



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 311 198**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05255444 .1**
⑨6 Fecha de presentación : **06.09.2005**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1635177**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

⑤4 Título: **Cuantificación de la actividad enzimática usando guías de onda planares.**

③0 Prioridad: **08.09.2004 US 608043 P**
06.04.2005 US 99462

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2009

⑦3 Titular/es: **BAYER CORPORATION**
100 Bayer Road
Pittsburgh, Pennsylvania 15205, US

⑦2 Inventor/es: **Hatch, Richard G.**

⑦4 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 311 198 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

Cuantificación de la actividad enzimática usando guías de onda planares.

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional pendiente de tramitación junto con esta con N° de serie 60/608.043 presentada el 8 de septiembre de 2004. La solicitud de patente alemana DE 102 51893 A1 describe un sensor de actividad enzimática con una guía de onda planar. Sin embargo, esta solicitud no describe un sensor con un primer y segundo sustrato, o sustratos que comprenden estructuras espaciadoras de diferentes longitudes.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos de cuantificación de la actividad enzimática.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra la tecnología de la guía de onda planar usando una etiqueta fluorescente.

La Figura 2 muestra la tecnología de la guía de onda planar usada en el “modo de escisión hidrolítica” con un sustrato enzimático fluorescente.

20 La Figura 3 muestra la tecnología de la guía de onda planar usada en el “modo de transformación del reactivo” usando un sustrato enzimático fluorogénico.

25 La Figura 4 muestra la tecnología de la guía de onda planar usada en el “modo de conjugación” usando una etiqueta fluorescente.

La Figura 5 muestra la tecnología de la guía de onda planar usada en el “modo de exclusión estérica” usando un sustrato enzimático fluorogénico.

30 La Figura 6 muestra la tecnología de la guía de onda planar usada en el “modo de aislamiento celular” usando un sustrato enzimático fluorogénico.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona sensores de actividad enzimática que emplean la tecnología de guía de onda planar para determinaciones sensibles y cuantitativas de la actividad enzimática. Los sensores de actividad enzimática de la invención proporcionan muchas ventajas, incluyendo una escala pequeña de operación, velocidad, sensibilidad, especificidad y facilidad de producción. Los sensores pueden usarse en cualquier entorno en el que se desee la determinación de la actividad enzimática y pueden detectar actividad enzimática en sistemas fluidos complejos sin purificación de la muestra. Si se desea, pueden realizarse ensayos enzimáticos múltiples en paralelo.

Guías de ondas planares

45 Los sensores de actividad enzimática comprenden una guía de onda planar que comprende uno o más sustratos para una o más enzimas. En un aspecto, la presente invención proporciona un sensor de actividad enzimática según la reivindicación 1. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para la detección de la actividad enzimática según la reivindicación 13. En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor de actividad enzimática según la reivindicación 22. Las guías de ondas planares normalmente contienen una delgada película de un material con un alto índice de refracción (p. ej., Ta₂O₅ o TiO₂) depositado sobre un soporte transparente con un índice de refracción menor (p. ej., vidrio o un polímero). Los procedimientos para obtener capas de guías de ondas planares son bien conocidos en la técnica y puede usarse cualquiera de los procedimientos conocidos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.959.292, 6.078.705 y 5.846.842, y Rowe-Taitt y col., Biosensors & Bioelectronics 14, 785-94, 2000.

55 *Inmovilización de sustratos enzimáticos sobre la guía de onda planar*

Un sustrato de la enzima que se va a ensayar se inmoviliza sobre la guía de onda planar. Los procedimientos para la inmovilización de proteínas son bien conocidos en la técnica y puede usarse cualquiera de estos procedimientos para fijar un sustrato enzimático a una zona de detección. Véanse, por ejemplo, Scouten y col., Trends in Biotechnology 13, 178-85, 1995; Shriver-Lake y col., Biosensors and Bioelectronics 12, 1101-06, 1997; Rowe-Taitt y col., 2000. El procedimiento seleccionado dependerá en cierto grado de la naturaleza del sustrato enzimático en particular y es bien conocido por los expertos en la materia. Normalmente, los sustratos se inmovilizan mediante enlaces covalentes directamente sobre la capa de guía de onda planar o tras la modificación química de la superficie de la guía de onda planar, por ejemplo, mediante silanización o aplicación de una capa de polímero. Si se desea, puede aplicarse una 65 intercapa delgada (p. ej., SiO₂) directamente sobre la capa de guía de onda planar que sirva de capa promotora de la adhesión para facilitar la inmovilización de un sustrato enzimático sobre la guía de onda.

En otras realizaciones, la capa de guía de onda planar se recubre con avidina y los sustratos enzimáticos pueden estar conjugados con un resto de biotina que tiene una afinidad muy fuerte por la avidina. Véase Rowe-Taitt y col., 2000. En otras realizaciones, la guía de onda se recubre con una película de hidrogel formado por polimetacrilolihidracida que se trata para producir grupos maleimida libres; algunos sustratos enzimáticos pueden oxidarse para producir grupos tiol reactivos que pueden reaccionar con los grupos maleimida. En otras realizaciones adicionales, una superficie de guía de onda silanizada se recubre con polietilenglicol derivatizado con grupos etilendiamina. Estos grupos también pueden reaccionar con los sustratos oxidados de la enzima.

También se pueden usar interacciones no covalentes para fijar un sustrato a una guía de onda planar. Dichas interacciones incluyen, pero sin limitaciones, absorción hidrófoba, interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas.

Cuando se usa un recubrimiento, éste se aplica preferiblemente a la guía de onda planar para conseguir un grosor de capa constante y reproducible. Ejemplos típicos de procedimientos que pueden usarse para recubrir guías de ondas planares son el pulverizado, recubrimiento por rasqueta, recubrimiento por rotación o recubrimiento por inmersión. El control de calidad de los recubrimientos puede realizarse mediante cualquier procedimiento apropiado como microscopía, interferometría, elipsometría y determinaciones de ángulos de contacto.

Sobre la guía de onda planar pueden localizarse diferentes sustratos enzimáticos en regiones diferentes y mutuamente excluyentes. Los sustratos preferiblemente están ordenados en una matriz localizable espacialmente. Por ejemplo, pueden proporcionarse múltiples pocillos o canales sobre la superficie de la guía de onda que permitan la comparación simultánea de marcadores detectables a partir de las soluciones control y de la muestra. Opcionalmente, una porción importante del borde circundante de la guía de onda puede recubrirse con un recubrimiento reflectante para evitar que la luz se escape por los bordes, lo que aumenta la intensidad del campo evanescente. Las matrices localizables espacialmente también pueden prepararse como regiones o manchas para permitir la detección de múltiples actividades enzimáticas en una única muestra líquida.

Marcadores detectables

En algunas de las realizaciones descritas anteriormente los sustratos de la enzima comprenden un marcador detectable. En otras realizaciones, la actividad de la enzima modifica el sustrato para que contenga un marcador detectable. Los marcadores detectables para uso en la invención normalmente son marcadores fotorreactivos, como marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes y marcadores que absorben luz UV. Los marcadores fluorescentes son especialmente útiles porque la excitación del fluoróforo por el campo no requiere la transirradiación del volumen total de fluido, limitándose de este modo la señal de fondo y aumentando la sensibilidad. Los procedimientos de adhesión de marcadores detectables a polipéptidos y a otros sustratos enzimáticos son bien conocidos en la técnica.

Entre los marcadores adecuados se incluyen rodaminas, derivados de fluoresceína, derivados de cumarina, distirilbifenilos, derivados de estilbeno, ftalocianinas, naftalocianinas, complejos polipiridil-rutenio como cloruro de tris(2,2'-bipiridil)-rutenio, cloruro de tris(1,10-fenantroline) rutenio, cloruro de tris(4,7-difenil-1,10-fenantroline) rutenio y complejos de polipiridil-fenacina-rutenio, complejos de platino-profirina como octaetil-platino-porfirina, complejos de europio y terbio de vida larga o colorantes de cianina. En el caso de análisis en los que se usa sangre o suero son especialmente adecuados los colorantes que tienen longitudes de onda de absorción y emisión en el intervalo de 600 a 900 nm.

Entre los marcadores detectables especialmente adecuados se encuentran colorantes como los derivados de fluoresceína que contienen grupos funcionales con los que puedan unirse covalentemente al sustrato, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína. También son muy adecuados los colorantes fluorescentes funcionales de Biological Detection Systems Inc., por ejemplo, los colorantes CY5.5TM mono y bifuncionales. Clinical Chemistry 40, 1819-22, 1994. Si se desea, los sustratos de enzimas diferentes pueden contener marcadores detectables diferentes.

Ejemplos de sensores de actividad enzimática

Los sensores de actividad enzimática de la invención pueden usarse en varios "modos" diferentes. Dependiendo de qué modo de use, la detección de la actividad enzimática puede implicar detectar una disminución o un aumento de la cantidad de marcador detectable.

Por ejemplo, un sensor de actividad enzimática que comprende un sustrato marcado de forma detectable puede usarse en "modo de escisión hidrolítica". En este modo, la enzima escinde el sustrato de la superficie de la guía de onda planar y la actividad enzimática se refleja como una disminución de la señal. Véase la Figura 2.

Otros sustratos enzimáticos comprenden un resto que será modificado por la enzima dando lugar a un marcador detectable o a un marcador que deja de ser detectable ("modo de transformación de reactivo"). Si la enzima modifica el resto de modo que se genera un marcador detectable, la actividad enzimática se reflejará como una disminución de la señal. Por otro lado, si la enzima modifica el resto de modo que deja de ser detectable, la actividad enzimática se refleja como una disminución de la señal. Véase la Figura 3.

En otras realizaciones adicionales, la enzima conjugará un marcador detectable al sustrato de la enzima (“modo de conjugación”). Véase la Figura 4. En estas realizaciones, la actividad enzimática se refleja como un aumento de la señal.

5 En algunas realizaciones, puede usarse la unión del sustrato o de estructuras espaciadoras para aumentar la selectividad de la actividad enzimática diana separando espacialmente diferentes sustratos enzimáticos, por ejemplo, a través de mecanismos estéricos, iónicos o interacciones hidrófobas (“modo de exclusión estérica”). Véase la Figura 5. Estos mecanismos son especialmente útiles en los sensores de actividad enzimática de la invención porque la capacidad de
10 localizar espacialmente el resto marcado de las moléculas detectadas permite una sensibilidad controlable del proceso de detección debido a la extinción exponencial de la intensidad del campo evanescente con la distancia a la superficie del sensor de la guía de onda planar. Shriver-Lake y col., 1997.

Por ejemplo, en un ensayo multiplexado, el uso de espaciadores de longitud diferente puede permitir equilibrar las señales fluorescentes de las diferentes manchas. De forma similar, puesto que también puede controlarse el sitio de
15 reacción enzimática a través de los mismos factores, puede lograrse el aumento o la eliminación de ciertas reacciones específicas en presencia de múltiples moléculas potencialmente reactivas.

Cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente puede usarse *in situ* en un cultivo celular, para analizar el medio en el que las células pueden excretar una enzima (“modo de aislamiento celular”). Véase la Figura 6. En este caso, el sensor de actividad enzimática puede estar separado de las células, o de una única célula, por una capa de
20 polímero macroporoso, como un polímero hidrófilo (p. ej., un metacrilato polihidroxilado o un polisacárido). El modo de aislamiento celular permite la detección de enzimas secretadas por células vivas, en condiciones fisiológicas, sin permitir el contacto entre las células y el sustrato o con posibles productos de reacción. Muchos sistemas de detección de actividad enzimática no son compatibles con células vivas. Esta realización supone, por tanto, una mejora sobre
25 técnicas anteriores en las que los sistemas de reacción que pueden usarse para la detección serían tóxicos o, por otra parte, afectarían de forma adversa a las células. El aislamiento celular también permite la medición sin alterar potencialmente la biología celular mediante irradiación.

30 *Uso de sensores de actividad enzimática*

Los sensores de enzimas descritos en este documento pueden usarse en cualquier contexto en el que se desee un ensayo cualitativo o cuantitativo de la actividad enzimática. Puede detectarse la actividad de cualquier tipo de enzima, incluyendo, pero sin limitación, enzimas proteolíticas (p. ej., amino peptidasa, aspartil proteasas, serina proteasas, metalo proteasas, cisteinil proteasas, pepsina, tripsina, trombina, lisozima, factor VIII:C), glucosidasas, esterasas, hidrolasas, nucleasas, sintetetasas, isomerasas, polimerasas, cinasas, fosfatasas, reductasas, como oxidorreductasas, transferasas, ligasas, enzimas de restricción, amidasas, ATPasas, carbohidrasas, lipasas, celulasas, deshidrogenasas y oxidasas. Los sustratos para estas enzimas son bien conocidos en la técnica y están ampliamente disponibles en el
40 mercado.

Los sensores de actividad enzimática de la invención son especialmente útiles como herramientas de diagnóstico porque permiten estudios *in situ* en tiempo real sumamente variados de sistemas enzimáticos biológicos complejos. En particular, estos sensores permiten controlar en tiempo real la actividad enzimática incluso en líquidos turbios como el suero o la sangre sin ninguna preparación de la muestra. Por tanto, los sensores pueden usarse fácilmente como
45 herramientas diagnósticas rápidas en un punto del entorno asistencial.

En un contexto clínico, el líquido que se pone en contacto con la guía de onda planar es de origen biológico e incluye, pero sin limitación, sangre, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido de lavado broncoalveolar, humor acuoso, líquido ascítico, agua pulmonar extravascular, líquido folicular, líquidos del laberinto, endolinfa, perilinfa, linfa, quilo, líquido del lavado nasal y líquido sinovial. El líquido también puede ser medio en el que se hayan
50 cultivado las células del paciente.

Entre las enzimas que son de interés clínico se incluyen, por ejemplo, amilasa y lipasa (enfermedad pancreática); creatinina cinasa, lactato deshidrogenasa, α -hidroxibutirato deshidrogenasa, aspartato-aminotransferasa sérica y creatinina fosfocinasa (infarto de miocardio, enfermedad muscular e ictus); aminoalanina transferasa, aspartato-aminotransferasa sérica, alanina-aminotransferasa sérica y lactato deshidrogenasa (enfermedad hepática); fosfatasa alcalina (enfermedad hepática o renal); enzima convertidora de angiotensina (sarcoidosis activa, micobacterias atípicas, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Gaucher o lepra); factor VIII:C (hemofilia); renina (hipertensión renovascular); galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (galactosemia); glucocerebrosidasa (enfermedad de Gaucher) y biotinidasas (deficiencia de biotinidasa).
60

Los sensores de actividad enzimática de la invención también pueden usarse en un contexto comercial o de investigación, para controlar la actividad enzimática durante la purificación de una enzima a pequeña o gran escala. Pueden usarse para controlar la actividad enzimática en un medio de fermentación. Pueden usarse para detectar riesgos para la salud pública, por ejemplo, para detectar enzimas diagnósticas de bacterias, virus y hongos patógenos. Los sensores de actividad enzimática de la invención también son útiles en ensayos de selección de alto rendimiento para agentes terapéuticos que puedan reducir una actividad enzimática en particular.
65

Generación y detección del marcador detectable

Los sensores de actividad enzimática de la invención pueden analizar una etiqueta detectable en una capa muy pequeña de líquido usando el campo evanescente generado por reflexión de un haz de luz láser en el interior de la guía de onda planar. El campo evanescente se extiende por el líquido en aproximadamente 100 nm con una intensidad que se extingue exponencialmente; de este modo, las etiquetas detectables que están fuera del campo no se detectan. Véase la Figura 1.

Se coloca un líquido que puede contener la enzima que se va a analizar en contacto con la guía de onda planar. El contacto puede ser estático o el líquido puede pasar sobre la guía de onda planar. Una luz polarizada, más frecuentemente procedente de una fuente láser como un láser de diodo pequeño, se dirige mediante reflectancia total a las interfaces de la capa de la guía de onda. Se genera una onda o campo evanescente por la reflectancia interna de la luz en la interfase entre los materiales de diferentes índices de refracción en los límites de la guía de onda. La fuerza del campo evanescente depende del grosor de la propia capa de la guía de onda, así como de la relación de los índices de refracción de la capa de la guía de onda y el medio circundante. En el caso de guías de onda delgadas, es decir, grosor de la capa del mismo o menor grosor que la longitud de onda que se tiene que guiar, es posible distinguir modos distintos de la luz dirigida.

El campo evanescente excita la luminiscencia del medio ópticamente más delgado de la guía de onda planar, pero sólo directamente adyacente a la onda de luz guiada. Los procedimientos y aparatos para detectar la luminiscencia excitada de forma evanescente son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.582.809 y 5.081.012, en el documento WO 90/06503 y en *Biosensors & Bioelectronics* 6 (1991), 595-607. Pueden usarse fotodiodos, fotocélulas, fotomultiplicadores, cámaras CCD y matrices de detectores, por ejemplo, células CCD. Pueden captarse imágenes de la luminiscencia con elementos ópticos como espejos, prismas, lentes, lentes de Fresnel y lentes de índice de gradiente. Pueden usarse elementos conocidos como filtros, prismas, filtros monocromáticos, espejos dicromáticos y rejillas de difracción para seleccionar la longitud de onda de emisión apropiada.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se incluye sólo para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Incluso aunque se ha puesto un gran cuidado en la recopilación de las referencias, no podemos excluir errores u omisiones y la EPO se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 60608043 A
- US 5846842 A
- DE 10251893 A1
- US 4582809 A
- US 5959292 A
- US 5081012 A
- US 6078705 A
- WO 9006503 A

Bibliografía distinta a las patentes citada en la descripción

- ROWE-TAITT y col. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, vol. 14, 785-94
- SCOUTEN y col. *Trends in Biotechnology*, 1995, vol. 13, 178-85
- SHRIVER-LAKE y col. *Biosensors and Bioelectronics*, 1997, vol. 12, 1101-06
- *Clinical Chemistry*, 1994, vol. 40, 1819-22
- *Biosensors & Bioelectronics*, 1991, vol. 6, 595-607

REIVINDICACIONES

1. Un sensor de actividad enzimática que comprende una guía de onda planar que comprende un primer sustrato para una primera enzima y un segundo sustrato para una segunda enzima, en el que:
- (1) el primer sustrato comprende un primer marcador detectable y el segundo sustrato comprende un segundo marcador detectable, o
- (2) el primer sustrato comprende un primer resto, en el que la primera enzima puede modificar el primer resto para que comprenda el primer marcador detectable y el segundo sustrato comprende un segundo resto, en el que la segunda enzima puede modificar el segundo resto para que comprenda el segundo marcador detectable; y
- en el que el primer sustrato comprende una primera estructura espaciadora y en el que el segundo sustrato comprende una segunda estructura espaciadora, en el que la primera estructura espaciadora y la segunda estructura espaciadora son de longitudes diferentes.
2. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un elemento de detección.
3. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que el primer sustrato comprende el primer marcador detectable y en el que el segundo sustrato comprende el segundo marcador detectable.
4. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que el primer sustrato comprende un primer resto, en el que la primera enzima puede modificar el primer resto para que comprenda el primer marcador detectable y el segundo sustrato comprende un segundo resto en el que la segunda enzima puede modificar el segundo resto para que comprenda el segundo marcador detectable.
5. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que el primer y segundo marcadores detectables se seleccionan entre el grupo compuesto por un marcador fluorescente, un marcador fosforescente o un marcador que absorbe luz UV.
6. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que el primer marcador detectable es un resto fluorogénico.
7. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que la primera enzima se selecciona entre el grupo compuesto por una amidasa, una esterasa, una oxidasa, una reductasa, una polimerasa, una transferasa, una ligasa, una enzima de restricción y una proteasa.
8. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que el primer sustrato y el segundo sustrato son sustratos enzimáticos diferentes.
9. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 1 en el que el primer y segundo sustratos están ordenados en una matriz localizable espacialmente.
10. El sensor de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la guía de onda planar además comprende una capa de polímero macroporoso, en el que la capa de polímero macroporoso separa el sensor de al menos una célula.
11. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 10 en el que la capa de polímero macroporoso comprende un polímero hidrófilo.
12. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 11 en el que el polímero hidrófilo se selecciona entre el grupo compuesto por:
- un metacrilato polihidroxilado y
- un polisacárido.
13. Un procedimiento de detección de la actividad enzimática que comprende las etapas de:
- (a) exponer la guía de onda planar del sensor de actividad enzimática de la reivindicación 11 a una muestra problema en condiciones que permiten a la primera enzima actuar sobre el primer sustrato y a la segunda enzima actuar sobre el segundo sustrato;
- (b) irradiar la guía de onda planar para generar un campo evanescente y
- (c) analizar la presencia de los marcadores detectables en el campo evanescente.

ES 2 311 198 T3

14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el primer sustrato comprende el primer marcador detectable y en el que el segundo sustrato comprende el segundo marcador detectable.

5 15. El procedimiento de la reivindicación 14 en el que la actividad de la primera enzima libera el primer marcador detectable a partir del primer sustrato.

16. El procedimiento de la reivindicación 14 en el que la actividad de la primera enzima reduce la capacidad de detectar el primer marcador detectable.

10 17. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el primer sustrato comprende un primer resto, en el que la primera enzima puede modificar el primer resto para que comprenda el primer marcador detectable y el segundo sustrato comprende un segundo resto en el que la segunda enzima puede modificar el segundo resto para que comprenda el segundo marcador detectable.

15 18. El procedimiento de la reivindicación 17 en el que la primera enzima conjuga el primer marcador detectable al primer sustrato.

19. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la muestra problema comprende un líquido seleccionado entre el grupo compuesto por sangre, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido del lavado bronquial, humor acuoso, líquido ascítico, agua pulmonar extravascular, líquido folicular, fluidos del laberinto, endolinfa, perilinfa, linfa, quilo, líquido de lavado nasal, líquido sinovial, medio de fermentación y medio de cultivo celular.

20. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa (c) comprende la detección cuantitativa.

25 21. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que la etapa (c) comprende la detección cualitativa.

22. Un sensor de actividad enzimática que comprende una guía de onda planar que comprende un sustrato para una enzima, en el que:

30 el sustrato comprende un marcador detectable, o la actividad de la enzima modifica el sustrato para que comprenda el marcador detectable, y en el que la guía de onda planar además comprende: una capa de polímero macroporoso, en el que la capa de polímero macroporoso separa el sensor de al menos una célula.

35 23. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 22, en el que la capa de polímero macroporoso comprende un polímero hidrófilo.

24. El sensor de actividad enzimática de la reivindicación 23, en el que el polímero hidrófilo se selecciona entre el grupo compuesto por un metacrilato polihidroxilado y un polisacárido.

40

45

50

55

60

65

FIG.1

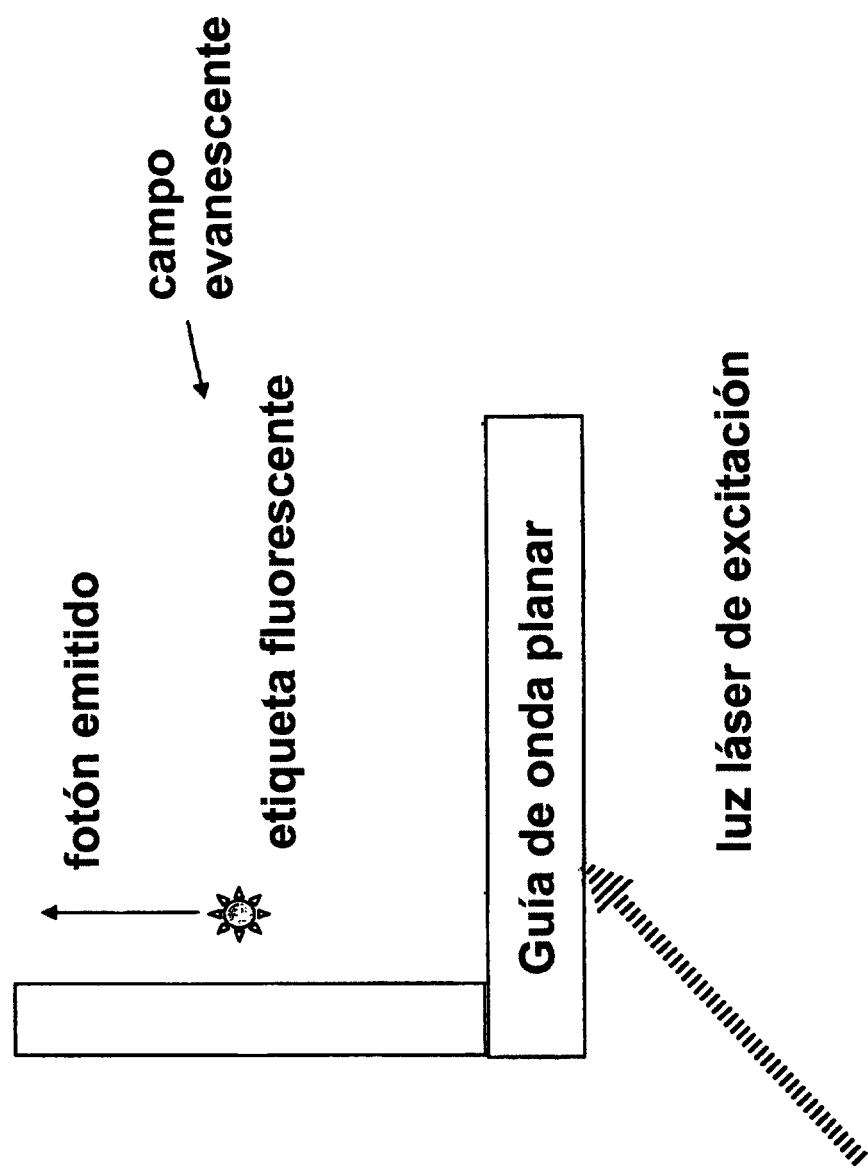


FIG. 2

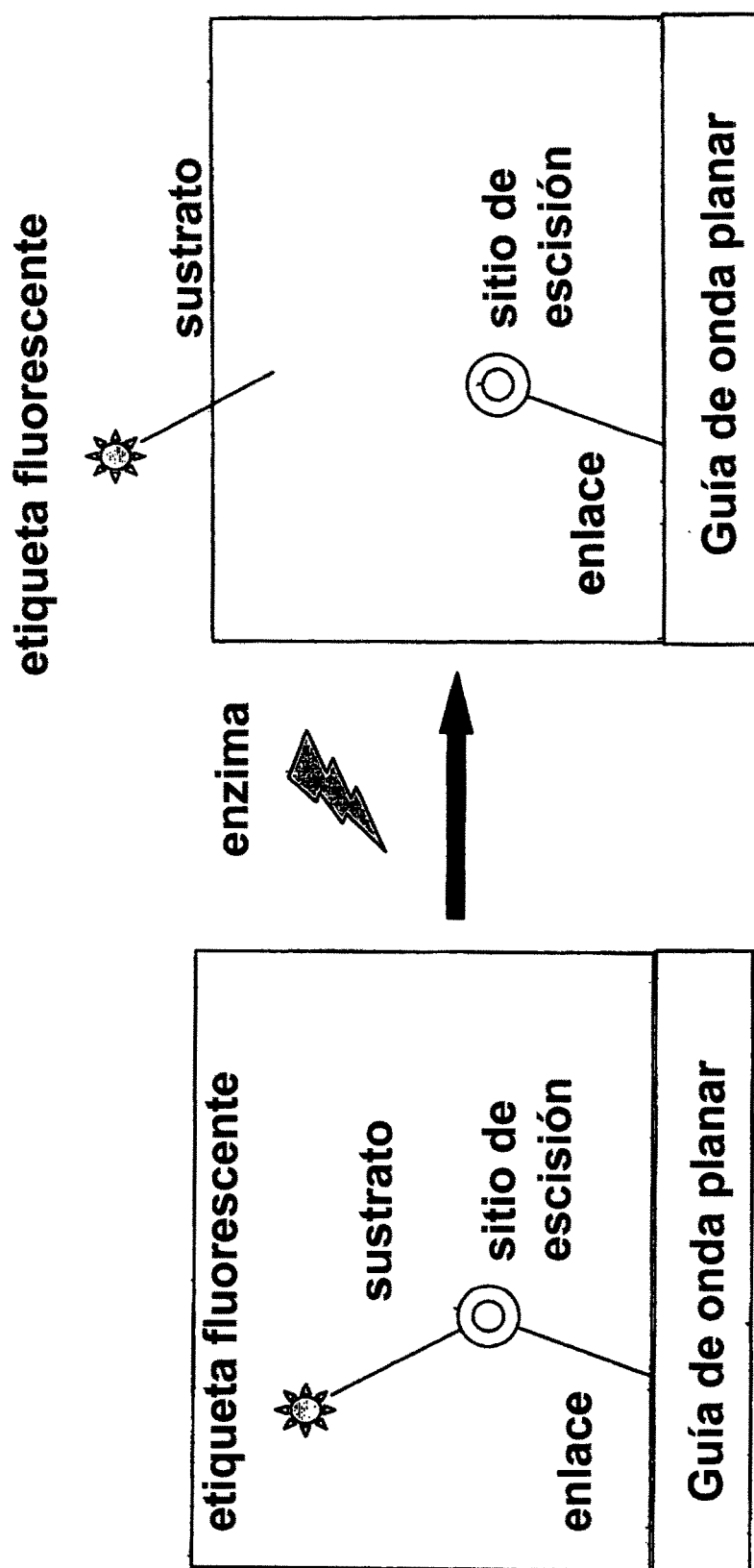


FIG. 3

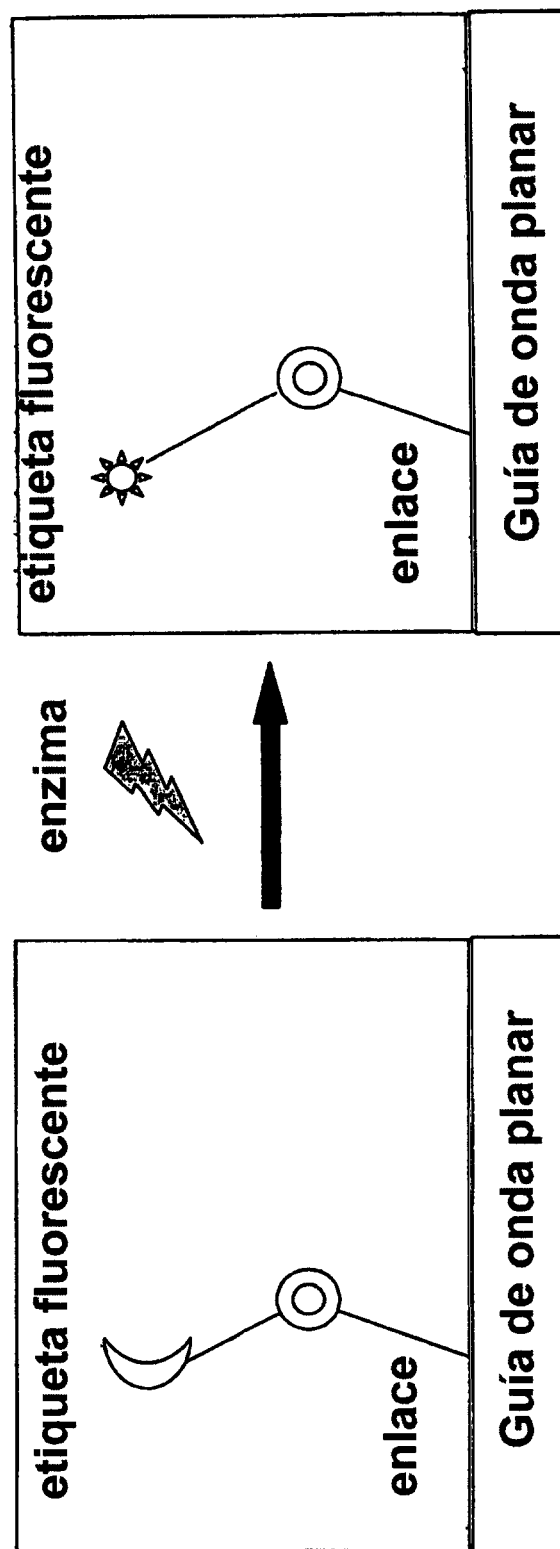
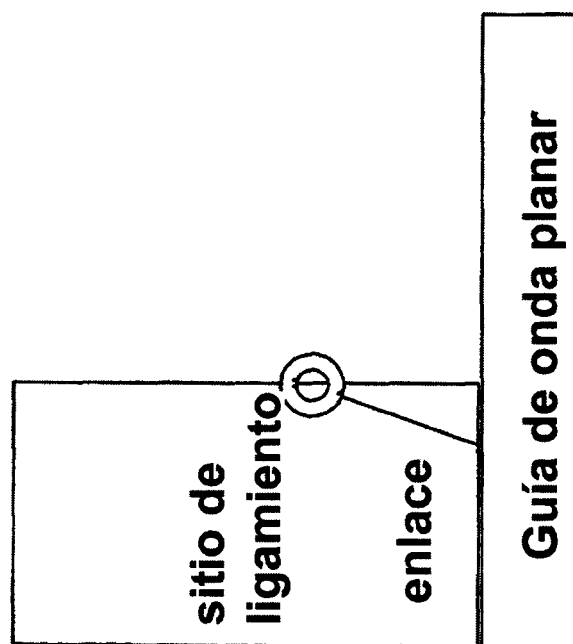
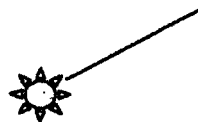


FIG. 4

etiqueta fluorescente

sustrato



enzima

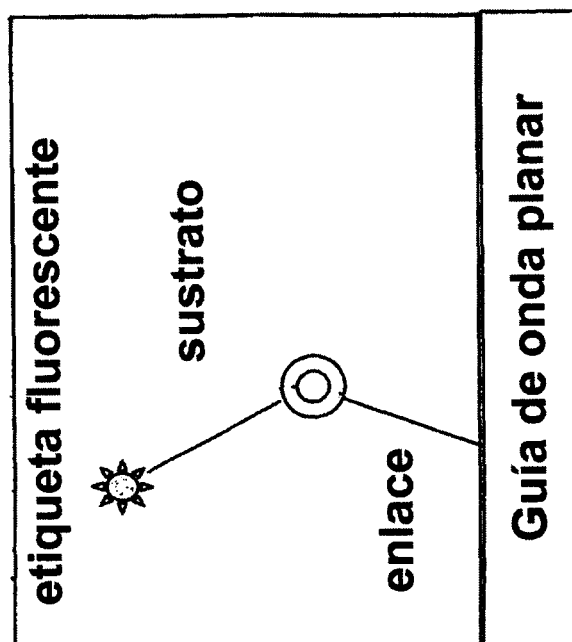


Fig. 5

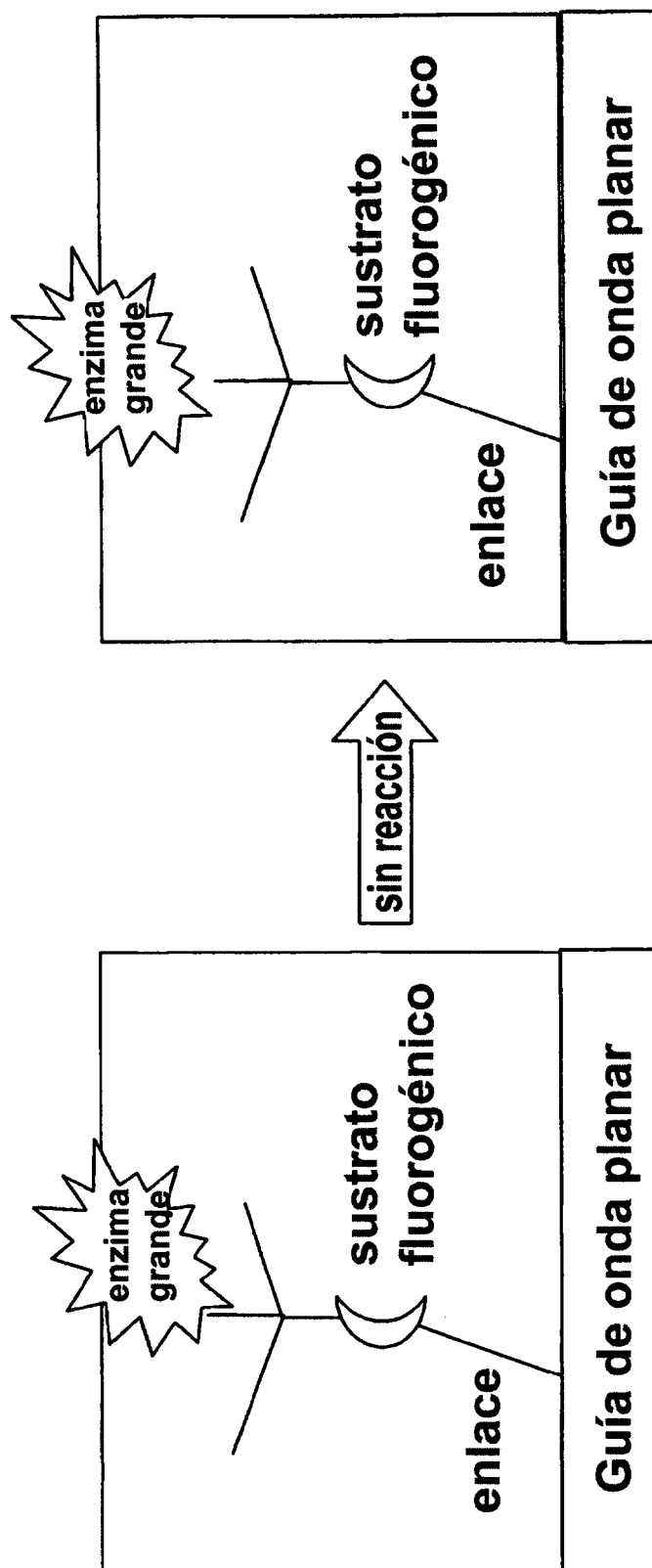


FIG. 6

