

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 018**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/66** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2013 PCT/US2013/070775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14081713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2013 E 13856956 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2923207**

54 Título: **Sistema y método para diagnosticar el rendimiento de un sensor utilizando señales ratiométricas independientes del analito**

30 Prioridad:

**20.11.2012 US 201261728488 P**

**14.03.2013 US 201313828601**

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

**13.03.2018**

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)**

**1 Becton Drive**

**Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**KEITH, STEVEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 659 018 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

Sistema y método para diagnosticar el rendimiento de un sensor utilizando señales ratiométricas independientes del analito

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la Invención

La presente invención se refiere a un sistema y a un método para diagnosticar el rendimiento de un sensor. Más particularmente, la presente invención se refiere a un sistema y a un método para diagnosticar el rendimiento de un sensor utilizando señales ratiométricas independientes del analito.

10

Descripción de la técnica relacionada:

Los sensores de glucosa son un elemento esencial en la gestión de la diabetes. En particular, los sensores de glucosa continuos proporcionan numerosas ventajas sobre los sensores de glucosa episódicos o las tiras de prueba de glucosa para los dedos convencionales. Sin embargo, es crítico para el éxito de un sensor de glucosa continuo una determinación o diagnóstico del rendimiento del sensor. Los sensores de glucosa continuos existentes se vuelven menos sensibles con el tiempo y finalmente fallan y necesitan ser reemplazados. Como tal, es importante monitorizar el rendimiento de un sensor de glucosa continuo, y sustituir el sensor cuando el rendimiento cae por debajo de un nivel aceptable.

15

20

25

Una dificultad con los sistemas de medición de fluorescencia se debe a la naturaleza inherentemente ruidosa de las señales de intensidad. La detección ratiométrica aprovecha una propiedad muy estable de los espectros de emisión de colorantes. Es decir, la relación de diferentes bandas dentro de los espectros es relativamente insensible a cambios en la intensidad global de los espectros. Las fluctuaciones en la potencia de emisión o en la eficiencia óptica del sistema, dentro de los límites, no afectan a la relación medida entre diferentes bandas de frecuencias, siempre que las bandas elegidas estén razonablemente libres de ruido. Los sensores de glucosa continuos basados en una proteína de unión a la glucosa marcada de manera fluorescente (GBP) pueden aprovechar la detección ratiométrica para obtener lecturas más precisas.

30

35

40

Como se muestra, por ejemplo, en la figura 1, la respuesta de frecuencia para un sensor de glucosa continuo basado en GBP etiquetado incluye un punto isobéptico 100. Es decir, hay una frecuencia para la que la respuesta de intensidad es independiente de la concentración del analito objetivo. El punto isobéptico se ha utilizado para medir el rendimiento del sensor independientemente de la concentración del analito. Sin embargo, la señal del punto isobéptico no tiene utilidad en la medición de la concentración del analito, ya que por su naturaleza no cambia en respuesta a la concentración del analito. En sistemas ratiométricos existentes, se deben medir diferentes bandas de frecuencia para determinar la concentración de glucosa, ya que la intensidad en el punto isobéptico no se correlaciona con la concentración de glucosa. Cuando ninguna de las bandas de frecuencia medidas está estrechamente centrada en el punto isobéptico de los espectros, el diagnóstico de las perturbaciones de intensidad es más difícil debido a que ambas bandas de intensidad medidas cambian en respuesta a los cambios de concentración del analito y a los cambios del sistema. Sería beneficioso poder extraer una señal libre de ruido que corresponda a la concentración de analito solamente y una señal independiente del analito que corresponde al estado del sistema solamente, sin que sea necesario medir el punto isobéptico además de al menos otras dos frecuencias. Dicha combinación no se ha demostrado previamente con un sistema de detección de GBP continuo.

45

50

El documento US 5.094.958 divulga un sensor químico óptico de fibra para la medición de oxígeno y un método en el que el racionamiento de las intensidades a 390 nm y 480 nm (correspondiente a un GIIC) en cualquier concentración de oxígeno da el rendimiento del sensor independiente de muchas variables que afectan al rendimiento FOCS.

55

El documento US 2011/010586 divulga un sensor óptico para detectar glucosa en sangre. El sensor comprende un sistema indicador químico dispuesto dentro de un espacio entre el extremo distal de una fibra óptica y una porción de punta atraumática, en el que la fibra óptica y la porción de punta atraumática están acopladas mediante un elemento de acoplamiento, tal como una varilla o hipotubo o jaula que atraviesa el espacio. El sensor comprende además unos medios para generar y detectar una señal de referencia óptica no relacionada con la glucosa en sangre, de manera que se habilita la corrección ratiométrica de las mediciones de glucosa en sangre para artefactos en el sistema óptico.

60

Por consiguiente, existe la necesidad de un sistema y un método para diagnosticar el rendimiento de un sensor utilizando señales ratiométricas independientes del analito. En un sistema de este tipo, preferiblemente pueden usarse las mismas señales para la medición del analito y para el diagnóstico independiente del analito, minimizando así la complejidad del sistema y el número de mediciones que deben tomarse. Preferiblemente, se selecciona un par de señal para optimizar la mejor señal analítica posible, tal como para la relación de señal a ruido más alta sobre el intervalo analítico esperado, al mismo tiempo que proporciona una capacidad de diagnóstico del sensor.

65

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para realizar una prueba de diagnóstico en un sensor de analito. El método incluye la introducción de proteína de unión a glucosa suspendida en matriz (GBP) marcada con un colorante sensible al medio ambiente en un entorno de analito. El colorante fluoresce a una intensidad relacionada con una concentración de la concentración de analito en el medio ambiente. Se mide una primera intensidad fluorescente en un primer componente de frecuencia que es más alto que una frecuencia isobéctica del colorante. Una segunda intensidad fluorescente se mide en un segundo componente de frecuencia que es inferior a la frecuencia isobéctica. Se determina un valor de coeficiente de intensidad independiente de glucosa (GIIC) basado en la primera y segunda intensidades fluorescentes. Finalmente, se determina un rendimiento del sensor de analito en base al valor GIIC.

De acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un sistema para realizar una prueba de diagnóstico en un sensor de analito. El sistema comprende un elemento de proteína de unión a la glucosa (GBP) suspendido en una matriz fluorescente marcado con colorante, adaptado para su introducción en un entorno de analito. El sistema incluye además un dispositivo de medición de intensidad de fluorescencia para medir la intensidad de fluorescencia en las respectivas primera y segunda frecuencias, siendo la primera frecuencia más alta que la frecuencia isobéctica del colorante, y la segunda frecuencia siendo inferior a la frecuencia isobéctica. El sistema incluye un procesador para determinar un valor de coeficiente de intensidad independiente de glucosa (GIIC) basado en la primera y segunda intensidades de fluorescencia medidas y para determinar un rendimiento del sensor de analito en base al valor GIIC determinado. Finalmente, el sistema incluye un dispositivo de salida para proporcionar una salida indicativa del rendimiento determinado.

Realizaciones de la invención son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS DE LOS DIBUJOS

La patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Copias de esta publicación de patente o de solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán mediante la Oficina a petición y bajo pago de la tasa necesaria.

Estas y otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la descripción detallada de las realizaciones de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una ilustración de bandas espectrales de una GBP ejemplar marcada con colorante de acrilodan en un intervalo de concentraciones de glucosa;

La figura 2 es una ilustración de diversos parámetros de calibración para espectros de acrilodan/GBP; La figura 3 es una ilustración de bandas espectrales de acrilodan/GBP ejemplares en solución;

La figura 4 ilustra ejemplos de glucosa real frente a mediciones de bandas verdes y azules usando un sensor de acrilodan/GBP de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 5 ilustra valores de intensidad independientes de la glucosa derivados de mediciones de bandas azules y verdes de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención;

La figura 6 ilustra mediciones de glucosa reales y calculadas por el sensor a lo largo del tiempo, así como mediciones de bandas azules y verdes y una intensidad independiente de glucosa derivada de las bandas azules y verdes en un sensor de acrilodan/GBP continuo funcionando correctamente de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención; y

La figura 7 ilustra mediciones de glucosa real y calculadas por el sensor a lo largo del tiempo, así como mediciones de bandas azules y verdes y una intensidad independiente de glucosa derivada de las bandas azules y verdes en un sensor de acrilodan/GBP continuo que funciona incorrectamente de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención.

A lo largo de los dibujos, se entenderá que los números de referencia similares se refieren a características y estructuras similares.

DESCRIPCION DETALLADA DE REALIZACIONES DE EJEMPLO

Como se describirá con más detalle a continuación, se ha descubierto que puede obtenerse una señal independiente de analito a partir de mediciones tomadas a frecuencias alejadas de la frecuencia isobéctica. Es decir, las mismas dos mediciones correlacionadas de analito utilizadas para la determinación ratiométrica de la concentración de analito también pueden usarse ventajosamente para derivar y medir un rendimiento del sensor independiente del analito que puede usarse para realizar diagnósticos en el sensor. En cualquier sistema de detección de fluorescencia ratiométrica (tal como el sensor de glucosa BD GBP), donde las relaciones espectrales cambian en respuesta a la concentración de analito, incluso si las bandas de intensidad no contienen el punto isobéctico del sistema, puede calcularse un valor de intensidad que es insensible a la concentración de analito. Esta concentración independiente de glucosa tiene un potencial de diagnóstico que las bandas de intensidad individualmente no tienen.

Para cualesquiera dos bandas dentro del espectro de emisión de un colorante fluorescente tal como acrilodan, se puede encontrar una relación que es una función de la concentración de glucosa:

$$R = \{R0 + Rinf([G]/KD)\} / (1 + [G]/KD) \quad (1)$$

donde

- [G] = concentración de glucosa
- R = relación a una concentración dada de glucosa
- R0 = relación de bandas espectrales a una concentración de glucosa cero
- Rinf = relación de bandas espectrales a una concentración de glucosa (de saturación) infinita
- KD = constante de disociación aparente para el sistema

que puede reescribirse como

$$[G] = KD (R-R0) / (Rinf-R). \quad (2)$$

También es cierto que esta ecuación puede escribirse para cualquier banda espectral (o para intensidad de pico, o centro de masa espectral, entre otras propiedades). Específicamente, esta ecuación puede escribirse para cada banda espectral utilizada para construir la señal ratiométrica.

$$[G] = KDb (Fb-Fb0) / (Fbinf-Fb), \quad (3)$$

y

$$[G] = KDg (Fg-Fg0) / (Fginf-Fg), \quad (4)$$

donde Fb y Fg son mediciones de intensidad de los componentes de intensidad "azul" 102 y "verde" 104 (véase la figura 1).

Las ecuaciones equivalentes (3) y (4) proporcionan,

$$KDb (Fb-Fb0) / (Fbinf-Fb) = KDg (Fg-Fg0) / (Fginf-Fg) \quad (5)$$

y reordenar para poner los términos de intensidad variable en el lado izquierdo de la ecuación resulta en:

$$(KDg/KDb -1) * Fb * Fg + Fb * (Fginf - (KDg/KDb) * Fg0) + Fg (Fb0 - (KDg/KDb) * Fbinf) = Fb0 * Fginf - (KDg/KDb) * Fg0 * Fbinf \quad (6)$$

Como puede apreciarse, el lado derecho de la ecuación (6) contiene solo términos que no dependen de la glucosa (Intensidad Independiente de glucosa, o GII). Por consiguiente, el lado izquierdo de la ecuación (6) también debe ser independiente de la glucosa.

$$(KDg/KDb -1) * Fb * Fg + Fb * (Fginf - (KDg/KDb) * Fg0) + Fg (Fb0 - (KDg/KDb) * Fbinf) = GII \quad (7)$$

Usando la notación QF = Finf / F0, llegamos a:

$$(KDg/KDb -1) * Fb * Fg + Fb * Fg0 * (QFg - KDg/KDb) + Fg * Fb0 * (1 - (KDg/KDb) * QFb) = GII \quad (8)$$

Dejando que

$$A = (KDg/KDb -1)$$

$$B = Fg0 * (QFg - KDg/KDb)$$

$$C = Fb0 * (1 - (KDg/KDb) * QFb)$$

llegamos a:

$$A * Fb * Fg + B * Fb + C * Fg = GII \quad (9)$$

o

$$A/C * Fb * Fg + B/C * Fb + Fg = GWC \quad (10)$$

Por lo tanto, definimos

$$w = B/C = (QFg - KDg/KDb) / (KDg/KDb - QFb) * Fg0/Fb0.$$

de manera que la ecuación (10) se convierte en:

$$5 \quad A/C \text{ Fb} * Fg + wFb + Fg = GWC \quad (11)$$

La ecuación (11) se puede normalizar como sigue:

$$10 \quad A/C / (1 + w) * Fb * Fg + (wFb + Fg) / (1 + w) = GD/C / (1 + w) \quad (12)$$

Para el caso en el que KDg/KDb esté cercano a 1, A se vuelve pequeño, de modo que la ecuación (11) se reduce a:

$$(wFb + Fg) / (1 + w) = GII/C / (1 + w) \quad (13)$$

15 En la ecuación (13), la variable "w" puede denominarse coeficiente de intensidad independiente de glucosa (GIIC). En el caso en el que KDg/KDb es cercano a 1, w puede aproximarse como

$$w = (QFg - 1) / (1 - QFb) * Fg0/Fb0 \quad (14)$$

20 Como se describió anteriormente, los sensores basados en fluorescencia son notoriamente sensibles a las variaciones de intensidad debidas a cambios en, por ejemplo, la eficiencia de la trayectoria óptica y el rendimiento cuántico del colorante. Las señales que no responden al analito en cuestión se usan a menudo para proporcionar una referencia para rastrear algunas de estas variaciones de intensidad, siempre que el evento generador de ruido impacte a ambas señales de la misma manera. Por esta razón, se utiliza a menudo detección ratiométrica. Una relación de dos componentes de la salida fluorescente puede estar directamente relacionada con la concentración de analito, y esa relación no se ve explícitamente afectada por los cambios generales en la intensidad fluorescente. Sin embargo, no se ha considerado que la señal ratiométrica contenga información de diagnóstico sobre el sistema, ya que los cambios en la concentración de analito no podrían separarse previamente de los cambios de señal.

30 Sin embargo, en realizaciones de la presente invención, el mismo par de señales utilizado para generar información de concentración de analito puede usarse para generar información de diagnóstico. Además, no se requiere ningún cálculo de la concentración de analito para realizar la determinación diagnóstica.

35 Una realización preferida para la detección de glucosa utiliza los mismos principios generales de diseño considerados para los sensores GBP de glucosa existentes. Para ejemplos de sensores GBP, véanse las solicitudes de patente internacional WO 2006/044973, publicada el 27 de abril de 2006, WO 2007/124464, publicada el 1 de noviembre de 2007, y WO 2008/131360, publicada el 30 de octubre de 2008. Tales sensores son preferiblemente de sensores de pequeño tamaño y de larga duración, con fuertes características de señal a ruido y bajo consumo de energía. El uso de las señales para proporcionar información de diagnóstico ventajosamente no cambia las características físicas generales del sistema de sensores. Los cálculos adicionales requeridos para derivar la señal independiente del analito pueden realizarse dentro de la misma arquitectura de cálculo utilizada para procesar la señal del sensor en bruto y calcular la concentración de analito.

45 Un ejemplo de realización de la invención se dirige al sensor de glucosa continuo de proteína de unión a la glucosa (GBP). Este sensor utiliza una combinación proteína-colorante específica para generar una señal fluorescente, y mide la salida en dos bandas de longitud de onda específica. Una banda de longitud de onda es preferiblemente una frecuencia más alta que el punto isosbético, y la otra longitud de onda es preferiblemente una frecuencia inferior al punto isosbético. Preferiblemente, las bandas de frecuencias altas y bajas se seleccionan para equilibrar la separación máxima de la frecuencia isosbética con la relación señal a ruido máxima dentro del intervalo de concentración de analito esperado relevante. En consecuencia, las frecuencias altas y bajas se seleccionan para estar lejos de la frecuencia isosbética, sin estar demasiado lejos, ya que la señal correlativa del analito disminuye en los extremos del espectro.

55 Como se apreciará, se pueden hacer variaciones en las combinaciones proteína-colorante mientras se mantiene la salida ratiométrica general, y estas proteínas de unión se pueden dirigir a analitos distintos de la glucosa. Véase, por ejemplo, R.M. de Lorimier, J. J. Smith y col., "Construction of a Fluorescent Biosensor Family", Protein Sci 11 (11) 2655-2675 (2002), para una lista de proteínas de unión y combinaciones de colorantes.

60 Este método puede aplicarse también a sistemas basados en transferencia de energía resonante de Forster (FRET). En este caso, las dos partes de señal se originan a partir de dos colorantes diferentes situados en estrecha proximidad.

65 La señal fluorescente generada por el colorante en, por ejemplo, un sensor de glucosa GBP es un espectro que cubre un intervalo de longitudes de onda. La señal en cada longitud de onda se ve afectada por los mismos fenómenos. Es decir, concentración de analito y concentración de colorante. En un sistema de detección ratiométrico, aunque la fuente de cambios de intensidad a lo largo del espectro es la misma, el impacto en diferentes

partes del espectro de emisión es diferente. Estos cambios se pueden caracterizar para todo el espectro en un entorno estable, tal como durante la calibración en fábrica de un sensor. Por lo tanto, las relaciones matemáticas que describen el impacto del analito pueden determinarse para todas las partes del espectro. En un sistema de detección ratiométrica de acuerdo con una realización de la invención, el par de relaciones que describen las señales de fluorescencia pueden combinarse ventajosamente para proporcionar una medida de la concentración de analito y una medida de intensidad de señal media que no cambia con la concentración de analito.

Ejemplo 1: Espectros de solución (GBP-Acrlilodan)

Se tomaron espectros de GBP-acrilodan en disolución (medidas triplicadas a 0, 2,5, 5, 10, 20, 30 mM, FP001 Vial 1 Curva de titulación 061008, figura 1). Se restaron espectros de soluciones de tampón PBS sin proteína, colorante o glucosa (fondo) de todas las curvas. Las curvas de calibración se determinaron en cada longitud de onda para calcular una curva de respuesta de glucosa infinita y para determinar cómo cambiaron los parámetros de calibración en función de la longitud de onda (figura 2). R0 es precisamente la curva media de respuesta cero. Qx (respuesta a glucosa infinita/respuesta a cero) varió de acuerdo con una curva logística de 4 parámetros a través de la región de longitud de onda examinada. Como era de esperar, el punto donde  $Q = I$  es 523 nm, cerca del punto isosbético observado visualmente. KD es aproximadamente constante a través del espectro, aunque hay considerablemente más variabilidad cuando las longitudes de onda son mayores que el punto isosbético, debido más probablemente al pequeño intervalo dinámico y, por lo tanto, a la pequeña relación señal a ruido. Para un conjunto de tamaños de ventana de longitud de onda razonables, los KD no son significativamente diferentes a ambos lados de 523 nm ( $p > 0,1$ , ensayo de Student). Teniendo en cuenta un único par de bandas de longitud de onda centradas en 460 y 560 nm, se calculó una intensidad media según la ecuación (12) (figura 3). Obsérvese que la intensidad independiente de la glucosa es estable, mientras que las intensidades de bandas azules y verdes varían considerablemente entre el intervalo de glucosa. Para estos datos basados en la solución, el factor de corrección GIIC = 0,12 y KDg/KDb = 0,96.

Para el intervalo dinámico máximo, una relación derivada de las bandas separadas lo más ampliamente posible proporcionará el intervalo más grande (es decir,  $QR = QFg / QFb$ , y QFg máximo y QFb mínimo se obtienen cerca de los bordes del espectro, véase el gráfico central en la figura 2). Sin embargo, desde un punto de vista general del rendimiento del sistema, el intervalo dinámico debe equilibrarse contra la pérdida de relación de señal a ruido a medida que las intensidades caen cerca de los bordes del espectro. Desde un punto de vista diagnóstico, una banda de longitud de onda centrada en el punto isosbético podría proporcionar información de diagnóstico, pero no información de concentración de analito. El uso de dos bandas de longitud de onda para generar una intensidad independiente del analito permite que la elección de la banda de longitud de onda sea accionada por los objetivos de rendimiento del sistema, a la vez que proporciona una capacidad de diagnóstico.

Ejemplo 2: Configuración de laboratorio (sensor de 25 ga-acrilodan)

Se analizaron las intensidades de los sensores a partir de un experimento de laboratorio de 3 días. Los sensores de PEG/GBP-acrilodan se expusieron a un perfil de glucosa continuamente variable a 34 °C durante 3 días. El perfil incluía dos escalas de calibración antes y después de tres días de glucosa variable (figura 4). La primera escala de calibración se utilizó para calcular los parámetros de calibración para cada banda de longitud de onda. Se calculó la intensidad independiente de la glucosa según la ecuación (12). La disminución de la intensidad debido al fotoblanqueo durante las escalas de calibración causa una mala estimación de los parámetros de calibración. Para corregir esto, se usó un modelo de disminución de intensidad [ $I = aN + b + c \cdot \exp(-N/\tau)$ , N = número de exposición] para ajustar las intensidades medidas. Los parámetros de calibración de la ecuación de unión se recalcularon para la primera escala, y se calculó una intensidad independiente de la glucosa, como se muestra en las líneas continuas en la figura 5. Como se puede observar en la figura 5, aunque permanecen fluctuaciones menores, la curva de intensidad resultante es muy estable frente a las grandes excursiones de concentración de glucosa. La solución de la ecuación (13) (término de producto de intensidad que cae) produce una curva similar (línea continua fina en la figura 5), pero con ligeras variaciones de intensidad durante las dos primeras escalas de calibración. Como una medida de variabilidad, se calculó el coeficiente de variación (estándar/media) para cada curva. Las intensidades azul y verde tuvieron un CV de 29 y 14 % respectivamente, incluso después de la corrección para la disminución a largo plazo del fotoblanqueo. En contraste, la intensidad independiente de la glucosa tenía un CV de < 1%, lo que también explica el fotoblanqueo a largo plazo. Para este sensor, el factor de corrección GIIC = 0,516 y KDg/KDb = 0,91.

Como se apreciará, la intensidad independiente de la glucosa también proporciona una señal muy suave a partir de la cual se pueden evaluar efectos a largo plazo como el fotoblanqueo.

Ejemplo 3: Prueba de factibilidad (sensor GBP-acrilodan de 31 ga)

Para este ejemplo se utilizó la salida desde dos sensores de mariposa de 31 ga, colocados en tejido ID y SC durante un ensayo de factibilidad. Debido a las pobres estimaciones de KD a partir de calibraciones de 3 puntos, se asumieron valores GIIC de 0,5. Las intensidades fueron normalizadas por el estándar óptico en uso durante este ensayo antes de realizarse los cálculos. En el primer sensor (302 A-ID, figura 6) la disminución de la intensidad es estable durante toda la prueba. Debe tenerse en cuenta que, aunque las estimaciones de glucosa tienen un pequeño intervalo dinámico en relación con los valores reales, las estimaciones del sensor son estables. En el segundo sensor (301 B-SC, figura 7) la disminución de intensidad acelera notablemente después de 550 minutos, y

sigue una sobreestimación marcada de la glucosa. Debido a la excursión de glucosa, las intensidades azules y verdes se mueven en direcciones opuestas a los 500 minutos. Como puede apreciarse, la intensidad independiente de glucosa permite ventajosamente la detección de una disminución acelerada, incluso cuando la glucosa está cambiando.

5 Como puede verse, el uso de relaciones de intensidad a partir de firmas de fluorescencia proporciona un sistema de medición de analito robusto. Usando la misma información de intensidad, puede derivarse una señal independiente del analito, lo que permite separar los cambios de salida del sensor en los causados por el cambio de analito y los causados por otros factores. La generación de una intensidad independiente de glucosa se ha demostrado para  
10 aplicaciones in vitro e in vivo de un sensor de glucosa GBP.

Un método de ejemplo de acuerdo con una realización de la invención no se describirá en conexión con la figura 8. En la etapa S100, se introduce una proteína de unión al analito suspendida en la matriz, tal como una proteína de unión a la glucosa (GBP). La proteína de unión se marca con un colorante que fluoresce con un espectro de  
15 intensidad relacionado con una concentración de la concentración de analito en el entorno. Una fuente de radiación electromagnética se dirige a la GBP en la etapa S 102, y la radiación provoca la fluorescencia de la GBP. En la etapa S 104, se mide una primera intensidad de fluorescencia en un primer componente de frecuencia. El primer componente de frecuencia es preferiblemente mayor que la frecuencia isosbética del colorante (intervalo verde). En la etapa S 106, se mide una segunda intensidad de fluorescencia en un segundo componente de frecuencia. El  
20 segundo componente de frecuencia es preferiblemente inferior a la frecuencia isosbética del colorante (intervalo azul). En la etapa S108, se determina un valor de GIIC basado en la primera y segunda intensidades de fluorescencia medidas. En la etapa S 110, se diagnostica el rendimiento del sensor basándose en el valor de GGIC determinado.

Un sistema de ejemplo de acuerdo con una realización de la presente invención se describirá ahora en conexión con la figura 9. El sistema 900 incluye un cuerpo principal 902 que incluye un sistema óptico y un ordenador, microprocesador o cualquier otro procesador 903 adecuado. Un conducto óptico 904, tal como una fibra óptica, conecta el cuerpo principal 902 con una punta de detección 905. La punta de detección 905 incluye un elemento de  
25 detección 906, tal como GBP suspendida en la matriz. La GBP suspendida en la matriz es preferiblemente pequeña y puede introducirse en un entorno de analito, tal como tejido subcutáneo o intradérmico, a través de un conducto rígido o semirrígido, tal como una aguja o cánula.

El sistema óptico preferiblemente incluye una fuente de excitación 907 para generar luz que se dirige en el conducto óptico 904 y en el elemento de detección 906. El sistema óptico incluye, además, preferiblemente, un primer y un  
35 segundo detectores 908, 909 para detectar la intensidad de las señales de fluorescencia recibidas desde el elemento de detección 906 a través del conducto óptico 904. El primer detector 908 detecta preferiblemente la intensidad de fluorescencia a una primera frecuencia que es más alta que el punto isosbético del colorante con el que se etiqueta la GBP. El segundo detector 909 detecta preferiblemente intensidad de fluorescencia a una segunda frecuencia que es inferior al punto isosbético del colorante. El procesador 903 controla preferiblemente la operación  
40 del sistema, incluyendo la alimentación de la fuente de excitación. El procesador 903 también recibe las mediciones de intensidad detectadas desde los detectores 908, 909 y determina un valor de GIIC basado en las intensidades medidas. El procesador determina además un rendimiento del sensor basado en el valor de GIIC determinado. El procesador está conectado además a un dispositivo de salida 910, y puede controlar el dispositivo de salida 910 para proporcionar una salida indicativa del rendimiento determinado. Como un ejemplo, el dispositivo de salida 910  
45 puede proporcionar una alerta audible del procesador 903, que determina que el rendimiento del sensor ha disminuido más allá de un umbral predeterminado.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para realizar una prueba de diagnóstico en un sensor de analito, que comprende las etapas de:

- 5 introducir una proteína de unión de analito suspendida en una matriz en un entorno de analito, estando dicha proteína de unión marcada con un colorante fluorescente con un espectro de intensidad relacionado con una concentración de dicha concentración de analito en dicho entorno;  
 10 medir una primera intensidad fluorescente en un primer componente de frecuencia que es superior a una frecuencia isosbética del colorante;  
 15 medir una segunda intensidad fluorescente en un segundo componente de frecuencia que es inferior a la frecuencia isosbética;  
 determinar un valor de coeficiente de intensidad independiente de glucosa (GIIC) basado en la primera y segunda intensidades fluorescentes;  
 diagnosticar un rendimiento de dicho detector de analito basado en dicha determinación,  
 caracterizado por que una relación entre el primer componente de frecuencia y el segundo componente de frecuencia para el colorante se define por:

$$R = (R_0 + R_{inf}([G]/KD)) / (1 + [G]/KD)$$

20 donde

[G] es la concentración de analito;  
 R es la relación a una concentración de analito dada;  
 R<sub>0</sub> es la relación de bandas espectrales a una concentración de analito cero;  
 25 R<sub>inf</sub> es la relación de bandas espectrales a una concentración de analito infinita (saturante); y  
 KD es una constante de disociación aparente para el sistema, preferiblemente en el que el analito es glucosa, y [G] es la concentración de glucosa, y  
 la intensidad independiente de glucosa se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$30 \quad GII = (KD_g / KD_b - 1) * F_b * F_g + F_b * (F_{ginf} - (KD_g / KD_b) * F_{g0}) + F_g (F_{b0} - (KD_g / KD_b) * F_{binf})$$

donde

GII es la intensidad independiente de la glucosa;  
 35 F<sub>b</sub> es la intensidad medida del primer componente de frecuencia;  
 F<sub>g</sub> es la intensidad medida del segundo componente de frecuencia;  
 KD<sub>g</sub> es la constante de disociación determinada cuando se usa solo el segundo componente de frecuencia;  
 40 KD<sub>b</sub> es la constante de disociación determinada cuando se usa solo el primer componente de frecuencia;  
 F<sub>ginf</sub> es la intensidad del segundo componente de frecuencia a la concentración saturada;  
 F<sub>g0</sub> es la intensidad del segundo componente de frecuencia a concentración cero;  
 F<sub>binf</sub> es la intensidad del primer componente de frecuencia a la concentración saturada; y  
 45 F<sub>b0</sub> es la intensidad del primer componente de frecuencia a concentración cero.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína de unión a analito es una proteína de unión a glucosa.

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho analito es glucosa.

50 4. El método de la reivindicación 1, en el que una arquitectura de cálculo que procesa una señal de sensor en bruto también calcula la concentración de analito.

55 5. El método de la reivindicación 1, en el que el primer componente de frecuencia y el segundo componente de frecuencia se seleccionan para estar lejos de la frecuencia isosbética, pero más cercanos que las frecuencias en las que la relación señal a ruido desciende por debajo del 10 % de la relación de señal a ruido máxima.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la primera intensidad fluorescente se genera mediante un primer colorante y la segunda intensidad fluorescente se genera mediante un segundo colorante.

60 7. Un sistema para realizar una prueba de diagnóstico en un sensor de analito, que comprende:

un elemento de proteína de unión de analito suspendido en una matriz adaptado para su introducción en un entorno de analito;  
 un dispositivo de medición de intensidad de fluorescencia para medir la intensidad de fluorescencia en las  
 65 respectivas primera y segunda frecuencias, siendo la primera frecuencia más alta que la frecuencia isosbética del colorante, y la segunda frecuencia siendo inferior a la frecuencia isosbética del colorante;

un procesador para determinar un valor de coeficiente de intensidad independiente de glucosa (GIIC) basado en la primera y segunda intensidades de fluorescencia medidas y para determinar un rendimiento del sensor de analito en base al valor GIIC determinado; y  
 un dispositivo de salida configurado para proporcionar una salida indicativa del rendimiento determinado, caracterizado por que una relación entre el primer componente de frecuencia y el segundo componente de frecuencia para el colorante se define por:

$$R = (R_0 + R_{inf}([G]/KD)) / (1 + [G]/KD)$$

donde

[G] es la concentración de analito;  
 R es la relación a una concentración de analito dada;  
 R<sub>0</sub> es la relación de bandas espectrales a una concentración de analito cero;  
 R<sub>inf</sub> es la relación de bandas espectrales a una concentración de analito infinita (saturante); y  
 KD es una constante de disociación aparente para el sistema, preferiblemente en el que el analito es glucosa, y [G] es la concentración de glucosa, y la intensidad independiente de glucosa se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$GII = (KD_g / KD_b - 1) * F_b * F_g + F_b * (F_{ginf} - (KD_g / KD_b) * F_{g0}) + F_g (F_{b0} - (KD_g / KD_b) * F_{binf})$$

Donde

GII es la intensidad independiente de la glucosa;  
 F<sub>b</sub> es la intensidad medida del primer componente de frecuencia;  
 F<sub>g</sub> es la intensidad medida del segundo componente de frecuencia;  
 KD<sub>g</sub> es la constante de disociación determinada cuando se usa solo el segundo componente de frecuencia;  
 KD<sub>b</sub> es la constante de disociación determinada cuando se usa solo el primer componente de frecuencia;  
 F<sub>ginf</sub> es la intensidad del segundo componente de frecuencia a la concentración saturada;  
 F<sub>g0</sub> es la intensidad del segundo componente de frecuencia a concentración cero;  
 F<sub>binf</sub> es la intensidad del primer componente de frecuencia a la concentración saturada; y  
 F<sub>b0</sub> es la intensidad del primer componente de frecuencia a concentración cero.

8. El sistema de la reivindicación 7, en el que la proteína de unión a analito es una proteína de unión a glucosa.

9. El sistema de la reivindicación 7 o 8, en el que dicho analito es glucosa.

10. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el procesador procesa señales de sensor en bruto y también calcula la concentración de analito.

11. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el primer componente de frecuencia y el segundo componente de frecuencia se seleccionan para estar lejos de la frecuencia isosbética, pero más cercanos que las frecuencias en las que la relación señal a ruido desciende por debajo del 10 % de la relación de señal a ruido máxima.

12. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la primera intensidad fluorescente se genera mediante un primer colorante y la segunda intensidad fluorescente se genera mediante un segundo colorante.

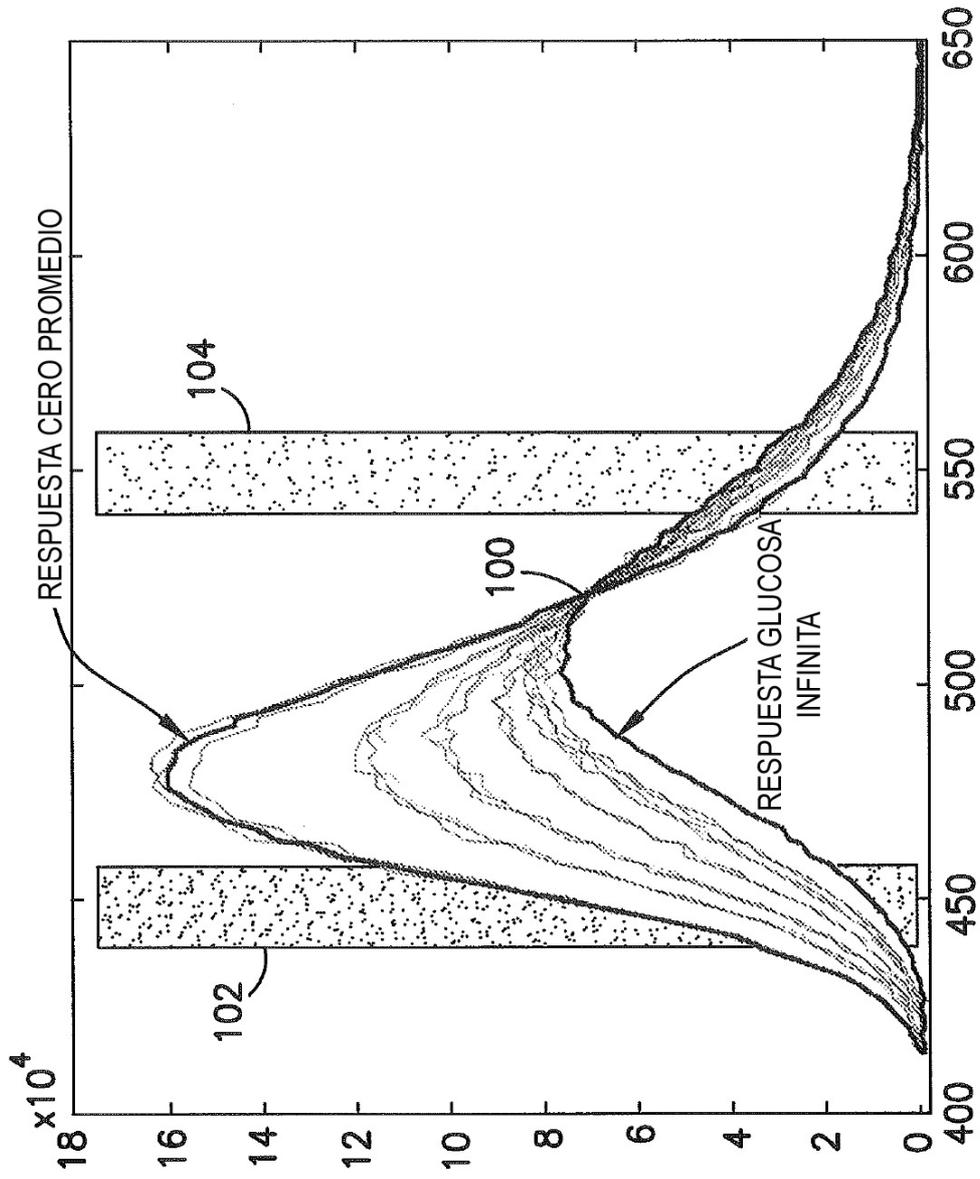


FIG.1

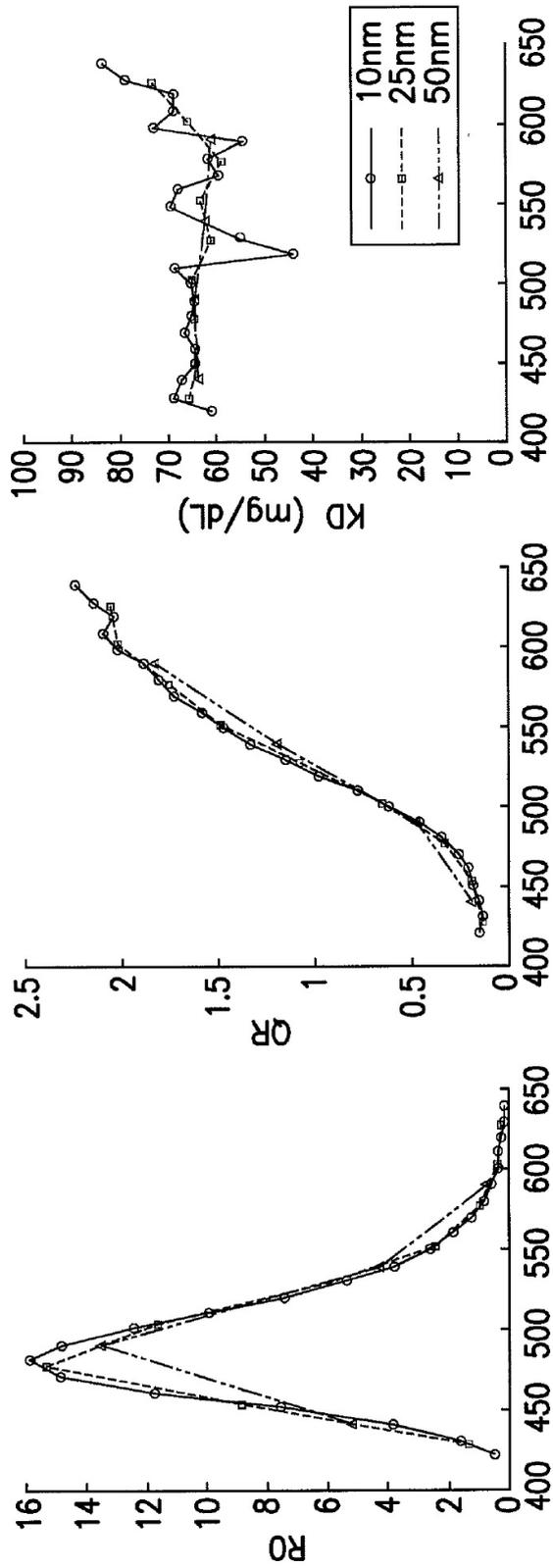


FIG.2

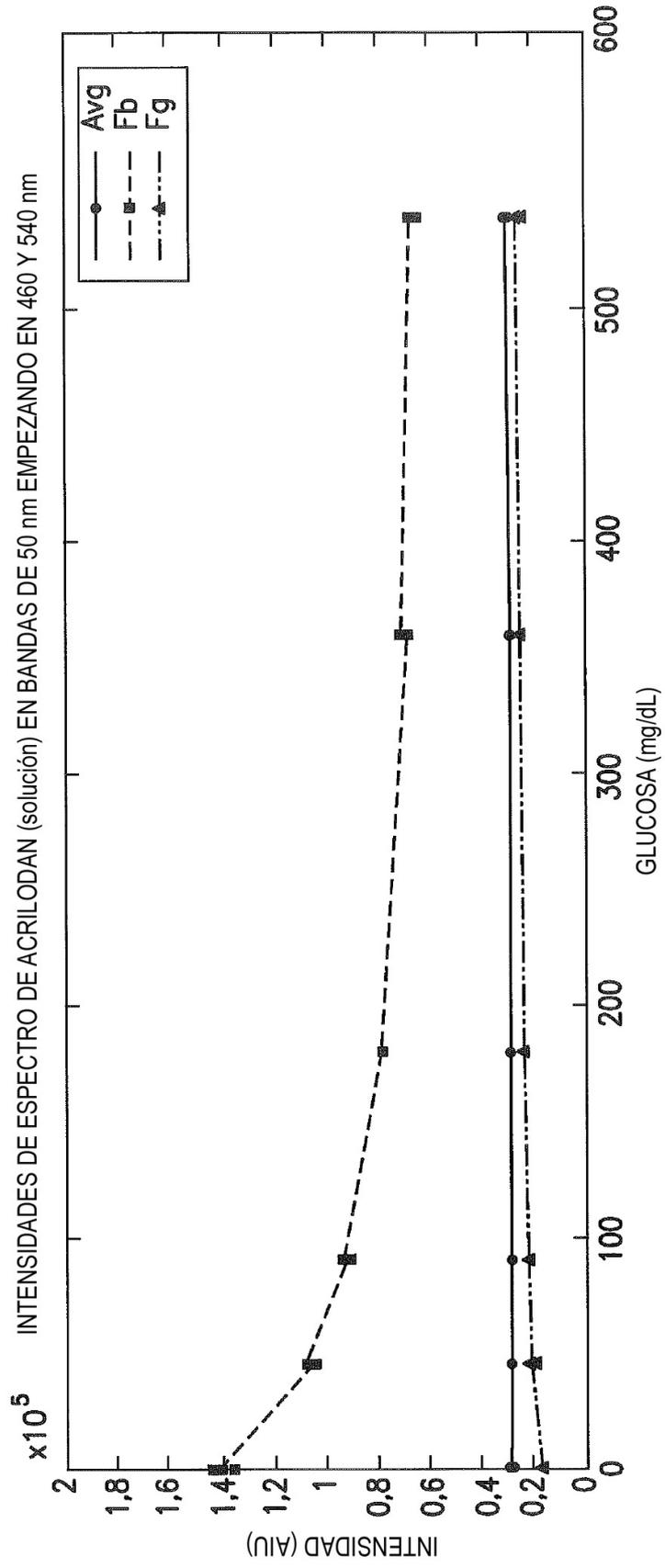
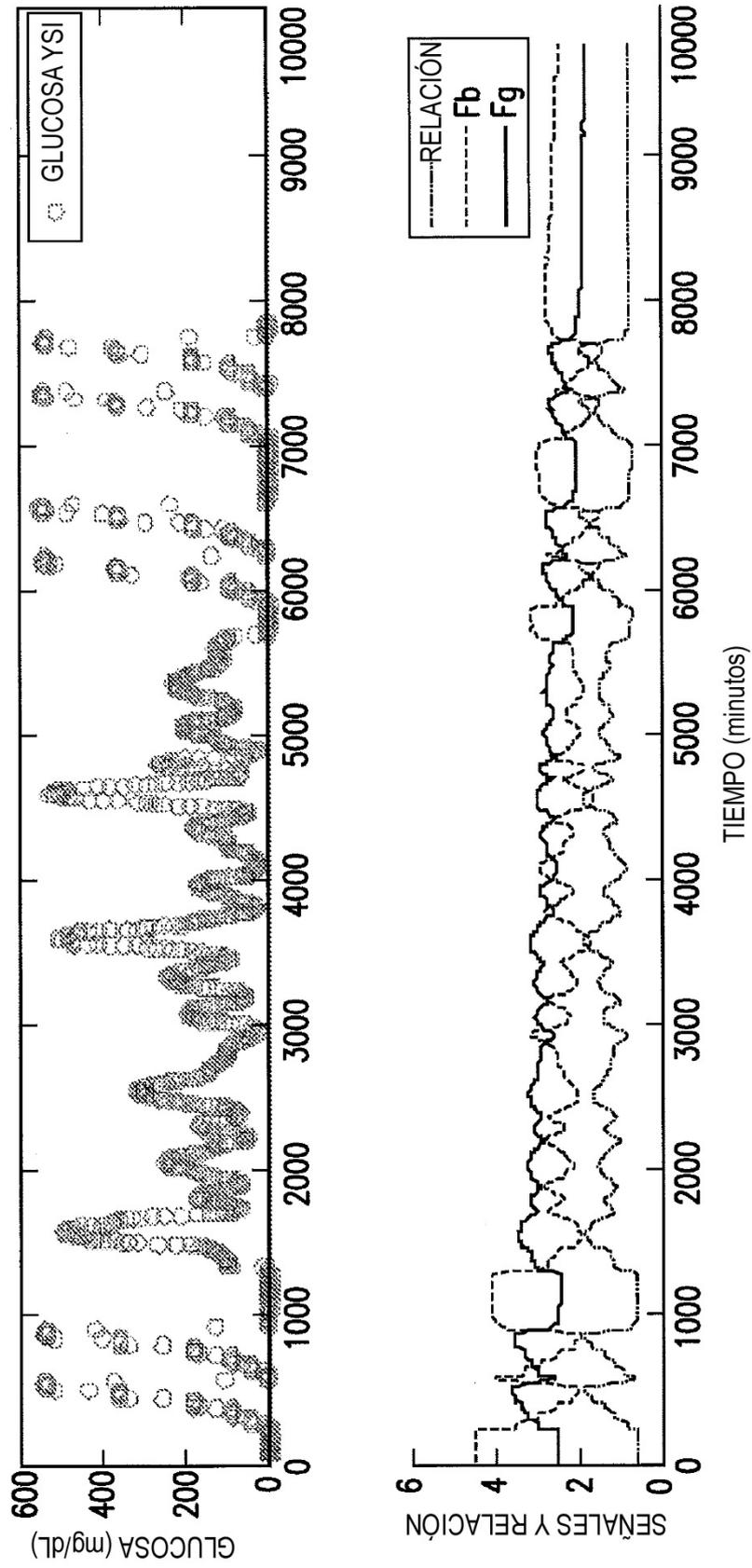
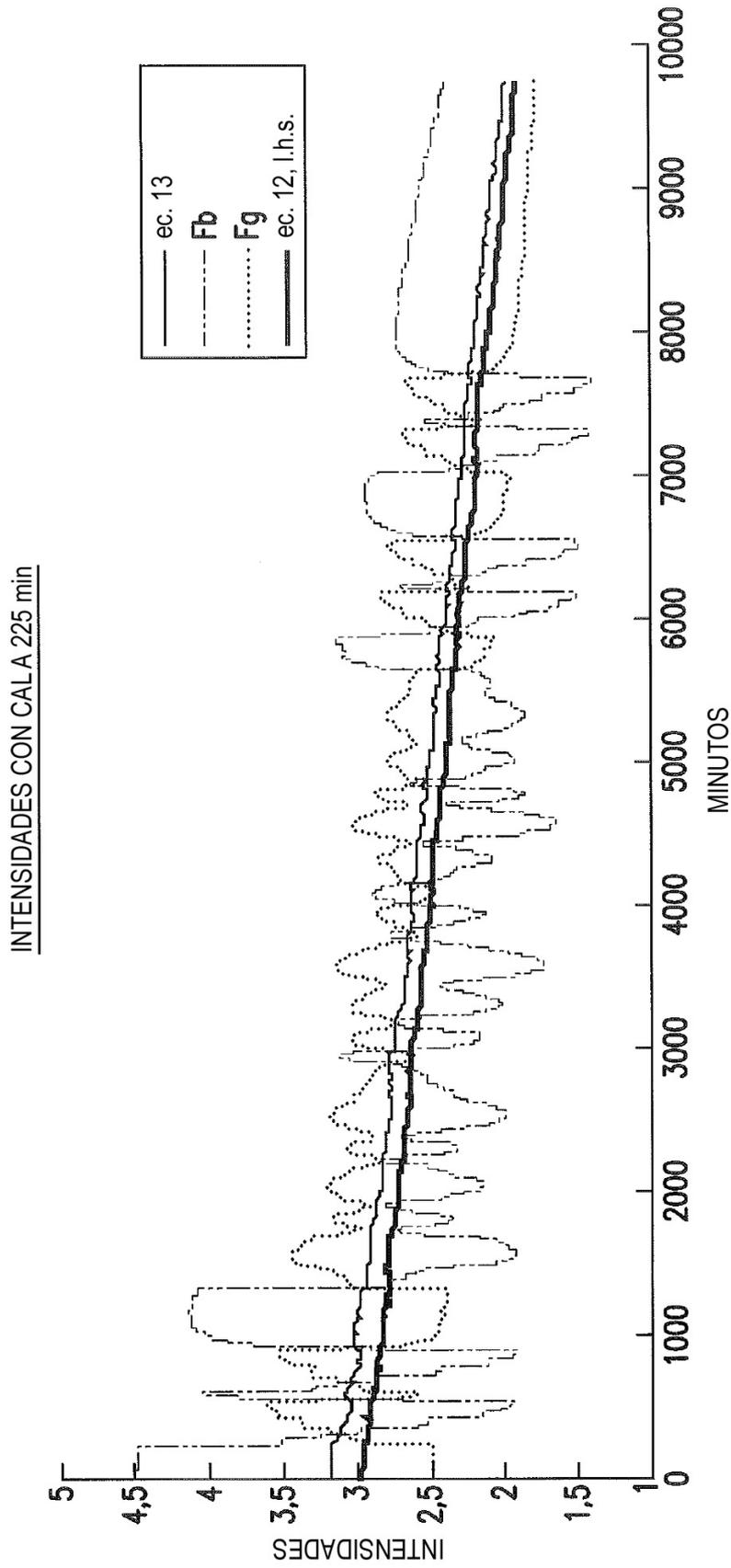


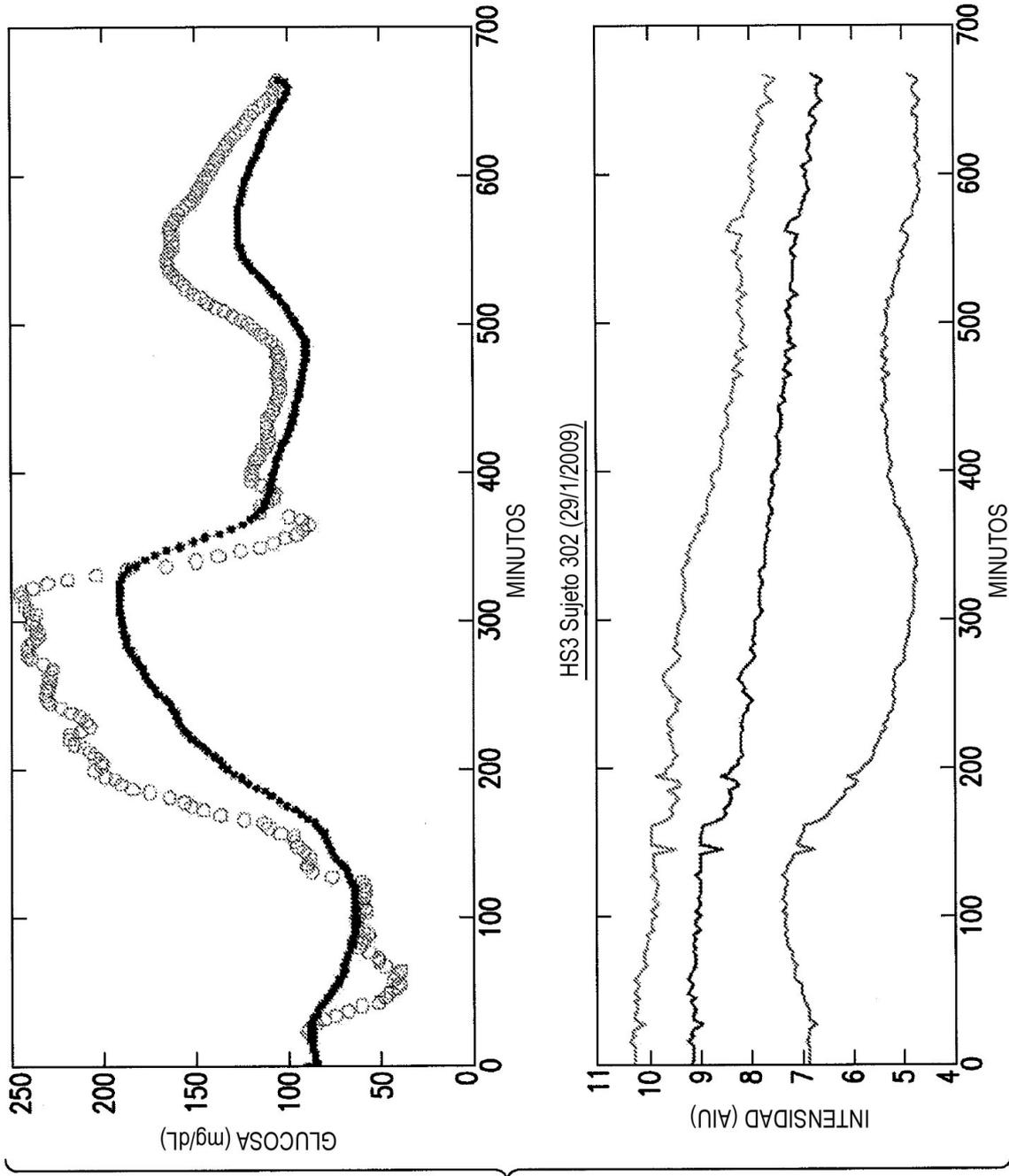
FIG.3



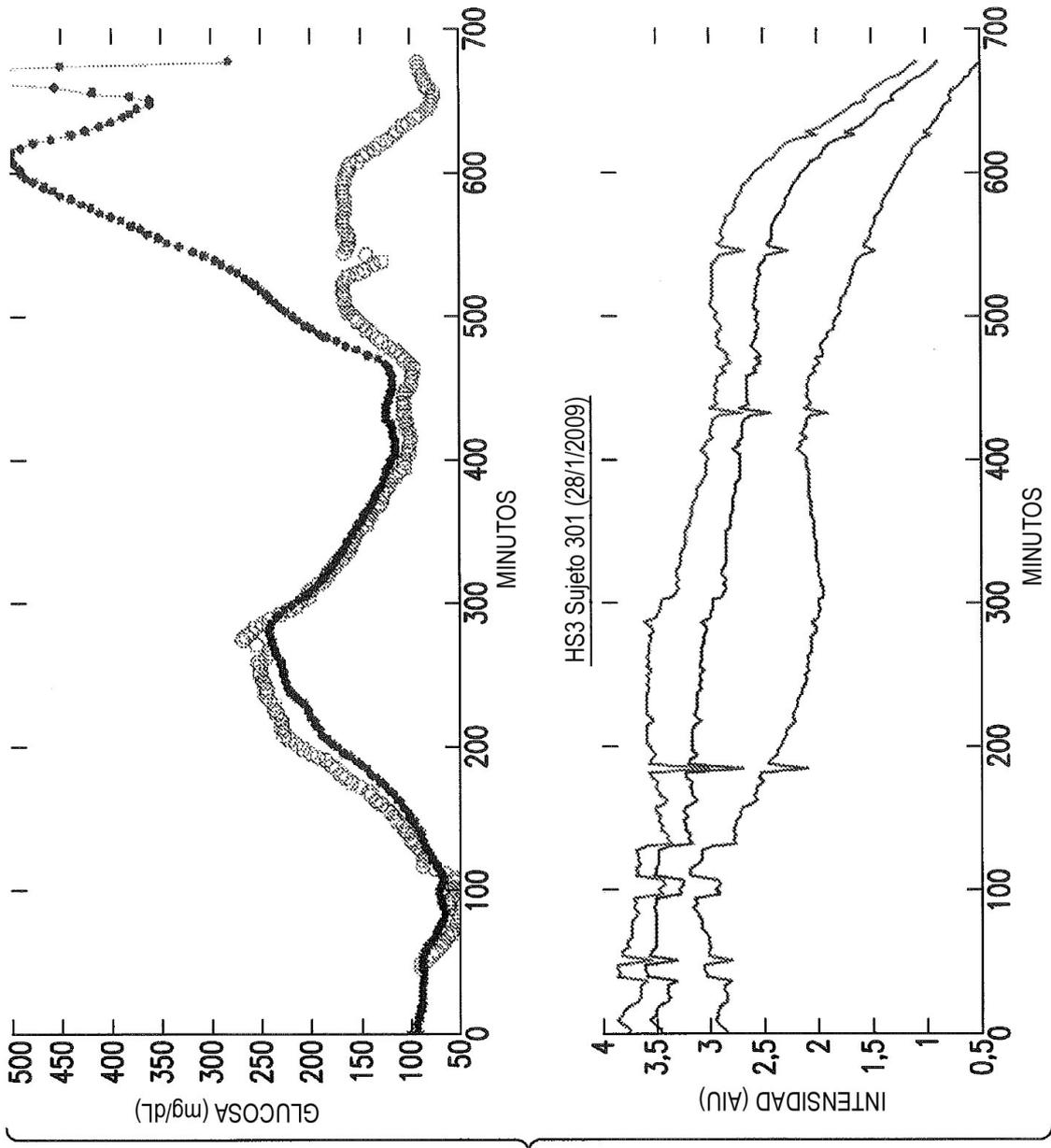
**FIG.4**



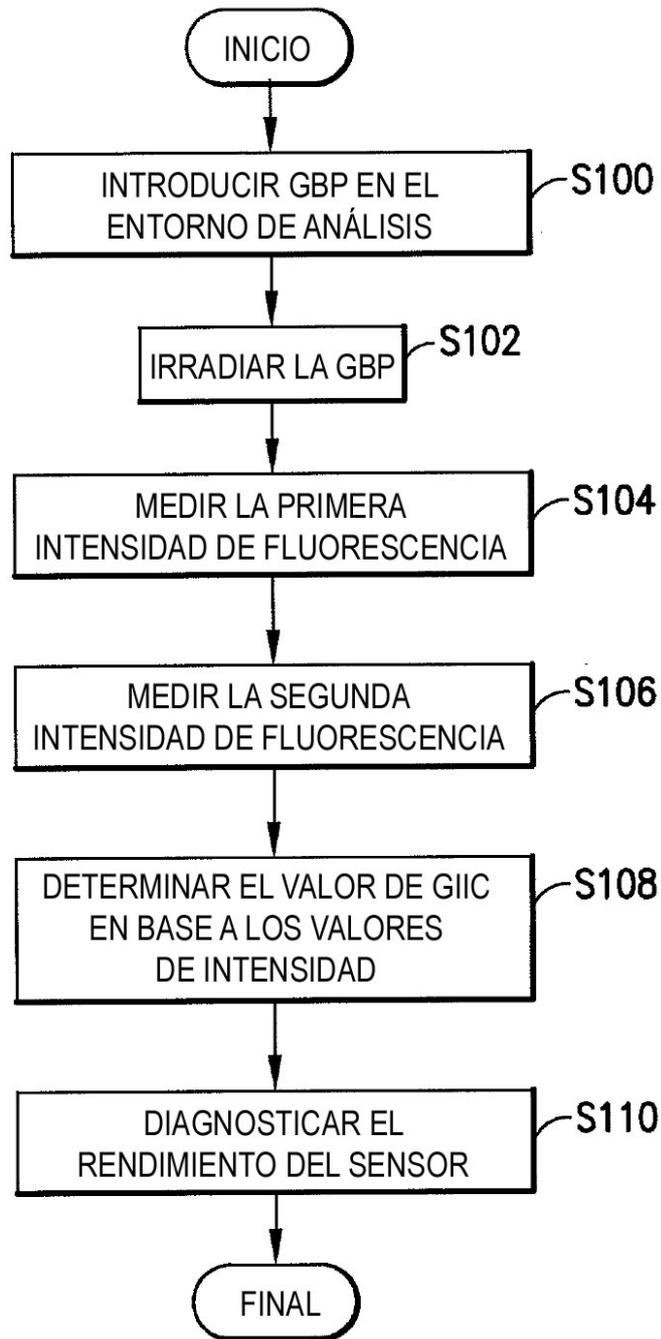
**FIG.5**



**FIG.6**



**FIG.7**



**FIG.8**

900

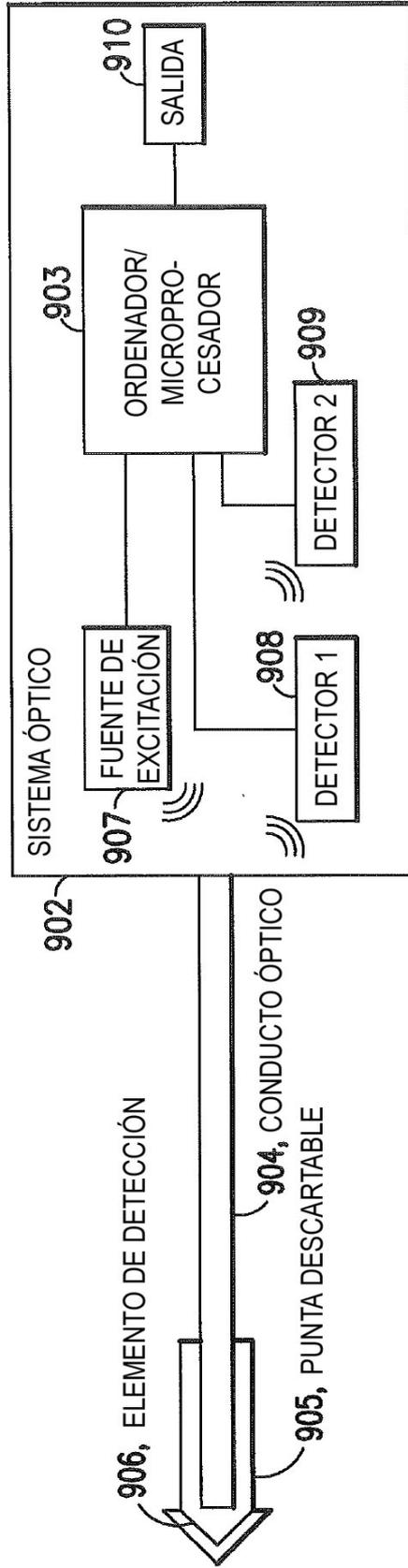


FIG.9