guía
- 31 - cara de guía
- 32 - abertura en el extremo de entrada de la guía
- 33 - perforaciones
- 34 - extremo de entrada de la guía

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para detectar y/o determinar *ex vivo* o *in situ* la concentración de un analito presente en un tejido, que comprende un sensor que es un interferómetro de fibra óptica, estando revestido un brazo de interferómetro con un agente de unión inmovilizado para la unión selectiva del analito presente en el tejido, caracterizado por que dicho brazo (5) del interferómetro recubierto con el agente de unión inmovilizado está montado dentro de una guía (30) que permite perforar el tejido y realizar la medición del analito en el tejido, estando la guía (30) provista de una cara de guía cerrada (31), permitiendo una pluralidad de perforaciones longitudinales (33) en las paredes laterales que el analito llegue al agente de unión y una abertura (32) en el extremo de entrada (34) de la guía para introducir el interferómetro (10) con el brazo (5) revestido con el agente de unión en la guía (30) en el extremo de entrada (34) de la guía, estando la abertura (32) sellada y estando el interferómetro (10) unido únicamente al extremo de entrada (34) y montado en una posición en que el interferómetro (10) no toca las paredes interiores de la guía, en el que el interferómetro (10) está montado de manera centrada dentro de la guía (30), de modo que el eje del núcleo del interferómetro no se desplaza con respecto al eje de la guía en un valor superior a 100 μm .
2. El dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado por que el interferómetro (10) está montado en la guía (30) mediante cola epoxi.
3. El dispositivo según la reivindicación 2, caracterizado por que el fraguado de la cola epoxi se logró por calentamiento, con lo cual se realizó de manera controlada el enfriamiento del interferómetro (10) combinado con la guía (30), de manera que la caída de temperatura no superaría los 10 $^{\circ}\text{C/s}$.
4. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la guía (30) está hecha de metal.
5. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la guía (30) tiene una longitud en un intervalo de 0,5 a 30 cm, un diámetro interno de 0,1 mm a 5 mm, un diámetro externo de 0,2 a 7 mm y una forma que se asemeja a una aguja de biopsia.
6. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el agente de unión son anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno o aficuerpos de unión a antígeno.
7. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el agente de unión es un ácido nucleico, preferiblemente ADN.
8. Un método de detección y/o determinación cuantitativa *in situ* o *ex vivo* de un analito presente en un tejido por el interferómetro en el dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - a. emitir una señal de luz desde la fuente de luz;
 - b. detectar las ondas de luz reflejadas desde las caras de los brazos del interferómetro o propagarse a través de los brazos del interferómetro;
 - c. detectar un primer patrón de interferencia para las ondas de luz reflejadas o propagadas;
 - d. poner en contacto el tejido con al menos un brazo de interferómetro revestido con el agente de unión;
 - e. emitir una señal de luz desde la fuente de luz;
 - f. detectar las ondas de luz reflejadas desde las caras de los brazos del interferómetro o propagarse a través de los brazos del interferómetro;
 - g. detectar un segundo patrón de interferencia para ondas de luz reflejadas o propagadas;
 - h. registrar la presencia o la presencia y determinación cuantitativa del analito en el tejido analizado, en el que la presencia de analito se basa en la detección de un cambio espectral entre el primer y el segundo patrón de interferencia;
 y en el que la determinación cuantitativa del analito se basa en el tamaño del cambio entre el primer y segundo patrones de interferencia.

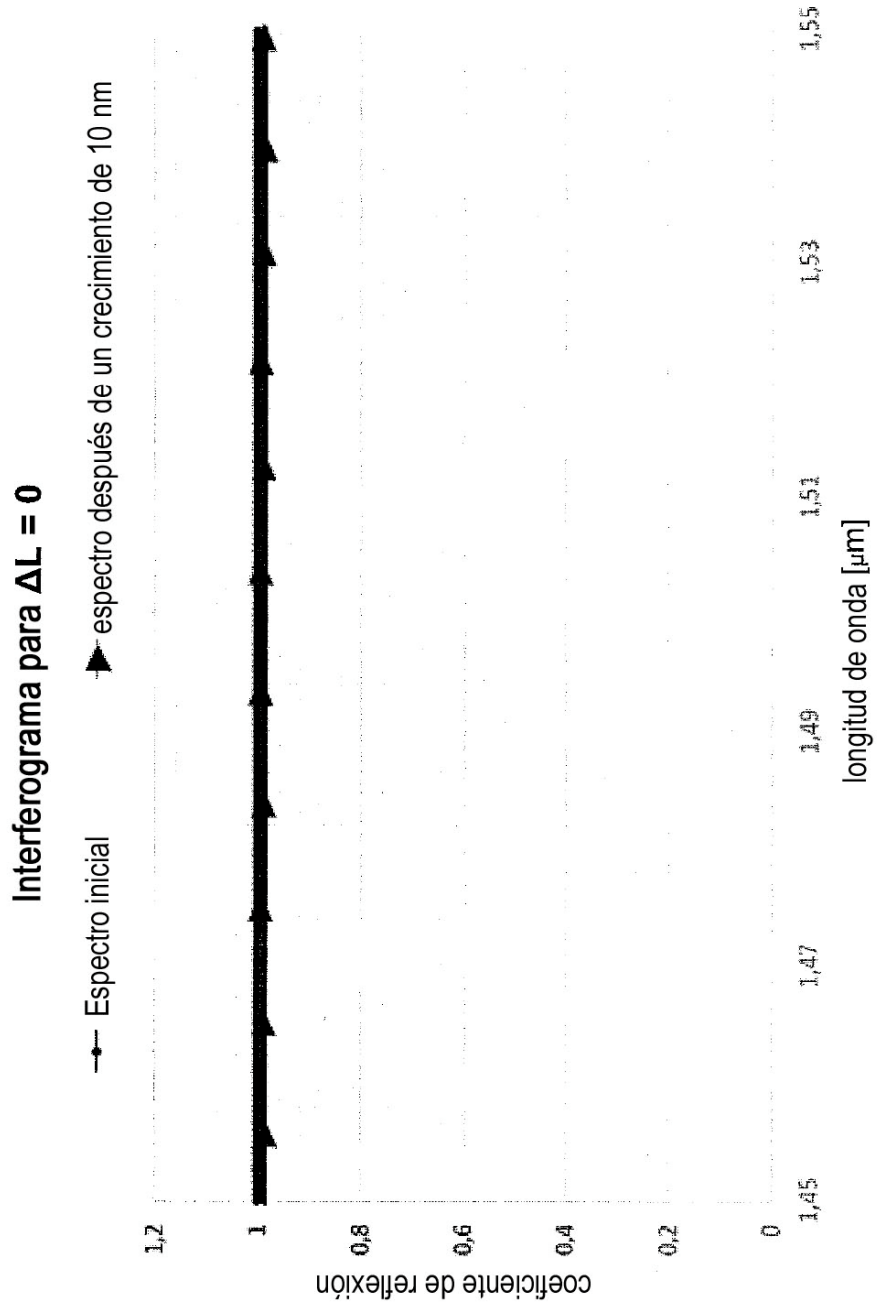


Fig. 1 (estado de la técnica)

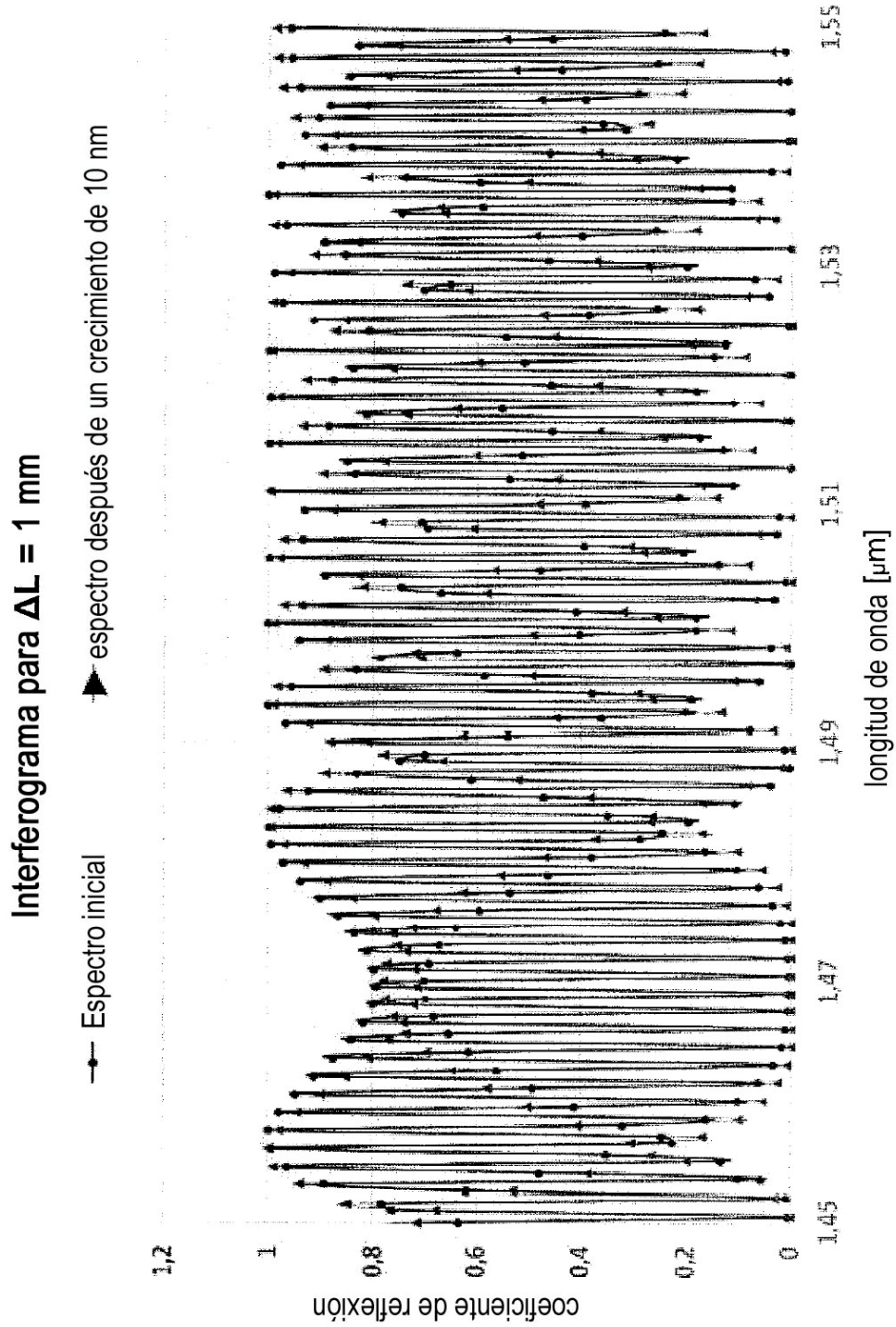


Fig. 2

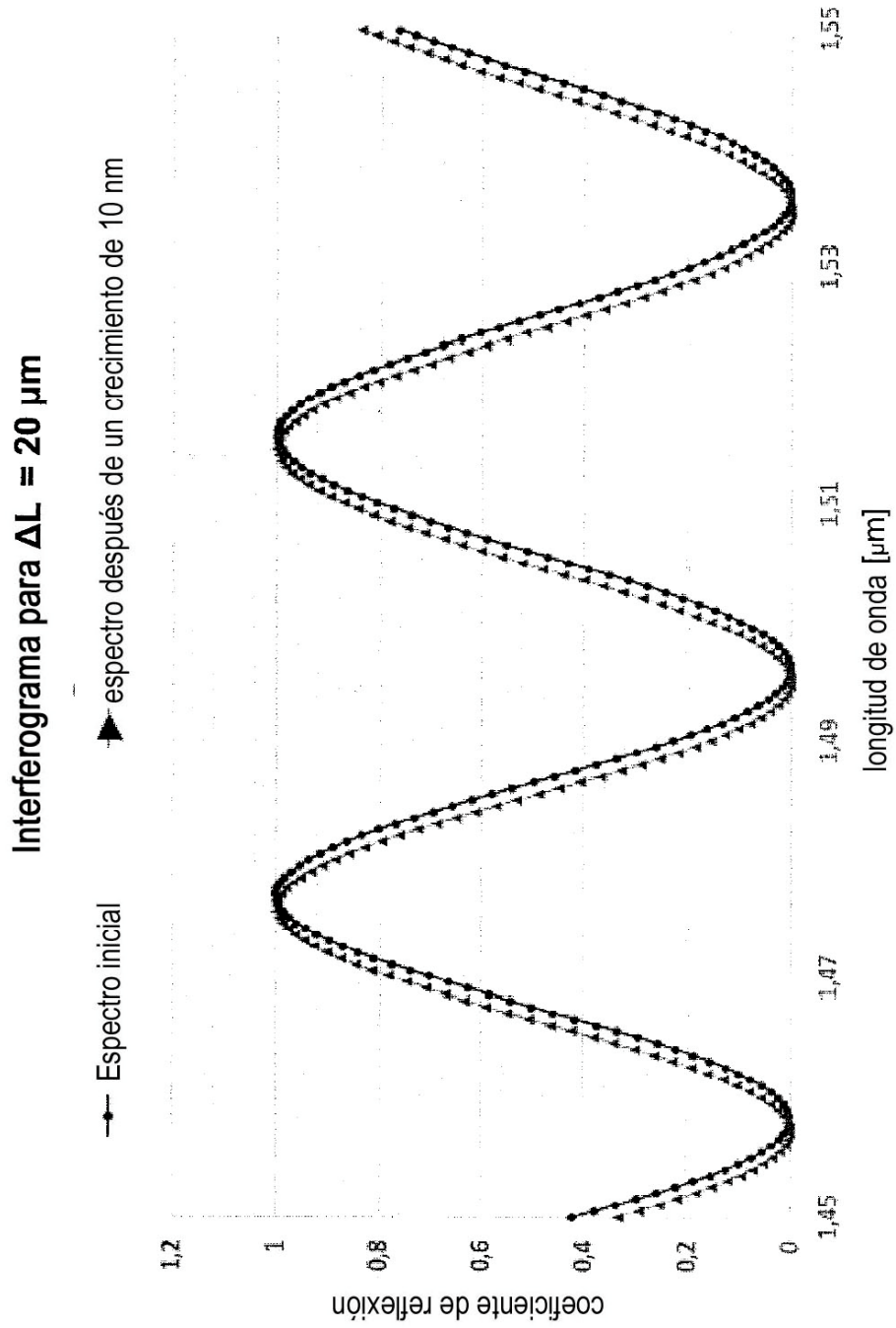


Fig. 3

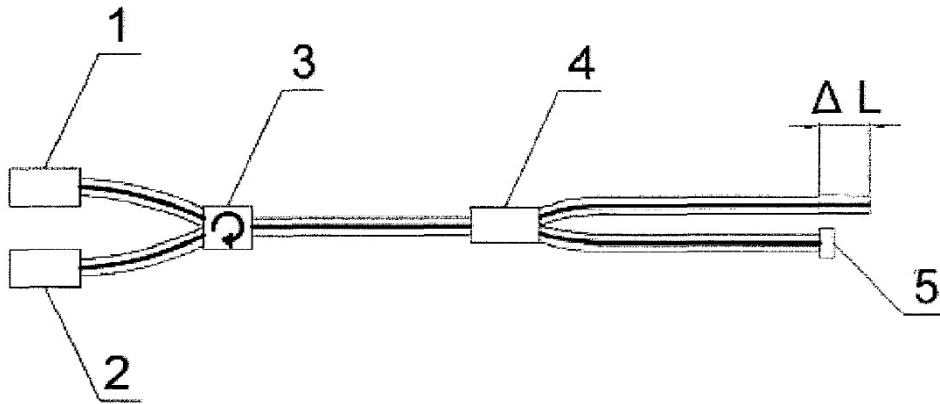


Fig. 4

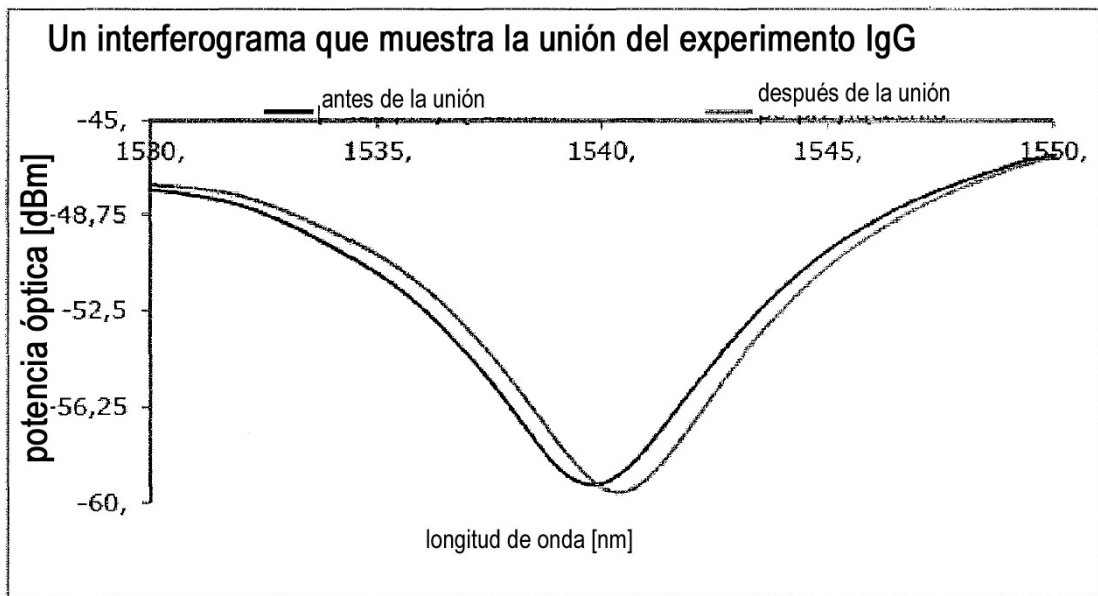


Fig. 5

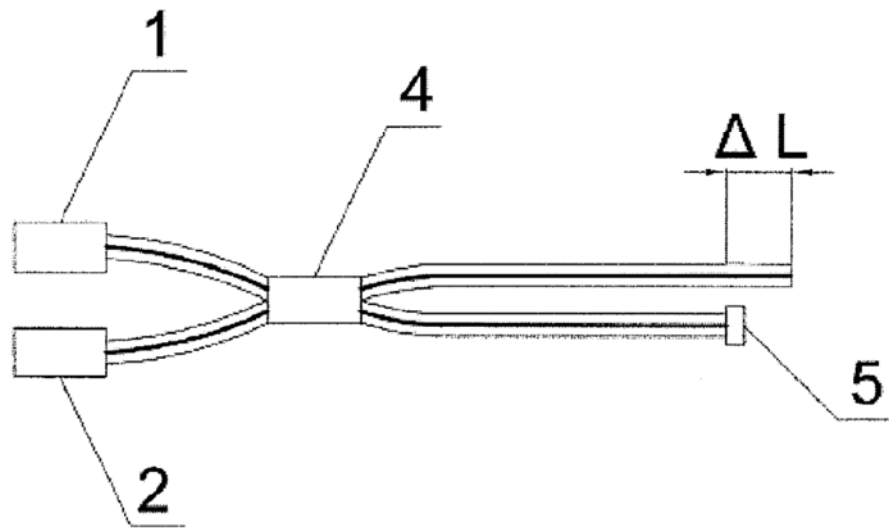


Fig. 6

Interferograma para $\Delta L = 10 \mu\text{m}$

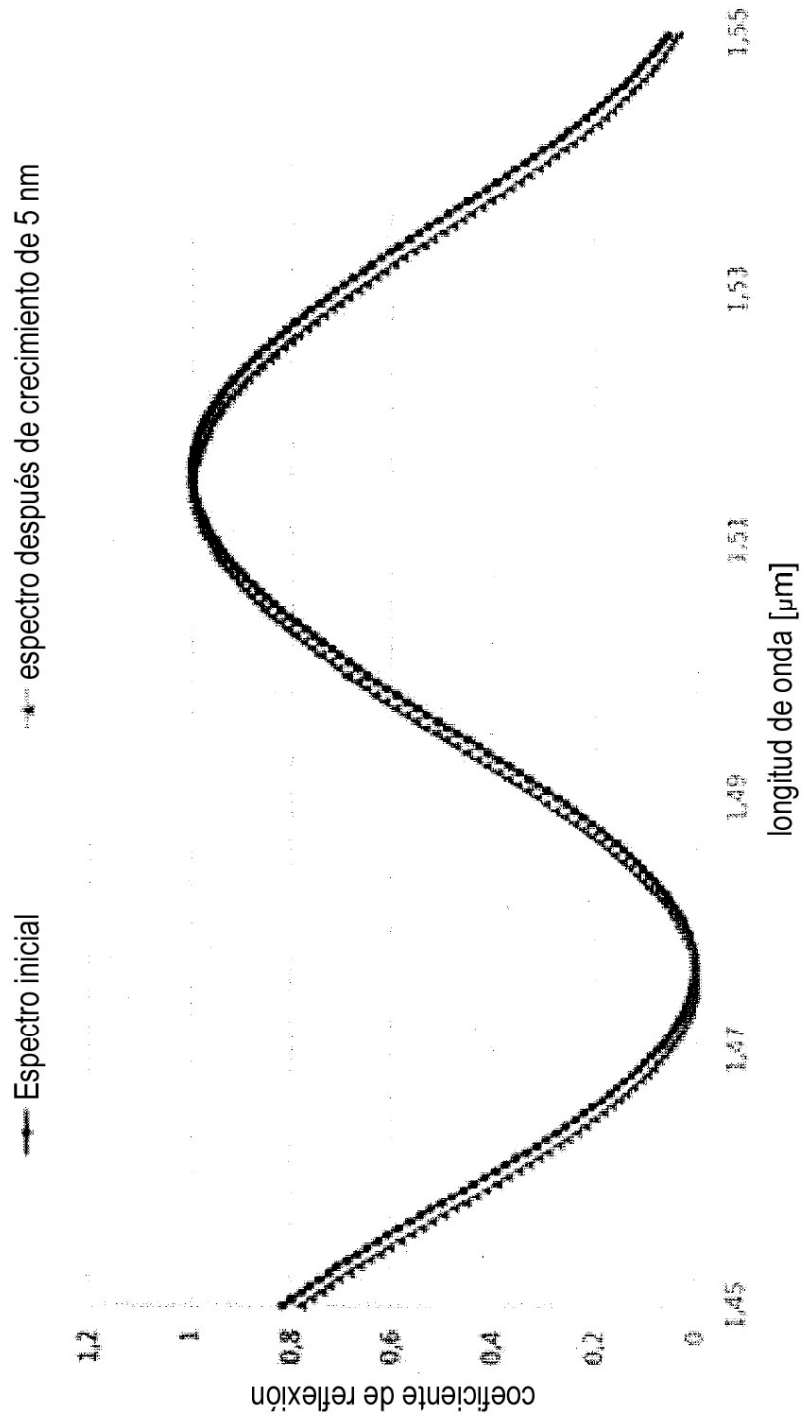


Fig. 7

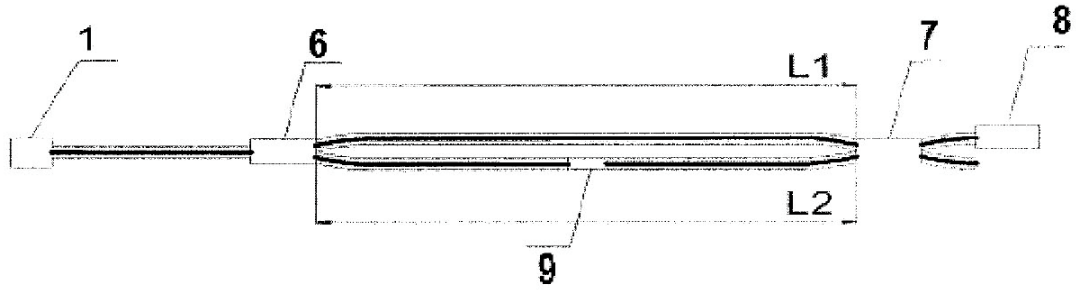


Fig. 8

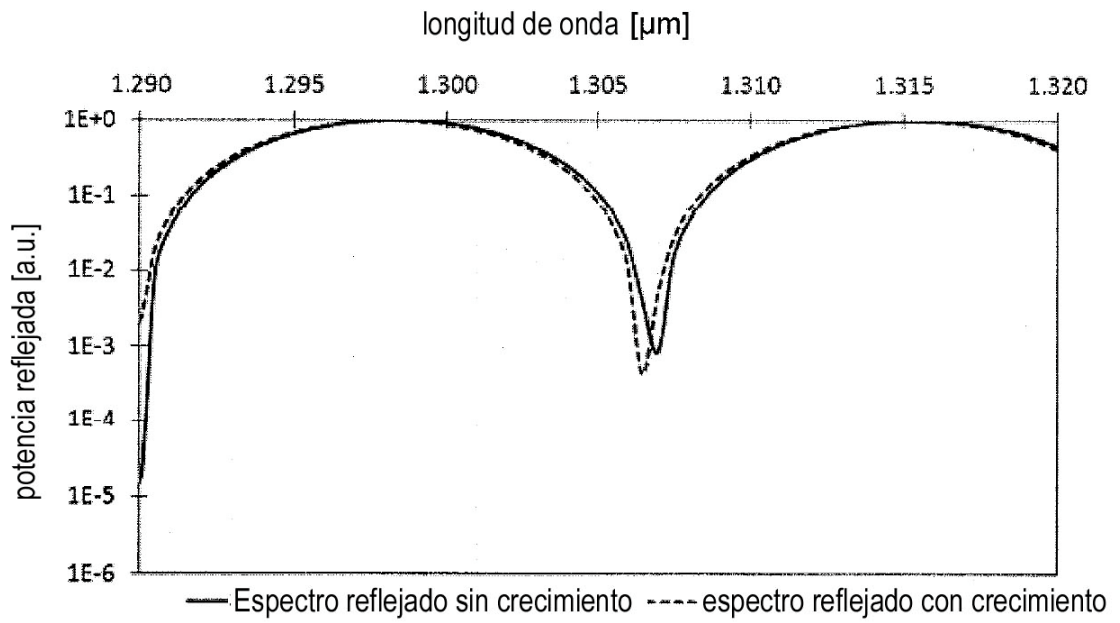


Fig. 9

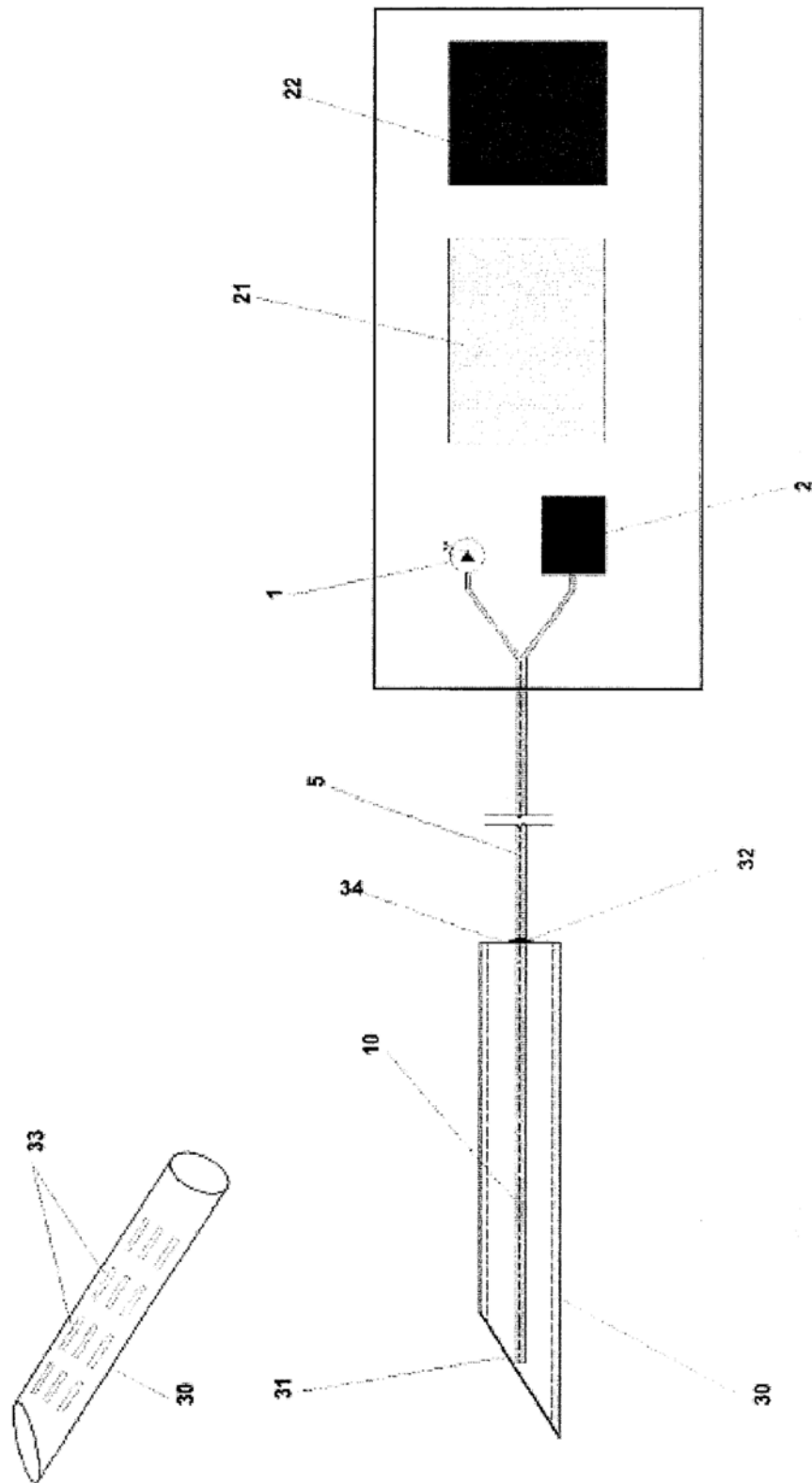


Fig. 10