

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 206**

51 Int. Cl.:

G01N 33/66

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2018** **PCT/NO2018/050055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018** **WO18169408**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2018** **E 18714623 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3596472**

54 Título: **Composición de fluido, método para preparar la composición y uso**

30 Prioridad:

15.03.2017 NO 20170385

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

15.10.2024

73 Titular/es:

**LIFECARE AS (100.0%)
Ytrebygdsvegen 215
5258 Blomsterdalen, NO**

72 Inventor/es:

FRISVOLD, RUNE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 982 206 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

Composición de fluido, método para preparar la composición y uso

5 **Campo técnico**

La presente solicitud se refiere a composiciones de fluido, en especial a composiciones de fluido activo que pueden usarse en sistemas de sensores de glucosa, por ejemplo, un sensor de glucosa que se basa en la presión osmótica como principio de detección.

10

Antecedentes

Habitualmente, la medición de glucosa se basa en instrumentación manual de sensores de muestras puntuales (pinchazo en el dedo). Sin embargo, dispositivos capaces de realizar mediciones continuas de glucosa en sangre proporcionarían la imagen más completa de las variaciones de glucosa durante el transcurso del día y evitarían la aparición de sucesos peligrosos, por ejemplo, activando una función de alarma cuando la glucosa en sangre sobrepasa lo que se consideran niveles seguros. Esto es especialmente importante cuando las personas están durmiendo o no pueden valerse por sí mismas. Aunque la instrumentación de medición continua de glucosa en sangre se considera el método más eficaz para monitorizar la glucosa, la naturaleza transcutánea de los parches sensores, combinada con la limitada vida útil del sensor y los largos periodos de puesta en marcha, ha hecho que el sensor de un solo uso para la toma de muestras puntual manual sigue siendo el más común.

Existen algunos inconvenientes en el método manual de toma de muestras puntuales. Las personas suelen experimentar dolor e incomodidad con los dispositivos manuales de toma de muestras puntuales, lo que a su vez podría comprometer tales regímenes de autocomprobación. Un número incompleto de mediciones tomadas a lo largo de un día puede dar lugar a que la persona media con diabetes pase periodos del día en un estado hiperglucémico o hipoglucémico. Ambas condiciones son potencialmente peligrosas y pueden contribuir al daño vascular, confusión mental e incluso la muerte.

Los beneficios de las tecnologías de detección continua existentes vienen acompañados de importantes inconvenientes y desventajas y, por lo tanto, actualmente no existen alternativas comerciales reales al método manual de toma de muestras puntuales. Los sistemas de tecnologías de medición continua de glucosa existentes son incómodos, complicados y costosos. No hay funciones de alarma ni memoria digital para almacenar los datos. Los sistemas existentes también tienen una vida útil operativa limitada y requieren calibraciones frecuentes utilizando medidores externos de muestras puntuales.

La detección de glucosa por el principio de presión osmótica promete ser una tecnología de detección de glucosa adecuada tanto para la miniaturización como para la monitorización continua a largo plazo *in vivo* sin causar molestias al paciente ni reducir la calidad de vida. Un sensor osmótico para medir la glucosa en sangre se describe en la tesis doctoral "Osmotic sensor for blood glucose monitoring applications", por Olga Krushinskaya, Departamento de Tecnología de Micro y Nanosistemas, Escuela Universitaria de Vestfold, agosto de 2012. El proyecto de este trabajo de doctorado abordaba el aspecto tecnológico del desarrollo de un sensor de glucosa novedoso que fuera capaz de realizar un seguimiento continuo de la glucosa a través del registro de la presión osmótica, basándose en el principio de utilización de la difusión del agua por su propio gradiente de concentración, lo que permite un diseño de sensor intrínsecamente simple en el que la presión generada es una función de la concentración de glucosa.

El sensor osmótico desarrollado en dicho proyecto se basaba en la presión osmótica generada por la unión competitiva entre la lectina de unión a azúcares Concanavalina A (ConA) y el polisacárido de cadena larga dextrano, que forma un gran complejo macromolecular. Las lectinas son un grupo de proteínas que tienen sitios de unión especiales para carbohidratos, y la ConA se une fuertemente a la glucosa. Los estudios de la Tesis anterior explotaron el efecto osmótico generado por la unión competitiva de la ConA y el dextrano en presencia de glucosa. A medida que aumenta la concentración de glucosa, más de los complejos macromoleculares ConA-dextrano de mayor tamaño se dividen en las "subunidades" más pequeñas ConA-glucosa y dextrano libre. De esta manera, el número de partículas libres dentro del sensor aumenta en función de la glucosa, lo que conduce a un aumento correspondiente en la presión osmótica, véase la figura 1A-B.

Este proceso es reversible y, a medida que cae la concentración de glucosa, la ConA se vuelve a unir al dextrano formando un gran complejo macromolecular a partir de las "subunidades" de ConA y dextrano. La disminución correspondiente en el número de partículas libres desencadena la caída de la presión osmótica.

La patente europea concedida EP 1 631 187 B1 divulga un sensor para la medición *in vivo* de cambios osmóticos. El sensor es un sensor invasivo que puede implantarse subcutáneamente, y especialmente un sensor invasivo que comprende al menos un transductor de presión diferencial que mide la diferencia de presión entre dos volúmenes de fluido confinados por, en un extremo, el al menos un transductor de presión diferencial y, en el otro extremo, membranas osmóticas.

El sensor descrito en el documento EP 1 631 187 B1 se puede utilizar para monitorizar cualquier cambio dentro de la química *in vivo*. El tipo de solutos y su concentración observada *in vivo* proporciona una enorme cantidad de información con respecto a la fisiología del cuerpo y su estado. Al medir la composición, por ejemplo, en el fluido intersticial (ISF), se puede obtener mucha información sobre la deshidratación del organismo y diferentes enfermedades: diabetes, función renal, etc. También se pueden monitorizar variaciones normales, por ejemplo, en las concentraciones de lactato causadas por la actividad física.

Además de las sustancias mencionadas anteriormente, que pueden cambiar la osmolalidad en el cuerpo, también se pueden encontrar sustancias que, mediante medicación, dan un aporte osmótico en el fluido corporal.

La medición de glucosa en el ISF se está reconociendo como una alternativa a la medición de glucosa directamente en la sangre. La medición de glucosa en sangre está asociada con varios inconvenientes. Necesita una muestra de sangre, extraída del cuerpo. Aunque el equipo se ha vuelto más sensible y, por lo tanto, requiere menos sangre, el proceso está asociado con dolor y el número de pruebas normalmente se limita a menos de 10 al día. También se sabe que el procedimiento de medición puede provocar grandes variaciones en los valores medidos.

En las figuras 1-6B del documento EP 1 631 187 B1 y en los párrafos [0022] a [0054] de la descripción se muestran realizaciones y detalles del sensor.

Otros documentos que divulgan una composición para su uso como fluidos activos en un sensor continuo de glucosa; EP 2 055 226; WO 2006/061207; WO 2004/056311; OLGA KRUSHINITSKAYA Y AL: "The assessment of potentially interfering metabolites and dietary components in blood using an osmotic glucose sensor based on the concanavalin Adextran affinity assay", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 28, n.º 1, 9 de julio de 2011, páginas 195-203; ADAMS GARY GET AL: "Rheological and diffusion properties of a dextran-con A polymer in the presence of Insulin and Magnesium", RHEOLOGICA ACTA, DIETRICH STEINKOPFF VERLAG, DARMSTADT, DE, vol. 45, n.º 5, 8 de noviembre de 2005, páginas 611-620, XP036030668, ISSN: 0035-4511, DOI: 10.1007/S00397-005-0013-Y y Ramljak S ET AL: "& Moderated Poster Discussion ADA-Supported Research CLINICAL THERAPEUTICS/NEW TECHNOLOGY- GLUCOSE MONITORING AND SENSING: In vitro proof of principle experiment with the osmotic pressurebased sencell implantable glucose sensor technology", 10 de junio de 2016, XP055473961.

La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, se refiere a una composición que puede usarse como fluido activo en tecnología de detección continua de glucosa sin las desventajas descritas anteriormente. Se descubrió que una composición óptima de fluido activo debería tener una viscosidad baja y la viscosidad debería ser sustancialmente independiente de la concentración de glucosa. Las presentes composiciones de los fluidos activos proporcionan un tiempo de respuesta más rápido en comparación con las composiciones conocidas anteriores debido a una menor viscosidad del fluido y a una composición óptima. La manipulación de los fluidos activos también es más fácil debido a la menor viscosidad. Además, las composiciones óptimas dan lugar a cambios de presión osmótica medibles por el sensor de presión empleado, es decir, la sensibilidad del sistema se mejora enormemente. La química de los fluidos activos presenta concentraciones reproducibles, muestra respuestas estables a largo plazo a temperatura ambiente (> 3 meses) y las concentraciones son estables a 37 °C.

Por lo tanto, la composición de fluido activo de acuerdo con la invención tiene un efecto ventajoso sobre

- la vida útil del sensor; debido a la alta estabilidad de fluidos, la ausencia de precipitación de los compuestos activos y la ausencia de fugas de compuestos activos a través de la membrana;
- el tiempo de respuesta de la medición; debido a la baja viscosidad del fluido;
- la asimetría de la respuesta de medición; debido a que la viscosidad es sustancialmente independiente de la concentración de glucosa,
- la sensibilidad de medición; debido a la óptima concentración y a la elección de los compuestos.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de fluido activo para su uso como fluido activo en un sensor continuo de glucosa que comprende una lectina, siendo la lectina Concanavalina A (ConA); una molécula de unión a lectina que tiene un peso molecular de 10-100 kDa, siendo la molécula de unión a lectina dextrano; al menos una sal de cloruro de un ion metálico divalente elegida de $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$ o una combinación de las mismas, en donde la concentración de ConA mide los cambios en las concentraciones de glucosa en fluidos *in vitro* o *in vivo* detectando diferencias de presión osmótica, y se realiza un seguimiento continuo de las concentraciones de glucosa a través del registro de la presión osmótica, para medir las concentraciones de glucosa *in vitro* o *in vivo*.

En una primera realización, la relación molar de ConA a dextrano es de 1:1.

En una segunda realización, la composición proporcionada comprende dextrano de 40 kDa o dextrano de 70 kDa y una solución tampón acuosa con pH 7,4-7,5 que contiene tampón Tris 100 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM y glucosa 30 mM.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición adecuada para su uso como fluido activo en un sensor continuo de glucosa, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende las siguientes etapas

10 (i) preparar una solución tampón acuosa que tiene un pH de 7,0 a 7,8, que comprende al menos una sal de cloruro de un metal divalente elegida de MgCl₂, CaCl₂ y MnCh o una combinación de las mismas, y opcionalmente glucosa, (ii) o bien

15 (a) proporcionar la cantidad deseada de una molécula de unión a lectina, siendo la molécula de unión a lectina un polisacárido, a la que se añade la solución tampón acuosa preparada en la etapa (i) y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva, y posteriormente proporcionar la deseada cantidad de una molécula de unión a carbohidratos, siendo la molécula de unión a carbohidratos una lectina a la que se añade dicha solución tampón que contiene dicha molécula de unión a lectina y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva, o

20 (b) proporcionar la cantidad deseada de una molécula de unión a carbohidratos, siendo la molécula de unión a carbohidratos una lectina, a la que se añade la solución tampón acuosa preparada en la etapa (i) y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva, y posteriormente proporcionar la deseada cantidad de una molécula de unión a lectina, siendo la molécula de unión a lectina un polisacárido, a la que se añade dicha solución tampón que contiene dicha lectina y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva.

25 En una primera realización del método, las soluciones de la etapa (ii) se agitan durante 2-48 horas, por ejemplo 6-36 horas o 12-24 horas, para la disolución y homogeneización de dicha lectina y dicho polisacárido en la solución tampón acuosa.

30 En cualquiera de las realizaciones anteriores del método, el fluido activo puede desgasificarse para minimizar la formación de burbujas.

En una realización específica del método, la composición de fluido se prepara mediante las siguientes etapas

35 - preparar una solución tampón acuosa que contiene tampón Trizma 100 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM y glucosa 30 mM,
- verificar el pH de 7.4-7.5,
- se pesa la cantidad deseada de dextrano y se añade solución tampón y se deja durante una noche mientras se agita, dando una solución de dextrano disuelta y homogeneizada,
40 - se pesa la cantidad deseada de ConA y se añade solución de dextrano y se deja en agitación durante 24 horas antes de su uso.

La solución tampón acuosa puede desgasificarse para minimizar la formación de burbujas. Después de la desgasificación, debe comprobarse el volumen y reponerlo si es necesario.

45 La composición de acuerdo con la presente invención puede usarse como fluido activo en un sensor para medir los cambios en las concentraciones de carbohidratos en fluidos *in vitro* o *in vivo* detectando diferencias de presión osmótica. En una realización, la composición de fluido activo de acuerdo con la presente invención puede usarse para medir concentraciones de glucosa en sangre *in vitro* o *in vivo*. Dicha composición puede usarse como fluido activo en un sensor osmótico de glucosa que es capaz de realizar un seguimiento continuo de las concentraciones de glucosa a través del registro de la presión osmótica, para medir las concentraciones de glucosa *in vitro* o *in vivo*.

En el contexto de la presente invención, los términos "composición", "fluido activo", "composición de fluido", "fluido de referencia" son todas expresiones que se refieren a la composición de acuerdo con la presente invención.

55 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ilustración del principio de detección; figura 1A. Glucosa baja, diferencia de presión baja; figura 1B. Glucosa alta, diferencia de presión alta. Figura 1C. Macrocélula *in vitro*; figura 1D. Correlación lineal entre las presiones osmóticas y los niveles de glucosa.

60 Figura 2: Viscosidad en función de la concentración de glucosa para dextrano de 10 kDa, 40 kDa y 70 kDa. La concentración de ConA es igual a 3 mM, la concentración de dextrano es de 0,5 mM. Tenga en cuenta la escala logarítmica y.

65 Figura 3: Viscosidad en función de la concentración de glucosa para dextrano de 10 kDa, 40 kDa y 70 kDa. La

concentración de ConA es igual a 1,5 mM, la concentración de dextrano es de 0,5 mM. Tenga en cuenta la escala logarítmica y.

Figura 4: Viscosidad en función de la concentración de glucosa para dextrano de 10 kDa, 40 kDa y 70 kDa. La concentración de ConA es igual a 1 mM, la concentración de dextrano es de 1 mM. Tenga en cuenta la escala logarítmica y.

Figura 5: Viscosidad en función de la concentración de glucosa para dos dextranos, de 40 kDa y de 70 kDa. Las concentraciones de ConA y dextrano son iguales a 1,5 mM.

Figura 6: Viscosidad en función de la concentración de glucosa para dextrano de 40 kDa, con dos concentraciones diferentes de ConA y dextrano (1 y 1,5 mM).

Figura 7: Viscosidad en función de la concentración de glucosa para dextrano de 70 kDa, con dos concentraciones diferentes de ConA y dextrano (1 y 1,5 mM).

Figura 8: Una curva de ejemplo que muestra los cambios entre una solución de glucosa 2 mM y una solución de glucosa 30 mM. Obsérvese el fuerte pico rápido seguido de una deriva lenta en la dirección opuesta para alcanzar un equilibrio estable.

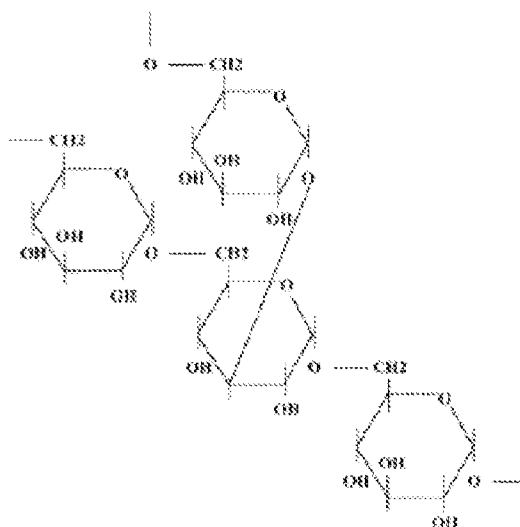
Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar una composición que pueda usarse como fluido activo en la tecnología de detección continua de glucosa. Este objeto se ha logrado mediante la composición que comprende

una lectina, siendo la lectina Concanavalina A (ConA);
una molécula de unión a lectina que tiene un peso molecular de 10-100 kDa, siendo la molécula de unión a lectina dextrano;
al menos una sal de cloruro de un ion metálico divalente elegida de $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$ o una combinación de las mismas, en donde la concentración de ConA mide los cambios en las concentraciones de glucosa en fluidos *in vitro* o *in vivo* detectando diferencias de presión osmótica, y se realiza un seguimiento continuo de las concentraciones de glucosa a través del registro de la presión osmótica, para medir las concentraciones de glucosa *in vitro* o *in vivo*.

La composición anterior comprende una molécula de unión a carbohidratos que es una lectina. Las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos, macromoléculas que son altamente específicas para restos de azúcar. La concanavalina A (ConA) es una lectina extraída originalmente de la judía sable, *Canavalia ensiformis*. Es un miembro de la familia de las lectinas de leguminosas. Se une específicamente a ciertas estructuras que se encuentran en diversos azúcares, glicoproteínas y glicolípidos, principalmente grupos α -D-manosilo y α -D-glucosilo internos y terminales no reductores. Se sabe que presenta estabilidad química a largo plazo a temperaturas corporales fisiológicas. La configuración de la ConA depende del pH. Se forman subunidades monoméricas a pH 4-6 en presencia de 2-propanol, diméricas a pH 4,5-6,5, mientras que la estructura tetramérica se forma a un pH superior a 7. El tamaño del monómero ConA es de aproximadamente 42x40x39 Å. El peso molecular de una subunidad de este tipo varía de 25500 Da a 27000 Da, dependiendo de la referencia bibliográfica que se consulte. Una subunidad contiene un sitio de unión para ciertas estructuras encontradas en azúcares, por ejemplo, glucosa o manosa, y considerando la estructura tetramérica, dicha molécula tendría un total de 4 sitios de unión. La afinidad hacia los carbohidratos se rige por un sitio de unión de iones metálicos que activa la ConA para la unión de sacáridos y modula su estabilidad. Pueden usarse Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} para activar la ConA, el ion Mn^{2+} puede reemplazarse por Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} .

Además, la composición anterior comprende una molécula de unión a lectina. En el presente trabajo se ha usado dextrano como molécula de unión a lectina. El dextrano es un glucano ramificado complejo (polisacárido formado por muchas moléculas de glucosa) compuesto por cadenas de longitudes variables (de 3 a 2000 kDa). La cadena lineal consiste en enlaces glucosídicos α -1,6 entre moléculas de glucosa, mientras que las ramificaciones parten de enlaces α -1,3. La ramificación de dextrano puede ser del 0,5-60 %, disminuyendo la solubilidad a medida que aumenta la ramificación. El dextrano se sintetiza a partir de sacarosa por ciertas bacterias del ácido láctico, siendo las más conocidas *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus mutans*. La fórmula química para el dextrano es (de Mehvar et al. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. Journal of Controlled release, 2000. 69: págs. 1-25.)



La composición anterior incluye además al menos una sal de cloruro de un ion metálico divalente. La al menos una sal de cloruro de un ion metálico divalente se elige de $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$. La al menos una sal de cloruro, o una combinación de las mismas, se disuelve en una solución tampón acuosa, dando concentraciones de $MgCl_2$ 1-10 mM, $CaCl_2$ 1-10 mM y $MnCl_2$ 1-10 mM. La solución acuosa también puede comprender NaCl para dar una solución isotónica.

En la composición de acuerdo con la presente invención, el tampón usado para preparar la solución tampón acuosa puede elegirse de

tampón Tris, también conocido como tris(hidroximetil)aminometano o THAM, es un compuesto orgánico con la fórmula $(HOCH_2)_3CNH_2$. El tampón Tris también se conoce como Trizma®, que es una marca comercial que pertenece a Sigma-Aldrich®. Tris se usa como componente de soluciones tampón, tal como en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) y TBE (Tris-barato-EDTA). El tampón TAE es una solución tampón que contiene una mezcla de base Tris, ácido acético y EDTA. El tampón TBE es una solución tampón que contiene una mezcla de base Tris, ácido bórico y EDTA. La solución salina tamponada con Tris (TBS) es un tampón usado en algunas técnicas bioquímicas y es isotónica y no tóxica. TBS contiene Tris y NaCl. El pK_a de los tampones Tris depende de la temperatura, el pK_a disminuye aproximadamente 0,03 unidades por grado Celsius de aumento de temperatura.

o tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico; nombre IUPAC: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico) que es un agente tampón químico orgánico zwitteriónico. La solución tampón puede ser una combinación de ácido de HEPES/sal de Na de HEPES y NaCl

En la composición de acuerdo con la presente invención, se puede añadir además glucosa para reducir la viscosidad de la composición de fluido activo. A bajas concentraciones de glucosa, las moléculas de dextrano se reticulan mediante enlaces ConA, formando una solución extremadamente viscosa. Cuando aumenta la concentración de glucosa, las moléculas de dextrano se reemplazan parcialmente por glucosa en los sitios de unión de ConA. Como resultado, la red ConA-dextrano se debilita y la viscosidad del fluido activo disminuye.

Se puede añadir NaCl a la composición de fluido activo para producir una solución isotónica.

El agua utilizada para preparar el fluido activo, es decir, la solución tampón, es un tipo de agua purificada, tal como agua de ósmosis inversa, agua desionizada o destilada.

El principio de detección de un sensor de glucosa implantable se basa en las variaciones de presión osmótica entre una cámara de reactivo y la solución, véanse las figuras 1A-D. La detección de la glucosa se basa en la competencia entre la glucosa y un polisacárido (dextrano) para unirse a un receptor, la lectina Concanavalina A (ConA). La ConA y el dextrano están presentes en la cámara de reactivo en un "fluido activo" y no deben salir a través de la membrana nanoporosa. A baja concentración de glucosa, la diferencia de presión en la cámara de reactivo es baja. Las moléculas de glucosa y los iones pequeños pasarán a través de los poros de las membranas. Las moléculas de glucosa que entran en la cámara de reactivos compiten con el dextrano para unirse a las proteínas ConA. A medida que aumenta la concentración de glucosa, la liberación de dextrano de la ConA produce un aumento de la presión osmótica que puede usarse para cuantificar la concentración de glucosa. Este proceso es reversible y, a medida que cae la concentración de glucosa, la ConA se vuelve a unir al dextrano formando un gran complejo macromolecular a partir de las "subunidades" de ConA y dextrano. La disminución correspondiente en el número de partículas libres desencadena la caída de la presión osmótica.

La presión osmótica Π de una solución ideal de baja concentración se puede aproximar usando la ecuación de Morse:

$$\pi = iMRT$$

donde i es el factor de Van't Hoff adimensional, M es la molaridad, R la constante de gas y T la temperatura de la cámara.

La Figura 1D muestra la correlación lineal entre las presiones osmóticas y los niveles de glucosa, precisa también a niveles hipo e hiperglucémicos.

Los inventores descubrieron que reducir la viscosidad de la composición reduciría en consecuencia la asimetría y el tiempo de respuesta del sensor. Para disminuir la viscosidad del fluido activo, se exploraron los siguientes parámetros mientras se variaba la concentración de glucosa en las soluciones:

- Peso molecular del dextrano (10 kDa, 40 kDa o 70 kDa)
- Relación de ConA a dextrano
- Concentración inicial de ConA.

La figura 2 muestra la viscosidad en función de la concentración de glucosa para dextrano de 10 kDa, 40 kDa y 70 kDa, la relación molar entre ConA y dextrano fue de 6:1, usando concentraciones iniciales de 3 mM y 0,5 mM, respectivamente. Esta composición de fluido activo se consideró como "referencia" para las mediciones de viscosidad.

Se esperaba que la reducción de la concentración de ConA y, más específicamente, de la relación de concentraciones de ConA a dextrano, disminuyera el número de enlaces intermoleculares entre el dextrano y la ConA, reduciendo así la viscosidad del sistema. Para investigar este efecto, la relación de ConA a dextrano se redujo de 6:1 a 3:1, usando las siguientes concentraciones: ConA 1,5 mM, dextrano 0,5 mM y un intervalo de glucosa de 2 a 30 mM.

La figura 3 muestra claramente que la viscosidad de cada sistema disminuye de uno a dos órdenes de magnitud cuando la concentración de ConA se divide por dos (todos los demás parámetros se mantienen constantes). Se espera que esto tenga un efecto extremadamente significativo en el tiempo de respuesta y la asimetría de la respuesta con el aumento o la disminución de la concentración de glucosa.

Se demostró que la disminución de la relación molar de ConA a dextrano a 1:1 mejoraba la amplitud de la respuesta del sensor. La reducción del número de enlaces intermoleculares entre la ConA y el dextrano también reducía la viscosidad. Los inventores optaron por probar una concentración ligeramente mayor de dextrano (1 mM en lugar de 0,5 mM) ya que también se demostró que mejoraba la amplitud de la respuesta y la sensibilidad del sensor. Un fluido activo con una concentración de ConA y dextrano de 1 mM mostró una amplitud de respuesta aproximadamente tres veces mayor que la amplitud de respuesta del fluido activo de "referencia" descrito anteriormente.

Al mantener iguales las concentraciones molares de dextrano y ConA (a 1 mM), la viscosidad se redujo aún más en un orden de magnitud en comparación con la relación molar 3:1 de ConA a dextrano, véase la figura 4. Además, se reduce la influencia de la concentración de glucosa en la viscosidad. Esto disminuyó la asimetría de los tiempos de respuesta a concentraciones de glucosa crecientes y decrecientes.

Para las caracterizaciones, cada solución se agitó durante 24 horas antes de las mediciones de viscosidad. Se usó un viscosímetro Brookfield DV-II+Pro para todas las mediciones. El viscosímetro acciona un husillo a través de un resorte calibrado que está sumergido en el fluido activo. El arrastre viscoso del fluido contra el husillo se mide mediante la desviación del resorte, que se mide con un transductor rotatorio. El intervalo de medición viene determinado por la velocidad de rotación del husillo, el tamaño y la forma del husillo, el recipiente en el que gira el husillo y el par de escala completa del resorte calibrado. La viscosidad aparece en unidades de centipoise (se muestra "cP"). Un centipoise es igual a 1 mPa.s en el SI.

Para controlar la temperatura (T) a la que se realizaron las mediciones, el viscosímetro estaba equipado con un baño de agua que se podía ajustar a la T elegida. Todas las mediciones de viscosidad se realizaron a 37 °C, con un período de espera de 5 min para garantizar la estabilización de la temperatura en el fluido activo.

Basándose en las mediciones de viscosidad y en los resultados de la simulación, los inventores encontraron tendencias claras en términos de sensibilidad y cinética del sensor:

- Una relación de concentración molar de 1 a 1 de ConA a dextrano fue ventajosa con respecto a las sensibilidades en términos de presión osmótica en el intervalo de concentración de glucosa [0;30] mM.

- Una relación de concentración molar de 1 a 1 de ConA a dextrano fue ventajosa con respecto a la cinética rápida y la respuesta menos asimétrica a las variaciones de glucosa, ya que la viscosidad del fluido activo varió muy poco con la concentración de glucosa.
- Una relación de concentración molar de 1 a 1 de ConA a dextrano, una alta concentración de ConA (= concentración de dextrano) proporcionó una mejor sensibilidad. Sin embargo, también era probable que aumentara la viscosidad del sistema, aumentando a su vez el tiempo de respuesta del sensor.
- Se realizaron estudios experimentales de las viscosidades de diferentes fluidos activos. Estos mostraron una caída rápida (de 3 órdenes de magnitud) a medida que la concentración de ConA disminuía de 3 mM (basándose en la concentración de monómero) a 1 mM. Los cambios en la concentración de dextrano también influyeron en la viscosidad, pero en menor medida. Por el contrario, el peso molecular del dextrano (10 kDa, 40 kDa, 70 kDa) podía cambiar la viscosidad en órdenes de magnitud, véanse las figuras 6 y 7.
- Cuanto menor era el PM del dextrano, menor era la viscosidad. Esto significa que un fluido activo que contiene dextrano de 10 kDa dará una respuesta más rápida que uno que contiene dextrano de 40 kDa, que a su vez se espera que de una respuesta más rápida que uno que contiene dextrano de 70 kDa.
- Un PM más alto del dextrano proporcionó una presión osmótica diferencial más alta del sistema. Por lo tanto, usar un dextrano de mayor tamaño (por ejemplo, de 70 kDa) en el fluido activo mejorará la sensibilidad del sistema.
- Las simulaciones del tiempo de respuesta basadas en estas mediciones indicaron que se espera que el número de fluidos activos tenga tiempos de respuesta (tanto en concentraciones de glucosa crecientes como decrecientes) de menos de 5 minutos.

Los inventores realizaron una serie de experimentos para probar la respuesta de diferentes fluidos activos, por ejemplo:

ConA 1,0 mM, dextrano de 40 kDa 1,0 mM y ConA 1,0 mM, dextrano de 70 kDa 1,0 mM. ConA 1,5 mM, dextrano de 40 kDa 1,5 mM y ConA 1,5 mM, dextrano de 70 kDa 1,5 mM.

Prueba de fluidos activos basada en ConA 1,5 mM, dextrano de 40 kDa 1,5 mM

Los experimentos se llevaron a cabo ciclando el contenido de la cámara de muestras en una macrocelda entre glucosa 2 mM (en una solución que contenía tampón Trizma B 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM y CaCl₂ 10 mM) y glucosa 30 mM en la misma solución. En cada cambio de concentración de glucosa, la solución se retiró a mano usando una pipeta, teniendo mucho cuidado de no tocar la membrana nanoporosa (NP), pero acercando la punta de la pipeta lo más posible al fondo de la cámara de muestras. A continuación, la solución se reemplazó por la nueva solución elegida, que se agitó "bombeando" la pipeta. La solución se retiró y se reemplazó por solución fresca otras dos veces. La temperatura era de 21 °C.

Siguiendo este procedimiento, se obtuvo una señal reproducible. Un cambio de glucosa 2 mM a glucosa 30 mM dio como resultado un gran pico hacia abajo en la presión medida, seguido de un aumento lento hasta una nueva presión que era aproximadamente 10 mbar más alta que el valor original. Un cambio de glucosa 30 mM a glucosa 2 mM dio un gran pico en la presión medida seguido de una deriva lenta hacia abajo (véase la figura 8). Cada vez se producía tanto el pico rápido en una dirección como la deriva lenta en la dirección opuesta.

Estas dos características pueden entenderse cuando consideramos el curso de tiempo de los acontecimientos que tienen lugar en la cámara de muestras y en la cámara de fluido activo, como se describe a continuación.

- 1) Partiendo de una baja concentración de glucosa, para empezar, todos los solutos pequeños están presentes en concentraciones iguales a ambos lados de la membrana NP. La mayor parte de la ConA y el dextrano dentro de la cámara de fluido activo están unidos entre sí, lo que produce una pequeña sobrepresión dentro de la cámara.
- 2) Se añade glucosa fuera de la membrana NP. La concentración de solutos es brevemente mayor fuera de la membrana que dentro. Hay una breve subpresión dentro de la cámara.
- 3) La glucosa se difunde a través de la membrana. Los solutos pequeños están presentes en concentraciones iguales a ambos lados de la membrana NP. La ConA y el dextrano se disocian y la presión medida aumenta para finalmente dar una sobrepresión dentro de la cámara.

Por lo tanto, el pico observado no es un fenómeno estadístico artificial, sino que muestra el proceso de equilibrio de la concentración de glucosa en los dos lados de la membrana.

Los resultados del estudio sobre los fluidos activos también muestran que las presentes composiciones de fluido activo podrían estudiarse durante 3 meses sin pérdida perceptible de sensibilidad, es decir, estabilidad a largo plazo.

Habiendo descrito realizaciones preferidas de la invención, será evidente para los expertos en la materia que se pueden usar otras realizaciones que incorporen los conceptos. Estos y otros ejemplos de la invención ilustrados anteriormente se han concebido únicamente a modo de ejemplo y el alcance real de la invención se determinará a partir de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso como fluido activo en un sensor continuo de glucosa que comprende:

- 5 una lectina, siendo la lectina Concanavalina A (ConA);
una molécula de unión a lectina que tiene un peso molecular de 10-100 kDa, siendo la molécula de unión a lectina dextrano;
al menos una sal de cloruro de un ion metálico divalente elegida de $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$ o una combinación de las mismas,
10 estando la composición caracterizada por que:
la concentración de ConA es de 1-1,5 mM basándose en la concentración de monómero y la concentración de dextrano es de 1-1,5 mM, en donde el sensor continuo de glucosa:
- 15 - mide los cambios en las concentraciones de glucosa en fluidos *in vitro* o *in vivo* detectando diferencias de presión osmótica, y
- realiza un seguimiento continuo de las concentraciones de glucosa a través del registro de la presión osmótica, para medir las concentraciones de glucosa *in vitro* o *in vivo*.

2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la relación molar de ConA a dextrano es de 1:1.

3. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición se caracteriza por que:

- 25 el dextrano es dextrano de 40 kDa o dextrano de 70 kDa;
una solución tampón acuosa con pH 7,4-7,5 que contiene tampón Tris 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 150 mM y glucosa 30 mM.

4. Método para preparar una composición adecuada para su uso como fluido activo en un sensor continuo de glucosa de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que comprende las siguientes etapas

- 30 (i) preparar una solución tampón acuosa que tiene un pH de 7,0 a 7,8, que comprende al menos una sal de cloruro de un metal divalente elegida de $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$ o una combinación de las mismas, y opcionalmente glucosa,
(ii) o bien:
- 35 - (a) proporcionar la cantidad deseada de una molécula de unión a lectina, siendo la molécula de unión a lectina dextrano que tiene un peso molecular de 10-100 kDa, a la que se añade la solución tampón acuosa preparada en la etapa (i) y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva, y posteriormente proporcionar la cantidad deseada de una lectina, siendo la lectina ConA a la que se añade dicha solución
40 tampón que contiene dicho dextrano y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva, o
- (b) proporcionar la cantidad deseada de una lectina, siendo la lectina ConA, a la que se añade la solución tampón acuosa preparada en la etapa (i) y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva, y posteriormente proporcionar la cantidad deseada de una molécula de unión a lectina, siendo la molécula de unión a lectina dextrano que tiene un peso molecular de 10-100 kDa, a la que se añade dicha solución
45 tampón que contiene dicha ConA y se deja en agitación hasta que se homogeneice y se disuelva.

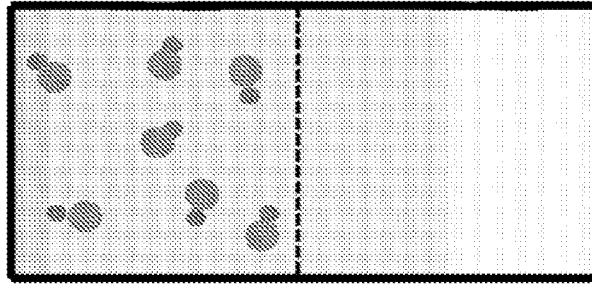


Fig. 1A

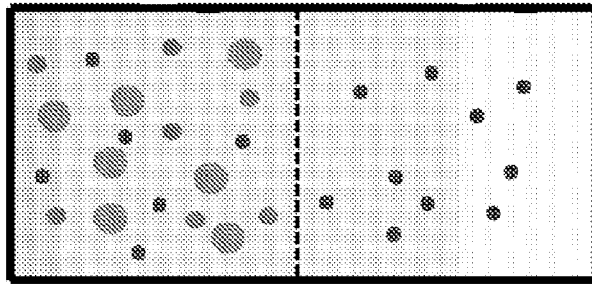
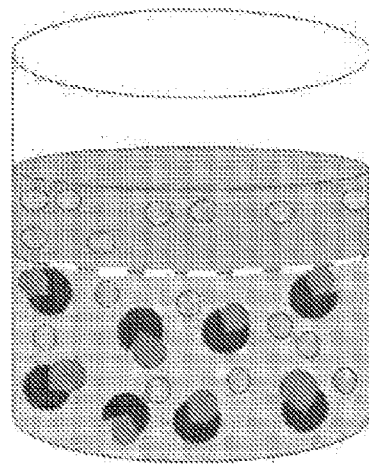


Fig. 1B



-  ConA
-  Dextrano
-  Glucosa

Fig. 1C

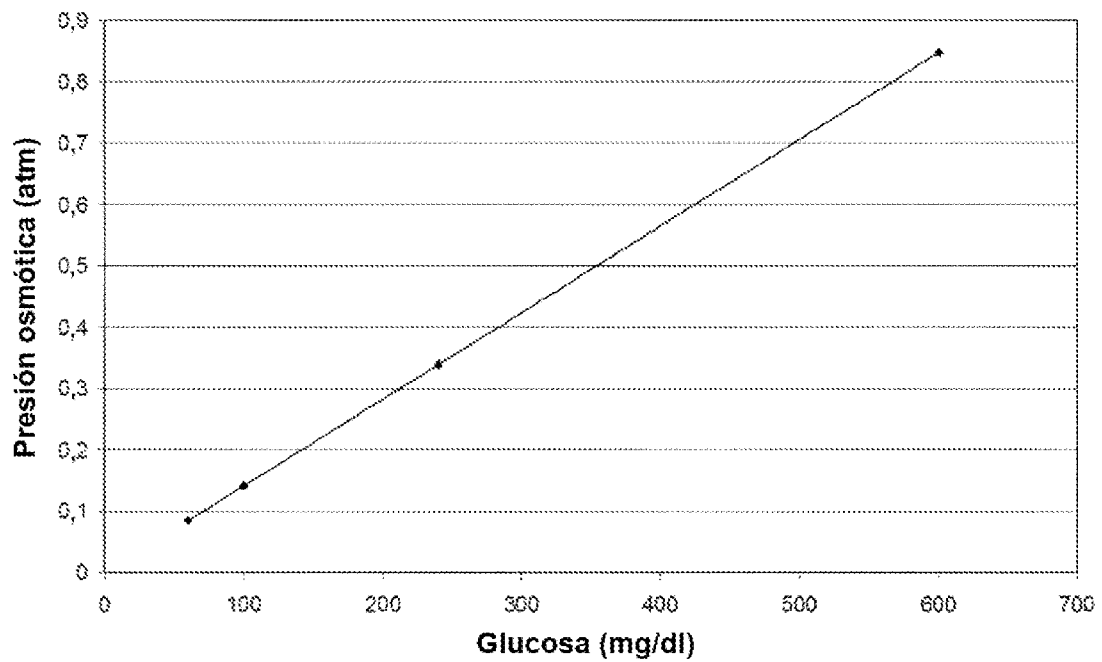


Fig. 1D

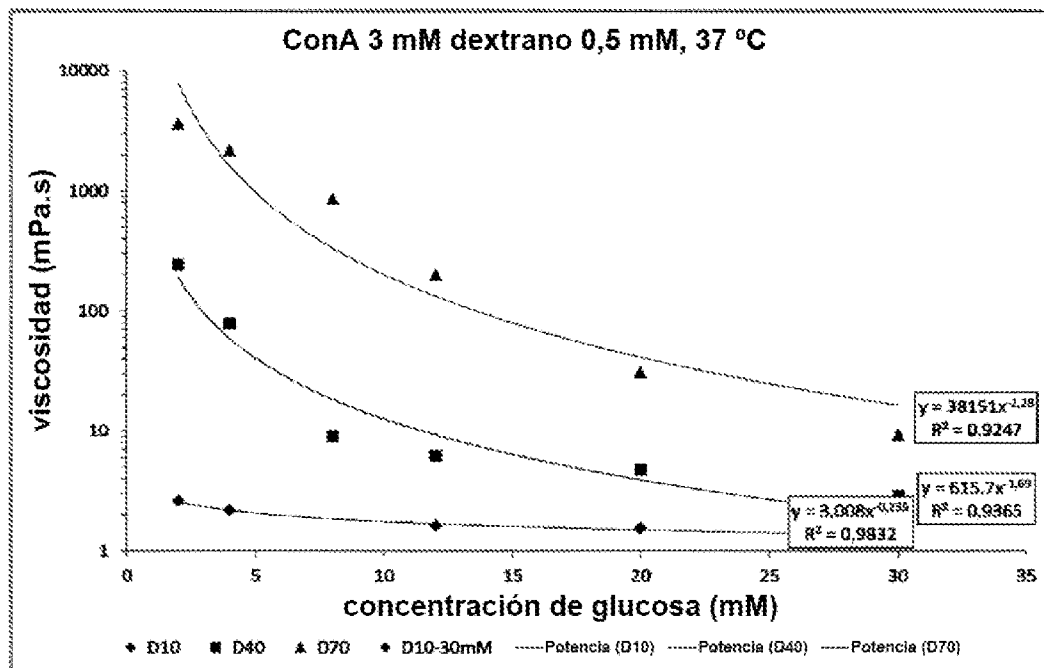


Fig. 2

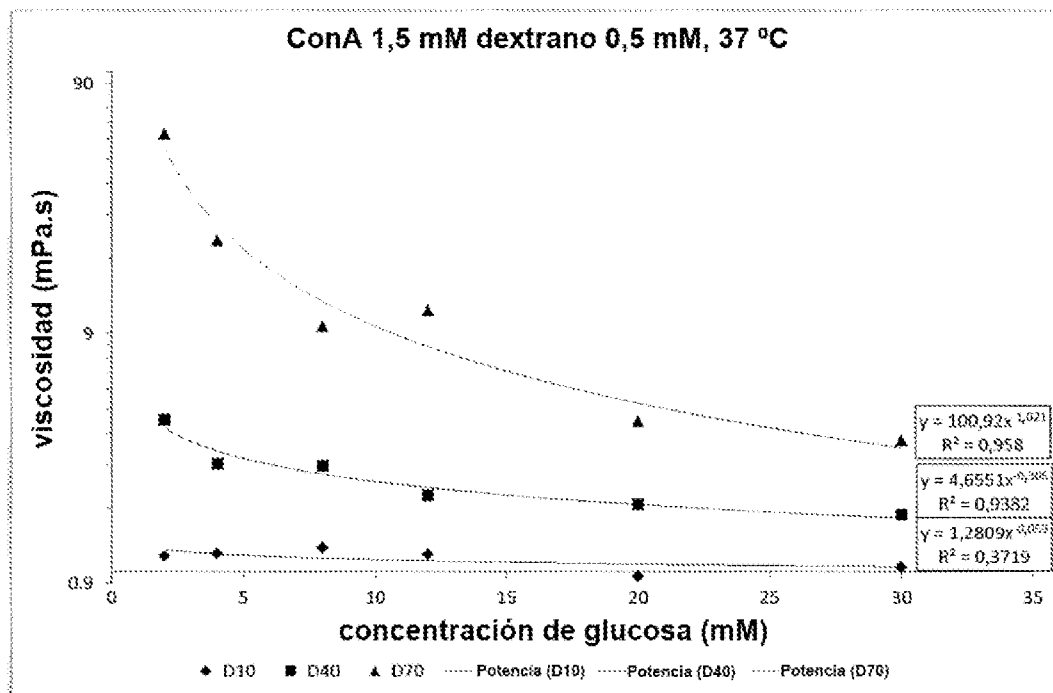


Fig. 3

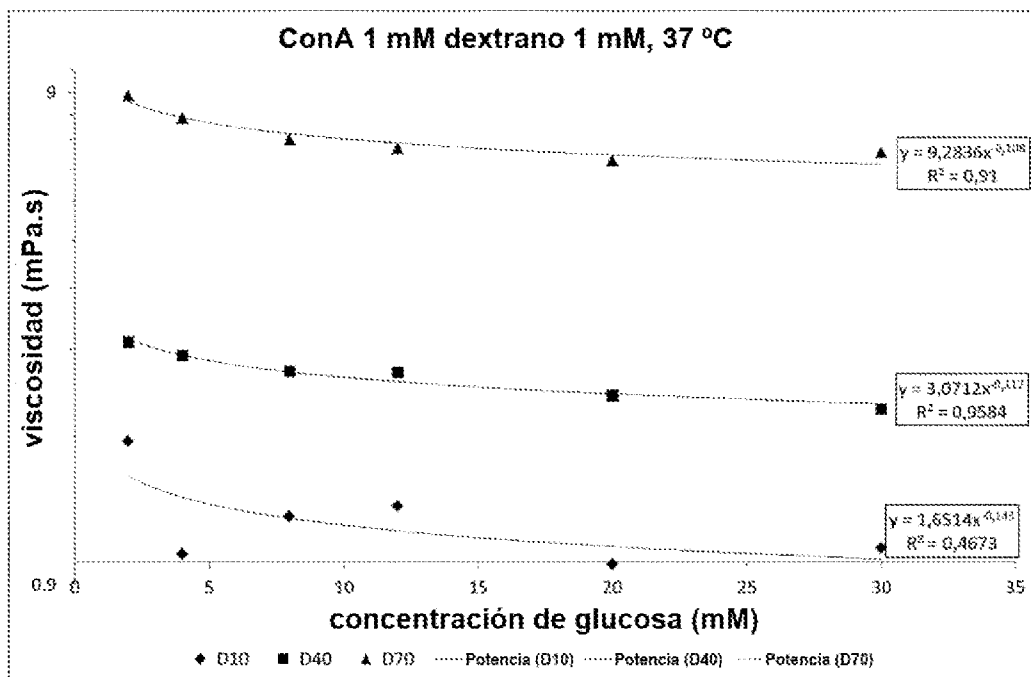


Fig. 4

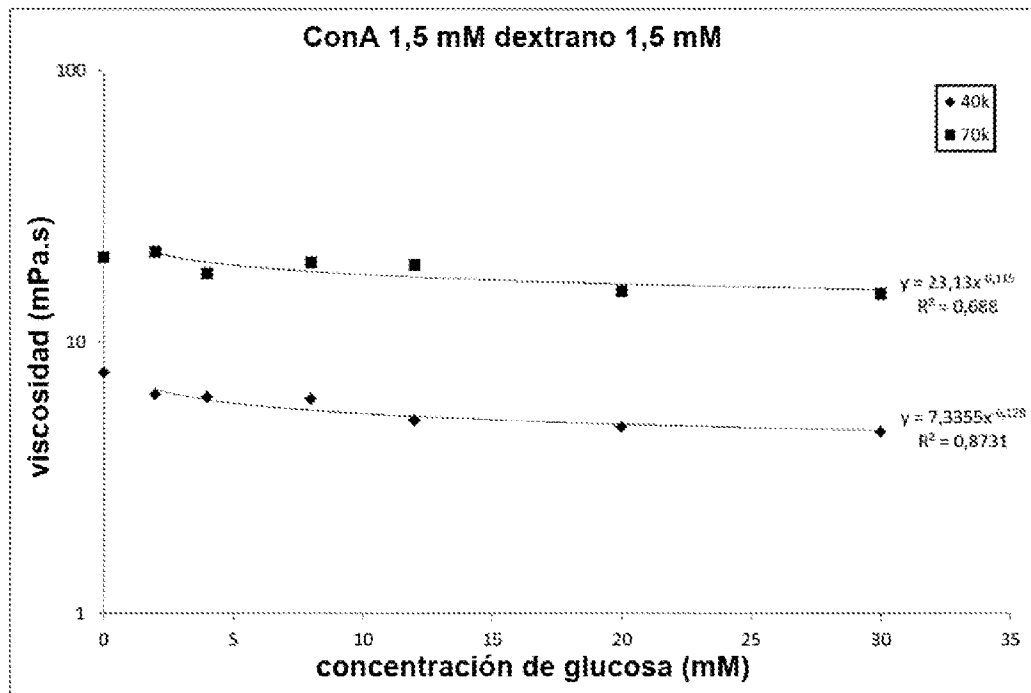


Fig. 5

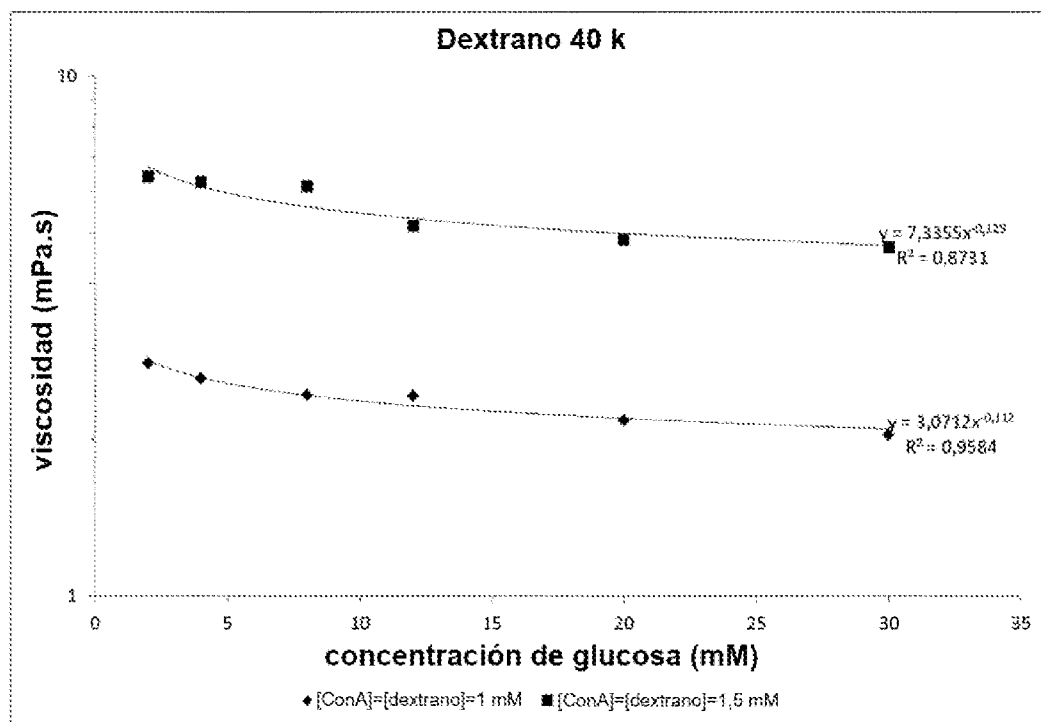


Fig. 6

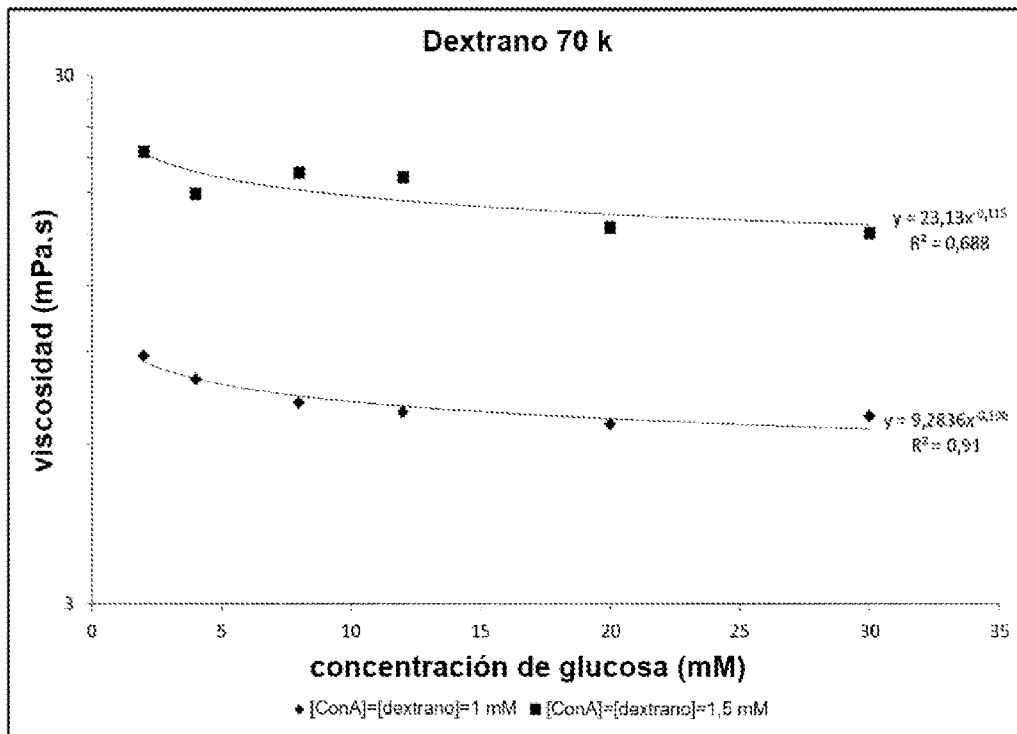


Fig. 7

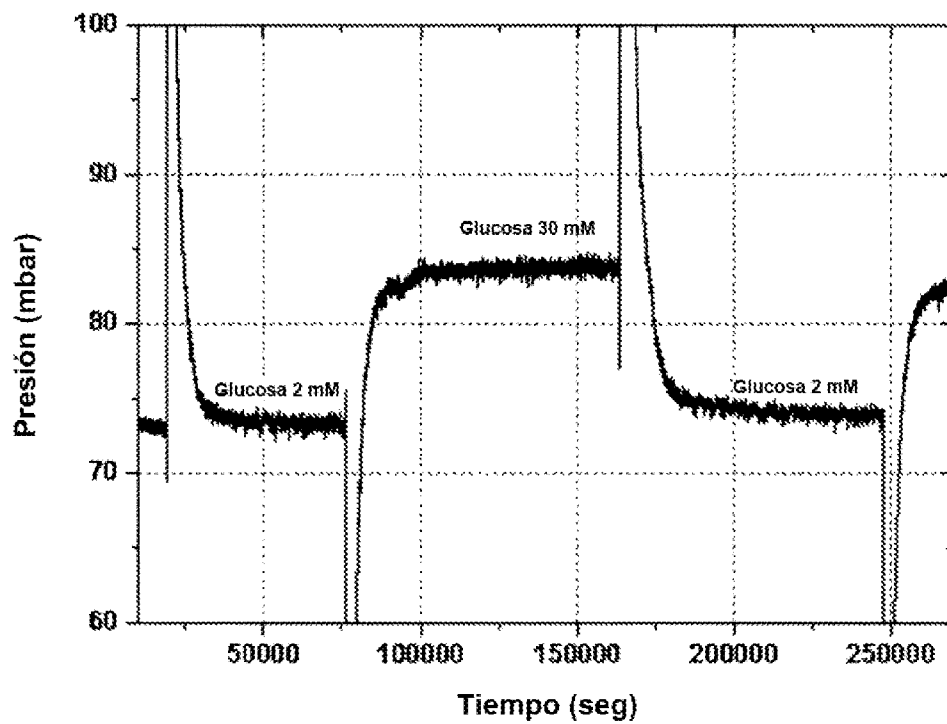


Fig. 8