

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 475**

51 Int. Cl.:

**A61B 5/00** (2006.01)

**G01J 3/44** (2006.01)

**G01N 21/65** (2006.01)

**A61B 5/145** (2006.01)

**A61B 5/1455** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2015 PCT/EP2015/069332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16034448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2015 E 15762934 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3193701**

54 Título: **Método y aparato para medición transdérmica in vivo mediante espectroscopía Raman**

30 Prioridad:

**04.09.2014 GB 201415671**

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

**22.02.2019**

73 Titular/es:

**RSP SYSTEMS A/S (100.0%)**

**Sivlandvænget 27C**

**5260 Odense S, DK**

72 Inventor/es:

**BANKE, STEFAN OVESEN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 701 475 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

Método y aparato para medición transdérmica *in vivo* mediante espectroscopía Raman

5 La invención se refiere a métodos para la medición transdérmica *in vivo* mediante espectroscopía Raman de glucosa u otras especies detectables por Raman presentes en la piel. El componente detectado puede estar presente en el fluido intersticial.

Antecedentes

10 La espectroscopía es un método para obtener información a escala molecular mediante el uso de la luz. Esta información puede relacionarse con los estados de rotación, vibración y/o electrónico de las moléculas analizadas, así como con la energía de disociación y más. El espectro rotacional y/o vibracional de una molécula dada es específico para esa molécula. Como consecuencia, los espectros moleculares, en particular los espectros de rotación y/o vibracionales, a menudo se denominan "huellas digitales" relacionadas con una molécula específica. La información relacionada con los estados de rotación, vibración y/o electrónico de las moléculas se puede usar para analizar una muestra que comprende varios componentes moleculares desconocidos, obteniendo así el conocimiento sobre los componentes moleculares de la muestra.

15 La base para una configuración espectroscópica es una fuente de luz, por ejemplo un láser, que se utiliza para iluminar una muestra. La luz de la fuente de luz (la luz entrante) interactuará con la muestra y, a menudo, dará lugar a una alternancia de la luz que es transmitida, emitida, reflejada y/o dispersada por la muestra. Al recolectar la luz alterada y analizar su distribución espectral, se puede obtener información sobre la interacción entre la luz entrante y la muestra molecular; de ahí que se pueda obtener información sobre los componentes moleculares.

20 La distribución espectral se mide típicamente utilizando un espectrofotómetro. Un espectrofotómetro es un aparato óptico que funciona al separar el haz de luz dirigido hacia el aparato óptico en diferentes componentes de frecuencia y posteriormente medir la intensidad de estos componentes mediante el uso de, por ejemplo un detector CCD, un arreglo CCD, fotodiodo o similar.

25 La luz alterada que refleja las interacciones entre la luz entrante y la muestra molecular se puede caracterizar aproximadamente como emisión o dispersión si la luz se recolecta generalmente en la ruta inversa de aquella en la que ingresó a la muestra. Las señales de emisión tienen perfiles espectrales relativamente amplios en comparación con las señales de luz dispersas, que normalmente muestran líneas espectrales bastante estrechas. Un proceso a menudo domina sobre el otro, pero ambos procesos pueden ocurrir, y lo más a menudo, ocurren simultáneamente. La intensidad de la luz emitida en comparación con la intensidad de la luz dispersada depende, entre otras cosas, de la frecuencia y la potencia de la luz entrante, la intensidad de la luz entrante en el punto de medición de la muestra y los componentes moleculares de la muestra.

30 La dispersión de la luz puede clasificarse como elástica o inelástica y se caracteriza por ser señales espectroscópicas muy estrechas. La dispersión elástica se conoce como dispersión de Rayleigh, en la que no hay cambio de frecuencia. La dispersión de Rayleigh tiene la misma frecuencia que la de la luz entrante.

35 El ejemplo más conocido de dispersión inelástica es la dispersión Raman, en la que hay un intercambio de energía entre la molécula y los fotones de la luz entrante. Las frecuencias, es decir, la distribución espectral de la luz dispersada de Raman serán diferentes de las de la luz entrante y reflejarán de manera única los niveles vibracionales específicos de la molécula; por lo tanto, es un espectro de huellas digitales. Esto se puede utilizar para identificar la composición molecular de la sustancia probada y/o la concentración de las moléculas específicas en la sustancia.

40 La dispersión Raman es un proceso relativamente débil en comparación con, por ejemplo, dispersión de Rayleigh y fluorescencia. La reducción de las contribuciones de estos otros procesos es, por lo tanto, deseable cuando se recolecta luz dispersa Raman. Además, la intensidad de la luz dispersada Raman depende en gran medida de la frecuencia y la intensidad de la luz entrante. Si son variables, por lo tanto, puede ser esencial monitorear las fluctuaciones de potencia en la luz entrante si se desea recibir información confiable sobre la distribución de los componentes moleculares en diferentes muestras y/o puntos de muestra según el análisis de la luz dispersada Raman recolectada, dependiendo de la precisión necesaria. Lo mismo es cierto si el análisis de los componentes moleculares en una muestra y/o diferentes puntos de muestra se basa en espectros de emisión.

50 La piel comprende varias capas que tienen diferentes características y que contienen diferentes tipos de células y estructuras. Se han realizado diversas propuestas para el uso de la espectroscopía Raman para medir la glucosa u otros componentes en la piel, pero ninguna de ellas ha proporcionado hasta la fecha un sistema que garantice que en cualquier señal de luz recolectada individual dada se origine por debajo del estrato córneo por un margen que proporcione una buena medición.

La superficie de la piel está formada por el estrato córneo, que consiste principalmente en células cutáneas cornificadas, muertas y aplanadas, y varía en grosor entre los individuos y entre las áreas del cuerpo. La concentración

de componentes como la glucosa en el interior del estrato córneo no está en equilibrio con el líquido intersticial por debajo del estrato córneo.

5 A menudo, se desea realizar mediciones transdérmicas en la punta del dedo debido a la facilidad con que se puede colocar la punta del dedo en la trayectoria de la luz de un instrumento adecuado. Sin embargo, las variaciones individuales en el grosor del estrato córneo son relativamente grandes en esta área. Por lo tanto, el estrato córneo generalmente tiene un espesor de 10 a 15  $\mu\text{m}$  en la mayoría de las áreas del cuerpo, pero puede ser más de 10 veces más grueso en las palmas y las plantas. Los patrones de huellas digitales también proporcionan una variación en el grosor del estrato córneo sobre la superficie de las yemas de los dedos.

10 El documento WO2011/083111 describe un aparato basado en un espectrómetro Raman para la medición transdérmica de la glucosa que se establece para derivar señales Raman desde una profundidad de 60 a 400  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie de la piel, generalmente enfocando la luz entrante a una profundidad dentro del rango de 200-300  $\mu\text{m}$ . Se encontró que esto es ampliamente satisfactorio, pero falla en sujetos ocasionales cuyo estrato córneo en el sitio de medición es demasiado grande.

15 Caspers et al; Biophysical Journal, Vol. 85, Julio de 2003, describe un método y aparato de espectroscopía Raman confocal *in vivo* del cual se dice que es útil para medir la glucosa. Sin embargo, no contiene ninguna instrucción sobre la profundidad a partir de la cual se debe recolectar la dispersión Raman en una medición de glucosa y hay una fuerte percepción deducible de la enseñanza de que el aparato no se ha probado con este fin.

20 El documento WO2008/052221 describe un método y un aparato para la espectroscopía Raman coherente que transmite luz a través de una superficie de muestra, como piel y tejido, a un plano focal dentro de la muestra para medir, por ejemplo, la glucosa. Sin embargo, no hay enseñanzas de la importancia de seleccionar una profundidad particular para el plano focal o dónde debería estar. De hecho, se reconoce específicamente que usando el aparato descrito, se producen variaciones en la señal detectada cuando la concentración del analito es constante debido a los efectos de la temperatura y la hidratación de la piel. No existe ninguna sugerencia de que tales efectos puedan evitarse seleccionando cuidadosamente la profundidad a partir de la cual se toman las mediciones.

25 El documento WO97/36540 describe la determinación de la concentración de, por ejemplo, glucosa mediante espectroscopía Raman y un discriminador de red neuronal artificial. Sin embargo, las señales Raman no se obtienen selectivamente de una profundidad particular y se discute la necesidad de compensar las no linealidades que surgen de las señales que penetran hasta una profundidad de  $> 500 \mu\text{m}$ .

30 El documento WO00/02479 describe un método y un aparato para la medición no invasiva de la glucosa mediante espectroscopía Raman confocal del humor acuoso de la cámara anterior del ojo. Naturalmente, no se enseña la profundidad a la que se deben realizar mediciones óptimas en la piel.

35 El documento WO2009/149266 se refiere de nuevo a Ermakov IV, Ermakova MR, McClane RW, Gellermann W. Opt Lett. 2001 Aug 1;26(15):1179-81, 'Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissues.' que describe el uso de resonancia en dispersión Raman como una nueva tecnología óptica no invasiva para medir los antioxidantes carotenoides en tejidos humanos vivos de voluntarios sanos. Mediante el uso de la excitación con láser azul-verde, se dice que se obtienen espectros Raman de carotenoides claramente distinguibles sobre un fondo de fluorescencia.

40 Chaiken et al (Noninvasive blood analysis by tissue modulated NIR Raman spectroscopy, J. Chaiken et. al., Proc. of SPIE optical Eng., 2001, vol. 4368, p.134-145) obtuvieron una correlación de solo 0.63 entre las mediciones basadas en Raman y las mediciones de la glucosa en la sangre mediante punción con el dedo en varios individuos, pero pudieron obtener una correlación de 0.90 para un solo individuo. La configuración utilizada por Chaiken et al comprende un haz de excitación colimado y, por lo tanto, no revelan ninguna profundidad focal óptima.

El documento WO01/39665 describe un método para diferenciar entre dermis, epidermis y estrato córneo usando espectroscopía Raman.

45 El objeto de la presente invención se logra con un método y aparato de acuerdo con las reivindicaciones independientes.

50 La presente invención proporciona ahora un método para determinar si el origen de las señales Raman recibidas en un aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico se encuentra dentro del estrato córneo o debajo de él, método que comprende analizar dichas señales para comparar las intensidades relativas de las señales Raman que se originan en un primer componente de la piel y de las señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de la piel, en donde dichas intensidades relativas son indicativas de si las señales Raman se originan dentro del estrato córneo o debajo del estrato córneo.

Expresado de forma alternativa, la invención proporciona un método para predecir si un espectro de señales Raman se recibe transdérmicamente en un aparato detector confocal y tiene al menos un componente que se espera que

- tenga una intensidad que represente la concentración de un componente de la piel en un punto de origen de dichas señales Raman debajo de la superficie de la piel se representará con precisión dicha concentración, cuyo método comprende analizar las características de dicho espectro relacionadas con los componentes de la piel distintos del componente de la piel cuya concentración se medirá y, por lo tanto, determinar si las señales Raman se originan primariamente en el estrato córneo de modo que será menos probable que el espectro represente dicha concentración con precisión o se origine principalmente por debajo del estrato córneo, de modo que sea más probable que el espectro represente dicha concentración con precisión.
- Las características preferidas descritas a continuación se aplican a cualquiera de estos aspectos de la invención.
- Preferiblemente, el método comprende analizar dichas señales para comparar las intensidades relativas de señales Raman que se originan a partir de un primer componente de piel y señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de piel, en donde dichas intensidades relativas son indicativas de si las señales Raman se originan primariamente dentro del estrato córneo o principalmente por debajo del estrato córneo.
- Dicho primer componente de la piel produce un pico en el espectro Raman a un número de onda de 883-884  $\text{cm}^{-1}$ . Este puede derivar de proteínas, incluido el colágeno Tipo I (ver Raman Spectroscopy of Biological Tissues, Movasaghi et al, Applied Spectroscopy Reviews 42: 493-541, 2007).
- Dicho segundo componente de la piel produce un pico en el espectro Raman en 893-896  $\text{cm}^{-1}$ . Esto puede derivar de la fosfodiéster desoxirribosa. Por lo tanto, el segundo componente de la piel puede ser el ADN.
- Los métodos de la invención pueden comprender además la etapa de comparar los tamaños de dichos picos primero y segundo y producir una salida indicativa de que las señales surgen dentro del estrato córneo si el tamaño de dicho primer pico dividido por el tamaño de dicho segundo pico es menos que un valor seleccionado R. El valor de R puede elegirse de acuerdo con la selectividad de la determinación del origen de la señal de analito que se desea alcanzar. En general, será conveniente utilizar la altura del pico como medida del tamaño del pico, pero se puede adoptar otra medida del tamaño, tal como el área.
- Si R se hace más grande, es probable que se rechacen más mediciones candidatas, lo que conlleva una mayor necesidad de repetir dichas mediciones en un sitio de medición diferente, o para ajustar la distancia de enfoque del aparato utilizado, o para rechazar del todo al paciente con respecto a esta forma de medición.
- Si se elige R para que sea más pequeño, se descartarán menos mediciones, pero las posibilidades de que se acepte una medida que en realidad no se correlaciona bien con la concentración real de analito pueden aumentar.
- Preferiblemente, R se selecciona para que sea al menos 0.75, más preferiblemente al menos 0.95, y opcionalmente R se establece en 1.0 o superior, por ejemplo hasta 1.25
- Suponiendo que R se establece en 1.0, si dicho pico de 883-884  $\text{cm}^{-1}$  es más alto que el pico de 893-896  $\text{cm}^{-1}$ , este es un buen indicador de que las señales surgen lo suficientemente por debajo del estrato córneo para que las mediciones de un analito componente de la piel en el fluido intersticial sean precisas. Si, por otro lado, el orden de altura se invierte y el pico de 893-896  $\text{cm}^{-1}$  es más alto que el pico de 883-884  $\text{cm}^{-1}$ , este es un indicador de que las señales pueden no provenir de un nivel suficientemente por debajo del estrato córneo para que las mediciones de un analito componente de la piel en el fluido intersticial sean precisas. Sin embargo, se espera que el valor de 1.0 se genere en un margen de seguridad y R se pueda fijar más bajo.
- Por consiguiente, el método puede incluir los pasos de comparar los tamaños de dichos picos primero y segundo y producir una salida indicativa de que las señales surgen dentro del estrato córneo si dicho primer pico es de menor tamaño que dicho segundo pico y/o producir una salida indicativa de que las señales surgen desde debajo del estrato córneo si dicho segundo pico es de menor tamaño que dicho primer pico.
- Se pueden elegir otros picos en el espectro Raman que proporcionen una indicación similar de la profundidad de origen de las señales.
- Los métodos anteriores proporcionan una prueba de primera línea, pero incluso si dicha relación de tamaño del pico de 883-884  $\text{cm}^{-1}$  y el pico de 893-896  $\text{cm}^{-1}$  es satisfactoria, esto puede no en todos los casos proporcionar suficiente seguridad y puede ser deseable una segunda verificación de línea. Para este fin, se puede investigar si el tamaño de un pico Raman que se deriva de un tercer componente y/o el tamaño de un pico Raman que se deriva de un cuarto componente de la piel, o componentes adicionales de la piel, es mayor que un tamaño predeterminado. Nuevamente, la altura puede ser adoptada como una medida conveniente de tamaño.
- El tamaño predeterminado para este propósito para cada pico Raman utilizado puede estar x desviaciones estándar por encima del tamaño medio para el pico respectivo medido usando el mismo aparato en múltiples sitios de medición diferentes en la piel de una población de prueba de uno o, preferiblemente, múltiples sujetos de prueba. Adecuadamente, x puede ser de 0.5 a 2, por ejemplo 0.75 a 1.5, pero es preferiblemente 1.

- Así, por ejemplo, si la comparación de las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel y las señales Raman que se originan de un segundo componente de la piel es indicativa de que las señales Raman se originan primariamente por debajo del estrato córneo, los métodos de la invención pueden comprender además determinar si el tamaño de un pico adicional en el espectro asociado con un componente de la piel que puede prevalecer en el estrato córneo es más de una desviación estándar mayor que un valor medio para el tamaño de ese pico en una muestra estadísticamente válida de espectros similares, una determinación positiva que indica una probabilidad de que las señales Raman no se originen principalmente por debajo del estrato córneo.
- Para obtener los espectros similares, se seleccionan adecuadamente múltiples sitios de medición para que sean lo suficientemente numerosos como para proporcionar una medición estadísticamente válida de la desviación estándar. Adecuadamente, se podrían usar 100-300 sitios de prueba, preferiblemente elegidos entre 5-20 sujetos de prueba, por ejemplo, 10 sitios en cada uno de 20 individuos. Los sujetos de prueba deben hacerse coincidir preferiblemente por etnia, edad y/o naturaleza de la ocupación (como trabajador manual o no) entre sí y con el sujeto de las mediciones del analito.
- Los picos adecuados para usar en esta segunda verificación de línea serían picos de  $1445\text{ cm}^{-1}$  y de  $1650\text{ cm}^{-1}$ . El primero puede surgir de diversos modos de flexión asociados con los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  en el colágeno. El último puede derivar de grupos amida de proteínas.
- Si la prueba de primera línea falla o si cualquiera de estos picos elegidos es mayor que el tamaño de corte elegido, la validez de la medición del analito es dudosa y se debe elegir un sitio de medición alternativo o la profundidad a partir de la cual se originan las señales Raman debe adecuadamente alterada, lo que generalmente implica que se debe aumentar.
- El método de la invención se puede usar para determinar si el aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico medirá con éxito la concentración de un componente cutáneo objetivo midiendo señales Raman que se originan por debajo del estrato córneo. Esta determinación se puede usar simplemente para excluir a los pacientes de mediciones que no son adecuados, o para guiar una elección de un sitio de medición diferente donde el estrato córneo no sea demasiado grueso, o para guiar un ajuste del aparato detector focal confocal que opera transdérmicamente para hacer que mida las señales Raman que se originan desde debajo del estrato córneo.
- Por lo tanto, los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la invención pueden incluir además ajustar dicho aparato detector confocal de operación transdérmica en respuesta a un hallazgo de que las señales Raman se originan desde dentro del estrato córneo, dicho ajuste altera la profundidad de origen de dichas señales Raman de tal manera que se determina una nueva profundidad como satisfactoria y, en particular, tal que ya no se determina que la profundidad está dentro del estrato córneo.
- Esto se puede hacer ajustando la distancia desde la superficie de la piel de una lente objetivo desde la cual se emite luz hacia el sitio de medición y se recibe desde el sitio de medición, para alterar la profundidad desde la que se reciben las señales Raman.
- Alternativa o adicionalmente, dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico puede comprender una lente objetivo que tiene una distancia focal y dicho método de alterar la profundidad de origen de las señales Raman puede comprender alterar la longitud focal de la lente objetivo mediante el reemplazo de la lente objetivo o por ajuste de la lente objetivo.
- Con este fin, dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico puede comprender una lente objetivo compuesta que comprende al menos un primer elemento y un segundo elemento espaciados del primer elemento, y dicho método de alterar la profundidad de origen de las señales Raman puede comprender alterar el espaciado de dos o más elementos para ajustar la distancia focal de la lente objetivo compuesta, y esto incluiría el reemplazo de la lente por una en la que dicha separación sea diferente.
- Opcionalmente, dichos ajustes de la posición de la lente o la distancia focal pueden llevarse a cabo alterando el grosor de un espaciador piezoeléctrico, ya sea entre la lente objetivo y la superficie de la piel o entre dichos elementos de la lente mediante la alteración de un voltaje aplicado a la misma.
- Opcionalmente, dichos ajustes de la posición de la lente o la distancia focal pueden llevarse a cabo alterando la posición rotacional de un collar anular montado en tornillo que lleva al menos un elemento de dicha lente compuesta.
- La invención también proporciona, en un aspecto adicional, un aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico para la medición in vivo no invasiva mediante espectroscopía Raman de la concentración de un componente de la piel presente en la piel de un sujeto, que comprende una fuente de luz, componentes ópticos que definen una trayectoria de luz desde dicha fuente de luz a una ubicación de medición, una unidad de análisis de espectro, componentes ópticos que definen una trayectoria de retorno para la luz dispersada Raman desde dicha ubicación de medición a dicha unidad de análisis de espectro, en donde dicha unidad de análisis de espectro opera para determinar si el origen de las señales Raman recibidas dentro del estrato córneo o debajo de él, analizando las

características de la luz dispersa Raman relacionada con los componentes de la piel que no sea el componente de la piel cuya concentración se va a medir y, de ese modo, determinar si las señales Raman se originan primariamente dentro del estrato córneo o primariamente debajo del estrato córneo.

- 5 Expresado de forma alternativa, en este aspecto, la invención proporciona en un aspecto adicional un aparato detector confocal que funciona de manera transdérmica para la medición in vivo no invasiva mediante espectroscopía Raman de la concentración de un componente de la piel presente en la piel de un sujeto, que comprende una fuente de luz, componentes ópticos que definen una trayectoria de luz desde dicha fuente de luz hasta una ubicación de medición, una unidad de análisis de espectro, componentes ópticos que definen una trayectoria de retorno para la luz dispersada Raman desde dicha ubicación de medición hasta dicha unidad de análisis de espectro, en donde dicha unidad de análisis de espectro opera para determinar si el origen de las señales Raman recibidas allí se encuentran dentro del estrato córneo o debajo de él, al analizar dichas señales para comparar las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel y las señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de la piel, en donde dichas intensidades relativas son indicativas de si las señales Raman se originan dentro del estrato córneo o debajo del estrato córneo.
- 10
- 15 Dicha unidad de análisis de espectro determina el tamaño de un pico en el espectro Raman en  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  producido por dicho primer componente de la piel.

- Dicha unidad de análisis de espectro determina el tamaño de un pico en el espectro Raman a  $893\text{-}896\text{ cm}^{-1}$  producido por dicho segundo componente de piel. Dicha unidad de análisis de espectro determina una relación entre el tamaño de un primer pico en el espectro Raman en  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  y el tamaño de un segundo pico en el espectro Raman en  $893\text{-}896\text{ cm}^{-1}$ . La altura se puede utilizar como una medida adecuada del tamaño del pico.
- 20

Por lo tanto, preferiblemente, dicha unidad de análisis de espectro produce una salida indicativa de que las señales surgen desde dentro del estrato córneo si la altura de dicho primer pico dividida por la altura de dicho segundo pico es menor que un valor seleccionado. R. R puede preajustarse para ser 0.75, más preferiblemente 0.95 y aún más preferiblemente 1.0.

- 25 Preferiblemente, R no es más de 1.25.

- Opcionalmente, si la unidad de análisis de señal determina que la comparación de las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de piel y las señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de piel es indicativa de que las señales Raman se originan primariamente debajo del estrato córneo, dicha unidad de análisis de señales determina si el tamaño de un pico adicional en el espectro asociado con un componente de la piel que prevalece en el estrato córneo es más que  $x$  desviaciones estándar mayor que un valor medio para el tamaño de ese pico en una muestra estadísticamente válida de espectros similares, una determinación positiva que indica una probabilidad de que las señales Raman no se originen primariamente debajo del estrato córneo. El valor de  $x$  se discute más arriba.
- 30

- Dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico puede comprender un conjunto de lentes objetivo intercambiables de diferente longitud focal o una lente objetivo que tiene una longitud focal ajustable. Para este fin, dicha lente objetivo puede ser una lente objetivo compuesta que comprende al menos un primer elemento y un segundo elemento espaciados del primer elemento, y luego dicha lente se puede ajustar alterando el espaciado de dos o más elementos para ajustar la distancia focal de la lente objetivo compuesta. El ajuste de separación puede ser preferiblemente piezoeléctrico u operado por tornillo como se describe anteriormente. Las lentes intercambiables pueden diferir entre sí en el espaciado de dichos elementos de lentes.
- 35
- 40

- El aparato puede incluir medios para calcular una concentración de glucosa u otro componente analito en fluido intersticial o sangre basándose en el análisis de dicha luz Raman dispersada. El espectro Raman se puede analizar mediante la aplicación de un modelo estadístico entrenado que relaciona las intensidades de los picos con la concentración de glucosa u otro analito. Esto se puede realizar utilizando la regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS) como se describe con más detalle en las referencias reconocidas en M. A. Arnold; In Vivo Near-Infrared Spectroscopy of Rat Skin Tissue with Varying Blood Glucose Levels; Anal. Chem. 2006, 78, 215-223 en este mismo y en A. M. K. Enejder et al; Raman Spectroscopy for Non-invasive Glucose Measurements; Jnl of Biomedical Optics, 10(3), 031114; May/June 2005. Pueden utilizarse otras formas de calibración multivariadas incluyendo el Análisis de Componente Principal (PCA) de forma análoga la descrita, por ejemplo, en A. G. Ryder, G. M. Connor and T. J. Glynn; Quantitative Analysis of Cocaine in Solid Mixtures using Raman Spectroscopy and Chemometric Methods; Journal of Raman Spectroscopy, 31; 221-227 (2000) o en J. T. Olesberg, L. Liu, V. V. Zee, and M. A. Arnold; In Vivo Near-Infrared Spectroscopy of Rat Skin Tissue with Varying Blood Glucose Levels; Anal. Chem. 2006, 78, 215-223. En general, los métodos estadísticos de análisis de espectro útiles para calibrar la detección de analitos a partir de espectros de absorción también serán útiles en el análisis de espectros Raman.
- 45
- 50

- El aparato puede ser ajustable para alterar la profundidad debajo de la superficie de la piel a partir de la cual se origina la mayor parte de la intensidad de las señales Raman, para establecer que dicha profundidad esté debajo del estrato
- 55

córneo. La recolección de luz será de un rango de profundidades y el aparato puede ser ajustable de manera que un porcentaje deseado de la luz se origine desde debajo del estrato córneo.

5 Preferiblemente, dicho porcentaje es al menos 55%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 90%. También es preferible que al menos el 90% de la luz dispersada Raman recibida en la unidad de detección de luz se origine a profundidades inferiores a 600  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie de la piel. Preferiblemente, también menos del 25%, más preferiblemente menos del 10%, de la luz dispersada Raman recibida en la unidad de análisis de espectro se origina a profundidades menores de 100  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie de la piel.

Preferiblemente, al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50% de la luz que llega a la unidad de análisis de espectro se origina desde 200 a 400  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie de la piel.

10 Opcionalmente, dicho ajuste es automatizado. Por lo tanto, la unidad de análisis de espectro puede operar para determinar el origen de las señales Raman como se describe y en el caso de una determinación de que las señales se originan dentro del estrato córneo, se puede emitir una señal de control a un medio de ajuste que opera para ajustar una posición de profundidad confocal desde la cual se reciben las señales Raman hasta que la unidad de análisis de espectro determina que el origen de las señales está por debajo del estrato córneo. Dichos medios de ajuste pueden producir dicha señal de control en forma de un voltaje aplicado a un actuador piezoeléctrico para cambiar la posición de al menos un elemento de lente en relación con la piel en uso. Alternativamente, la señal de control puede hacer que un motor haga girar un mecanismo de ajuste de lente giratorio para alterar el espaciado de componentes de la lente.

20 Por lo tanto, los medios de ajuste pueden buscar una profundidad confocal satisfactoria haciendo incrementos iterativos en la profundidad confocal hasta obtener un resultado satisfactorio. Adecuadamente, esto podría conllevar aumentos progresivos en la profundidad confocal de 10 a 50  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, de 20 a 30  $\mu\text{m}$ .

25 La unidad de análisis de espectro puede recibir luz de la superficie de la piel sin la transmisión de dicha luz a través de una fibra óptica o con dicha fibra. En esta última eventualidad, el aparato según la invención puede comprender una pieza de mano para aplicación a la piel que contiene componentes que definen dicha ubicación de medición en uso, y una o más fibras ópticas que conectan dicha pieza de mano a dicha fuente de luz y a la unidad de análisis de espectro para análisis de las señales recibidas desde dicha unidad de detección de luz para proporcionar dicha medición desde allí.

30 La posición distal de un miembro de contacto con la piel de dicha ubicación de medición es opcionalmente ajustable y puede, por ejemplo, ser ajustable de 60 a 400  $\mu\text{m}$  más allá de dicha superficie distal del miembro de contacto con la piel o puede ajustarse para que sea de 50 a 400  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente 200 a 300  $\mu\text{m}$ , debajo de la superficie de la piel. Alternativamente, sin embargo, la posición distal del miembro de contacto con la piel de dicha ubicación de medición es fija, de manera adecuada de forma que se logren los parámetros numéricos discutidos anteriormente.

35 Por lo tanto, la profundidad de enfoque de los componentes ópticos que definen dicha trayectoria de luz, y/o los componentes ópticos que definen dicha trayectoria de retorno pueden ser fijos en lugar de ajustables. De ello se deduce que, en este caso, si la unidad de análisis de espectro determina que la profundidad confocal no es satisfactoria, se debe elegir un sitio de medición alternativo o se debe excluir a ese paciente.

40 La invención incluye un método para la medición in vivo no invasiva mediante espectroscopía Raman de un componente, que puede ser glucosa, presente en el líquido intersticial en la piel de un sujeto, que comprende, en cualquier orden, (a) dirigir la luz desde una fuente de luz en la piel de dicho sujeto a través de componentes ópticos que definen una trayectoria de luz desde dicha fuente de luz hasta una ubicación de medición en la piel y, por lo tanto, producen señales Raman que regresan de la piel, determinando si el origen de las señales Raman que regresan se encuentra dentro del estrato córneo o por debajo analizando dichas señales para comparar las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel y señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de la piel, en donde dichas intensidades relativas son indicativas de si las señales Raman se originan dentro del estrato córneo o debajo del estrato córneo y (b) dirigir la luz desde dicha fuente de luz hacia la piel de dicho sujeto a través de dichos componentes ópticos que definen una trayectoria de luz desde dicha fuente de luz hasta dicha ubicación de medición en la piel, recibir la luz dispersa Raman desde la piel en una unidad de detección de luz a través de componentes ópticos que definen una ruta de retorno para la luz dispersada Raman desde dicha ubicación de medición hasta dicha unidad de detección de luz, y determinar dicha concentración de dicha luz dispersa Raman. Las características preferidas de la etapa (a) anterior pueden ser las descritas anteriormente.

El método puede incluir además ajustar dichos componentes ópticos de modo que se determine que las señales Raman se originan desde debajo del estrato córneo.

Tales métodos se realizan preferiblemente usando un aparato de acuerdo con la invención.

55 El método puede incluir calibrar la salida del aparato mediante el uso del aparato para proporcionar una salida con respecto a una concentración conocida del componente de la piel que se medirá antes de dicha medición en dicho

sujeto. Una vez calibrado, el aparato preferiblemente no se calibra nuevamente por un período de no menos de una semana, más preferiblemente un mes. Preferiblemente, dicho paso de calibración para proporcionar una salida con respecto a una concentración de sustancia conocida no se lleva a cabo mediante el uso del aparato en dicho sujeto.

5 Por lo tanto, la calibración se puede realizar en un sujeto diferente para el que se conoce la concentración del componente o se puede realizar utilizando un material de referencia estándar, como una gota de solución de componente colocada en la ubicación de medición o un simulador sólido que simule una solución de componente.

Cualquier aparato descrito en el presente documento puede usarse en tal método.

10 La fuente de luz es preferiblemente un láser. Una forma preferida de láser para usar como fuente de luz es un láser de diodos con una longitud de onda en el rango de 300-1500 nm. Las longitudes de onda preferidas adecuadas son 785, 830 u 850 nm. Un rango de potencia adecuado es 50-1000 mW. Por ejemplo, se puede usar un láser de 830 nm, 500 mW FC-830 de RGB Lase.

15 El aparato puede incluir una sonda óptica para medir señales de luz en la que los componentes ópticos que definen la trayectoria de la luz desde la fuente de luz a la ubicación de medición comprenden una primera fibra óptica que guía la luz entrante desde dicha fuente de luz y una lente que enfoca dicha luz entrante, es decir en o sobre, la ubicación de la medición. Los componentes ópticos para definir una trayectoria de retorno para la luz dispersada Raman pueden comprender dicha lente y otros componentes ópticos que guían la luz alterada hacia la unidad de análisis espectral. Los componentes ópticos adicionales pueden incluir una segunda fibra óptica, sin embargo, en lugar de emplear una segunda fibra óptica, puede integrarse un espectrofotómetro directamente en la pieza de mano. Opcionalmente, puede haber una unidad de detección de luz adicional (o dispositivo de registro de luz) que mida las fluctuaciones de intensidad en dicha luz entrante, y esta unidad de detección de luz adicional puede posicionarse ventajosamente después de dicha primera fibra óptica, por lo que dicha unidad de detección de luz adicional recibe una parte de dicha luz entrante de dicha primera fibra.

25 Una salida eléctrica de este dispositivo de registro de luz que es representativa de la intensidad de la luz entrante puede usarse para ajustar las mediciones de intensidad en la unidad de análisis de espectro para compensar las variaciones en dicha intensidad.

30 El uso de al menos una fibra óptica es ventajoso ya que, aunque se puede usar un microscopio, una sonda óptica basada en un microscopio no es un objeto fácilmente móvil y la parte del cuerpo de un usuario podría ser incómoda de colocar en una posición en la que se podrían hacer mediciones. Una posibilidad sería que el paciente inserte su dedo o brazo directamente debajo o sobre el objetivo del microscopio en el microscopio. Desafortunadamente, esto es incómodo, si no imposible, con la mayoría de los microscopios.

35 Una sonda óptica que no emplea el microscopio completo, sino solo los objetivos del microscopio montados por separado en, por ejemplo, una mesa, permite una mejor accesibilidad entre la sonda y la muestra. Las mediciones de los niveles de azúcar en la sangre u otros componentes de la piel en un paciente *in vivo* se vuelven más convenientes, ya que el brazo o el dedo del paciente pueden colocarse frente al objetivo del microscopio sin mucha dificultad. Sin embargo, si la muestra elegida es una pierna, podría resultar más difícil colocarla adecuadamente frente al objetivo del microscopio.

40 Dentro de la sonda óptica, dicho dispositivo de registro de luz se colocará normalmente después de un espejo dicroico, que permite que una pequeña parte de la luz entrante pase a través del espejo dicroico y sobre dicho dispositivo de registro de luz o sea reflejada por el espejo dicroico en dicho dispositivo de registro de luz. Alternativamente, un dispositivo de división puede colocarse entre dicha primera fibra y dicho espejo dicroico, donde dicho dispositivo de división refleja una parte menor de la luz entrante sobre dicho dispositivo de registro de luz.

Una ventaja de usar un dispositivo de registro de luz es que permite una medida precisa de las variaciones en la intensidad de la luz entrante en todo momento material. Esto asegura que puedan compensarse las variaciones en la intensidad de la luz alterada debidas a las variaciones en la luz entrante y no a las variaciones de la muestra.

45 En una realización de la invención, dicha lente que enfoca la luz entrante hacia dicha muestra está dispuesta en la superficie de dicha sonda óptica de manera que dicha lente está en contacto directo con la piel durante la medición.

Una ventaja de tener la lente en contacto directo con la piel durante la medición es que la profundidad de penetración de la muestra y, por lo tanto, la distancia desde la sonda óptica hasta el punto de enfoque de la muestra, se conoce exactamente, como lo define la distancia focal de la lente.

50 En otra realización de la invención, dicha sonda óptica comprende además una ventana, donde dicha ventana se coloca entre dicha lente y la piel, de modo que dicha ventana está en contacto directo con la piel durante la medición, y donde el grosor de dicha ventana es menor que la distancia focal de dicha lente.

Una ventaja de insertar una ventana entre la lente y la piel es que puede proporcionar una limpieza más fácil de la sonda óptica, si se usa una lente frágil sensible a la limpieza.

5 Otra ventaja de insertar una ventana entre la lente y la piel es que la profundidad de penetración puede variar dependiendo del grosor de la ventana. Esto proporciona una forma de establecer la profundidad de penetración en un valor que resulta en una determinación de que las señales Raman medidas se originan por debajo del estrato córneo.

Igualmente, en lugar de tener una ventana sólida, se puede proporcionar una abertura de ventana entre la lente y la piel, formándose la abertura en un miembro de contacto con la piel.

10 La sonda óptica según la invención puede comprender además un espejo dicroico colocado después de dicha primera fibra óptica, donde dicho espejo dicroico refleja cualquier porcentaje entre  $re_{in} = 0$  y 100 (por ejemplo, 90%) y transmite cualquier porcentaje entre  $tr_{in} = 0$  y 100 (por ejemplo, el 10% de dicha luz entrante, donde  $re_{in} + tr_{in} = 100$  por ciento (ignorando las pérdidas), y refleja cualquier porcentaje entre  $re_{se} = 0$  y 100 (por ejemplo, 30%) y transmite cualquier porcentaje entre  $tr_{se} = 0$  y 100 (por ejemplo, 70 %) de dicha luz alterada, donde  $re_{se} + tr_{se} = 100$  por ciento (ignorando las pérdidas). Por lo tanto, dicho espejo dicroico puede reflejar la mayor parte de la luz entrante y transmitir la mayor parte de la luz alterada.

15 Dicho espejo dicroico se coloca normalmente en un ángulo de 45 grados con respecto a la dirección de propagación de dicha luz entrante fuera de dicha primera fibra óptica.

En una realización donde la mayor parte de la luz entrante es reflejada por el espejo dicroico, dicho dispositivo de registro de luz puede posicionarse después de dicho espejo dicroico, por lo que dicho dispositivo de registro de luz mide las fluctuaciones de intensidad en dicha luz entrante transmitida a través de dicho espejo dicroico.

20 En otra realización donde la mayor parte de la luz entrante es reflejada por el espejo dicroico, un dispositivo de división puede colocarse entre dicha primera fibra óptica y dicho espejo dicroico, por lo que dicho dispositivo de registro de luz mide las fluctuaciones de intensidad en dicha luz entrante reflejada por dicho dispositivo de división.

25 En una realización de la invención, dicho espejo dicroico está transmitiendo la mayor parte (por ejemplo,  $\geq 90\%$ ) de la luz entrante mientras pasa una porción menor (por ejemplo,  $\leq 10\%$ ) y está reflejando la mayor parte de la luz alterada (por ejemplo,  $\geq 70\%$ ) mientras pasa una cantidad menor (por ejemplo,  $\leq 30\%$ ).

En una realización en la que la mayor parte de la luz entrante es transmitida por el espejo dicroico, dicho dispositivo de registro de luz puede posicionarse después de dicho espejo dicroico, por lo que dicho dispositivo de registro de luz mide las fluctuaciones de intensidad en dicha luz entrante reflejada por dicho espejo dicroico.

30 Una ventaja de tener el dispositivo de registro de luz situado directamente después de dicho espejo dicroico es que utiliza la parte de la luz entrante, que no se refleja en el espejo dicroico, y de lo contrario se perdería. Por consiguiente, no es necesario insertar ningún componente óptico adicional dentro de la sonda óptica para recolectar la luz para medir las fluctuaciones en la luz entrante.

35 En una realización de la invención, el ángulo  $\alpha$  entre la dirección de la luz que sale de dicha primera fibra óptica y la dirección de la luz que entra en dicha segunda fibra óptica es sustancialmente  $\alpha = 90$  grados. El ángulo también podría estar en el rango  $\alpha = 80 - 100$  grados.

40 En una realización de la invención, dicha sonda óptica comprende además al menos una primera abertura en la que dicha primera abertura solo permite que la luz alterada desde el punto de enfoque en la piel alcance la unidad de análisis de espectro, asegurando así la confocalidad en profundidad. Dicha abertura puede ser un elemento espaciado, pero una abertura estrecha de una segunda fibra puede funcionar igualmente bien como dicha abertura cuando se usa una segunda fibra.

45 Una ventaja de usar una abertura óptica colocada antes de la unidad de análisis de espectro es que la abertura óptica funciona como un filtro de profundidad 3D que elimina las señales ópticas generadas fuera de la profundidad confocal, es decir, el punto de enfoque de la muestra. La ventaja de usar una sonda óptica confocal es que la luz alterada que ingresa a la unidad de análisis de espectro surge únicamente de las interacciones entre la luz entrante y la piel a la profundidad del foco; por lo tanto, se minimizan o eliminan las contribuciones de las áreas cónicas arriba y debajo del punto de enfoque.

50 En otra realización de la invención, se pueden emplear adicionalmente una o más aberturas para obtener un contraste más agudo en la dirección z (profundidad). Una segunda abertura se coloca preferiblemente entre la piel y la lente enfocando la luz en la muestra. Esta segunda abertura puede ser un elemento espaciado, pero una abertura estrecha de la sonda óptica en el punto donde la luz sale/es recogida por la lente puede funcionar igualmente bien como una abertura.

Aunque el aparato de acuerdo con la invención está diseñado y configurado para medir señales ópticas en la piel *in vivo*, también podría emplearse para medir señales ópticas sumergiéndolo en, por ejemplo una muestra de sangre realizando así la medición *in vitro*.

5 En general, los elementos ópticos encontrados dentro de una sonda óptica de un aparato de acuerdo con la presente invención están encerrados por una cubierta. Una sonda óptica preferida puede moverse libremente debido al uso de una fibra flexible para guiar la luz dentro y opcionalmente fuera de la sonda óptica. Esto permite mediciones *in vivo* fáciles de, por ejemplo niveles de azúcar en sangre en un paciente utilizando diferentes áreas del cuerpo, como un brazo, un dedo, una pierna o similar. Sin embargo, el aparato puede construirse de modo que los componentes ópticos estén contenidos en una carcasa que define una ubicación específica en la cual se coloca la yema de la punta dedo para ejecutar la medición.

10 El grosor del estrato córneo de la yema de un dedo generalmente será de 10-40  $\mu\text{m}$  (véase Marks, James G; Miller, Jeffery (2006). Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology (4th ed.). Elsevier Inc. Page 7. ISBN 1-4160-3185-5 and Thickness of the Stratum Corneum of the Volar Fingertips H. FRUHSTORFER, U. ABEL, C.-D. GARTHE, AND A. KNU' TTEL. Por consiguiente, las profundidades de medición preferidas irán de 200-300  $\mu\text{m}$  desde 160 a 190  $\mu\text{m}$  hasta 260 a 290  $\mu\text{m}$  por debajo del estrato córneo. Las profundidades de medición para todas las áreas de la piel son preferiblemente de 50 a 390  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 190 a 290  $\mu\text{m}$  por debajo del estrato córneo.

Una aplicación primaria del aparato es en general medir los niveles de azúcar en la sangre en un paciente. El nivel de glucosa en sangre se correlaciona con el nivel en el fluido intersticial a la profundidad seleccionada. Otros analitos que pueden medirse de la misma manera incluirían lactato, hemoglobina, colesterol, alcohol, urea y/o drogas.

20 Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá e ilustrará con más detalle haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra esquemáticamente un aparato según la invención.

La Figura 2 muestra una primera realización de una sonda óptica que forma parte del aparato de la Figura 1.

La Figura 3 muestra una segunda realización de una sonda óptica que forma parte del aparato de la Figura 1.

25 La Figura 4 muestra una tercera realización de una sonda óptica que forma parte del aparato de la Figura 1.

La Figura 5 muestra una sección transversal a través de un primer ejemplo de una lente objetivo que tiene un espaciado variable entre los elementos de la lente adecuados para uso en cualquiera de las sondas ópticas de las Figuras 2-4.

30 La Figura 6 muestra una sección transversal a través de un segundo ejemplo de una lente objetivo que tiene un espaciado variable entre los elementos de la lente adecuados para uso en cualquiera de las sondas ópticas de las Figuras 2-4.

35 La Figura 7 muestra los espectros Raman obtenidos de varios sujetos de medición diferentes identificados por el número de paciente. En el valor de desplazamiento del número de onda Raman de  $600\text{ cm}^{-1}$ , los números de paciente relacionados con los espectros en orden descendente de las curvas espectrales son el número de paciente 127, 126, 115, 114, 107.

La Figura 8 muestra una gráfica de la concentración de glucosa predicha por el aparato (eje vertical) contra las concentraciones reales de glucosa (eje horizontal) medida por análisis químico de la sangre para numerosos pacientes. Los puntos sólidos derivan del paciente no.127.

40 La Figura 9 muestra una gráfica de la concentración de glucosa predicha por el aparato (eje vertical) contra las concentraciones reales de glucosa (eje horizontal) medida por análisis químico de sangre para el paciente 114 en numerosas mediciones repetidas.

45 La Figura 10 muestra un primer espectro Raman derivado del paciente obtenido del paciente 17 (trazo superior), y un segundo espectro Raman derivado del paciente obtenido del paciente 107 (trazo inferior). Ambos se caracterizan por una relación de alturas de pico a 883:893 números de onda que es mayor que uno, pero el trazo superior se caracteriza también por tener un pico más alto de lo normal en el número de onda de  $1445\text{ cm}^{-1}$ .

La Figura 11 muestra una gráfica de la intensidad relativa de las señales Raman recibidas en sondas ajustadas adecuadamente del tipo que se ve en las Figuras 2-4 contra la profundidad de origen de las señales en la piel.

La Figura 12 muestra los espectros Raman obtenidos utilizando un aparato ajustado a una profundidad focal muy corta de 160  $\mu\text{m}$  en aire medidos en diferentes ubicaciones en las yemas de los dedos y en el tenar.

Descripción de realizaciones preferidas

La Figura 1 muestra esquemáticamente un aparato según la invención, en uso para medir la concentración de glucosa (u otra sustancia de la piel) *in vivo*. Una sonda 101 óptica recibe luz de una fuente 103 de luz a través de una fibra 105 de luz entrante. En esta realización de la invención, la fuente 103 de luz es un láser. La luz entrante se ilumina e interactúa con la piel 107. La luz alterada recibida de la piel, es recogida por la sonda 101 óptica y analizada en un espectrofotómetro dentro de la sonda para producir una salida eléctrica que se envía a través de una conexión 109 a un ordenador 111 para posterior análisis de los componentes espectrales. Dentro del espectrofotómetro hay una unidad de detección de luz. Como alternativa, por supuesto, la función del espectrofotómetro podría realizarse externamente a la pieza de mano y la luz podría comunicarse desde la pieza de mano a la unidad de análisis espectral a través de una segunda fibra óptica.

En esta realización de la invención, la sonda óptica se aplica al brazo de un paciente, pero también podría aplicarse a un dedo u otra parte del cuerpo. Del mismo modo, la medición se muestra llevada a cabo *in vivo*, pero la sonda 101 óptica también podría emplearse para medir señales ópticas sumergiéndola en, por ejemplo. Una muestra de sangre que realiza la medición *in vitro*.

En general, los elementos ópticos encontrados dentro de la sonda 101 óptica del aparato según la presente invención están encerrados por una cubierta, donde la cubierta tiene al menos una abertura para la fibra 105 de luz entrante y la conexión 109 de señal eléctrica saliente y una abertura para la luz saliente empleada para iluminar la muestra. La última apertura también se puede utilizar para recoger la luz alterada de la muestra. La sonda 101 óptica se puede mover libremente debido al uso de una fibra flexible para guiar la luz hacia la sonda óptica. Esto permite mediciones *in vivo* fáciles de, por ejemplo niveles de azúcar en la sangre en un paciente, utilizando diferentes áreas del cuerpo, como un brazo, un dedo, una pierna o similar.

Una aplicación primaria de la sonda 101 óptica es medir los niveles de azúcar en la sangre en un paciente. Sin embargo, la sonda también se puede usar para medir, por ejemplo el nivel de lactato hemoglobina, colesterol, alcohol, urea y/o droga en la sangre o la temperatura y/o variaciones de la temperatura en la sangre.

La Figura 2 muestra una primera realización de la sonda 201 óptica que comprende una fibra 203 óptica de luz entrante para guiar la luz hacia la sonda 201 óptica. Según esta realización de la invención, la fuente de luz es normalmente un láser. Al salir de la primera fibra 203, la luz 205 entrante se colima utilizando una primera lente 207, que es una lente objetivo, y se filtra ópticamente pasando a través de un primer filtro 209 que bloquea cualquier porcentaje entre 0 y 100, por ejemplo, de 75 a 100 por ciento, de frecuencias/longitudes de onda fuera de la frecuencia/longitud de onda del láser. El bloqueo de frecuencias fuera de la frecuencia del láser garantiza que, por ejemplo, la dispersión Raman generada dentro de la primera fibra 203 se elimina de la luz 205 entrante. El primer filtro 209 también puede bloquear cualquier porcentaje entre 0 y 100, por ejemplo, de 0 a 50 por ciento, de la frecuencia del láser. Esto es una ventaja si la intensidad de la luz 205 entrante es demasiado alta para los requisitos de la muestra. El primer filtro 209 es preferiblemente un filtro de paso de banda, un filtro de muesca, un filtro de borde o similar.

La sonda 201 óptica comprende además un espejo 211 dicróico que refleja o transmite cualquier porcentaje entre 0 y 100 de la luz, donde el porcentaje de luz reflejada y transmitida depende del recubrimiento del espejo 211 dicróico, el ángulo en donde la luz incide en el espejo 211 dicróico, y la frecuencia de la luz. El espejo 211 dicróico puede por ejemplo estar recubierto de manera que refleje el porcentaje más alto de la luz 205 entrante cuando el espejo 211 dicróico esté colocado en un ángulo dado en relación con la dirección de la luz 205 entrante. El cambio del ángulo entre el espejo 211 dicróico y la luz 205 entrante por lo tanto, reduce el porcentaje de luz 205 entrante reflejada por el espejo 211 dicróico.

En esta realización de la invención, la mayor parte de la luz 205 entrante se refleja en el espejo 211 dicróico y se enfoca dentro de la piel 213 de un sujeto mediante una segunda lente que es una lente 215 objetivo. El punto 217 de enfoque de la luz 205 entrante es definido por la distancia 218 focal de la segunda lente 215 y la distancia distal de la lente de un miembro 219 de acoplamiento de la piel y en particular su superficie distal que se acopla a la piel en uso. El miembro de enganche de la piel puede tomar la forma de una ventana como se muestra. Alternativamente, puede ser un collar alrededor de la lente objetivo. Opcionalmente, la extensión a la cual la superficie de contacto con la piel del collar se extiende más allá de la propia lente objetivo puede ser ajustable, adecuadamente mediante roscas de tornillo que conectan el collar y la lente. Esto se puede usar para ajustar la profundidad debajo de la piel en la que se enfoca la luz entrante. Alternativamente, se puede proporcionar un conjunto de lentes objetivo, cada una de las cuales tiene un collar en el cual la extensión de la superficie de contacto con la piel del collar se extiende más allá de la lente objetivo en sí misma, por lo que se puede obtener una profundidad de enfoque deseada al reemplazar una Lente objetivo con otra. En una opción adicional, el miembro de acoplamiento con la piel puede en cambio ser por la superficie distal de la propia lente objetivo. La segunda lente 215 es preferiblemente convexa, pero también podría ser esférica o plana. Como se describe con más detalle a continuación, particularmente con referencia a la Figura 5, la longitud focal de la lente 215 puede ser variable y puede controlarse de acuerdo con la salida de la unidad de análisis de espectro.

El espejo 211 dicroico está en la realización actual posicionado en un ángulo de 45° con respecto a la dirección de propagación de la luz 205 entrante. La mayoría de la luz 205 entrante se refleja en consecuencia a un ángulo de 90°. El espejo 211 dicroico también podría colocarse en un ángulo entre 0 y 90°.

5 En una realización de la invención, el porcentaje de la luz 205 entrante que se refleja ( $re_{in}$ ) y se transmite ( $tr_{in}$ ) por el espejo 211 dicroico es  $re_{in} \geq 90\%$  de ( $re_{in} + tr_{in}$ ) y  $tr_{in} \leq 10\%$  de ( $re_{in} + tr_{in}$ ).

En otra realización de la invención, el porcentaje de la luz 205 entrante que se refleja y transmite por el espejo 211 dicroico es  $re_{in} \geq 98\%$  de ( $re_{in} + tr_{in}$ ) y  $tr_{in} \leq 2\%$  de ( $re_{in} + tr_{in}$ ), respectivamente.

10 La sonda 201 óptica ilustrada comprende además una ventana 219 delgada opcional, que se coloca entre la segunda lente 215 y la piel 213. El grosor de la ventana 219 es más pequeño que la distancia focal de la segunda lente 215, es decir, más pequeño que la distancia desde la segunda lente 215 al punto 217 de enfoque dentro de la piel 213. La ventana 219 puede servir para proteger la segunda lente 215, lo que permite una fácil limpieza de la sonda 201 óptica después de que haya estado en contacto con la piel 213. La ventana 219 actúa como un miembro de contacto con la piel y la distancia desde su superficie de contacto con la piel hasta el punto focal de la lente 215 determina la profundidad 220 por debajo de la superficie de la piel en la que se generan las señales Raman. Esto se establece idealmente de modo que la mayor parte de la intensidad de la luz láser se enfoque a 250 μm por debajo de la superficie de la piel y/o al menos 100 μm por debajo del estrato córneo, por ejemplo, de 100 μm a 150 μm por debajo del fondo del estrato córneo. Si se desea que el aparato se pueda adaptar para otros usos, se puede prever la instalación de ventanas 219 de diferentes espesores, alterando así la profundidad 220 de penetración de la muestra. Las profundidades 220 de penetración de la muestra alternativas típicas están en un rango de 150 a 500 μm dependiendo de la longitud 218 focal de la segunda lente 215 y el grosor de la ventana 219. También se pueden obtener profundidades 220 de penetración más cortas y más largas.

15 En otra realización de la invención, no hay ninguna ventana, y la segunda lente 215 está en contacto directo con la piel 213. La distancia focal de la lente para que la luz pase a través de la piel será idealmente de 200 a 300 μm. De nuevo, si se desea que el aparato también pueda adaptarse para otros usos, la lente puede hacerse reemplazable con lentes de otras longitudes focales.

Además de enfocar la luz 205 entrante en la piel 213, la segunda lente 215 colima la luz 221 alterada desde el punto 217 de enfoque. En la realización actual, el espejo 211 dicroico transmite la mayor parte de la luz 221 alterada, pero refleja la retrodispersión de la luz 205 entrante. Esto filtra las frecuencias no deseadas, es decir, la frecuencia de la luz 205 entrante reflejada, de la luz 221 alterada generada como resultado de las interacciones con la piel 213.

30 En una realización de la invención, el porcentaje de luz 221 alterada que se refleja ( $re_{se}$ ) y se transmite ( $tr_{se}$ ) por el espejo 211 dicroico es  $re_{se} \leq 30\%$  de ( $re_{se} + tr_{se}$ ) y  $tr_{se} \geq 70\%$  de ( $re_{se} + tr_{se}$ ), respectivamente.

En otra realización de la invención, el porcentaje de la luz 221 alterada que es reflejada y transmitida por el espejo 211 dicroico es  $re_{se} \leq 10\%$  de ( $re_{se} + tr_{se}$ ) y  $tr_{se} \geq 90\%$  de ( $re_{se} + tr_{se}$ ), respectivamente.

35 La luz 221 alterada también se filtra ópticamente pasando a través de un segundo filtro 223 antes de que la luz sea enfocada por una tercera lente 225 en un espectrofotómetro 227 que actúa como una unidad de análisis de espectro. El segundo filtro 223 es preferiblemente un filtro de paso de banda, un filtro de muesca, un filtro de borde o similar y se caracteriza por transmitir cualquier porcentaje entre 30 y 100, por ejemplo 75 a 100%, de la luz 221 alterada recogida por la segunda lente 215 y bloqueando cualquier porcentaje entre, por ejemplo 75 a 100%, de frecuencias cercanas o iguales a la frecuencia de la luz entrante. Esto, por ejemplo, puede asegurar que el porcentaje de dispersión de Rayleigh no deseada que pasa a través del segundo filtro 223 sea despreciable al mismo tiempo, ya que casi toda la luz Raman dispersada desde la piel 213 puede pasar.

Se puede proporcionar un segundo filtro 223 que bloquea adicionalmente la luz reflejada directamente cerca de la longitud de onda del láser mientras permite que la emisión dispersada de Rayleigh pase a través de ella.

45 En esta realización de la invención, el espejo 211 dicroico no refleja toda la luz 205 del láser entrante. En cambio, permite que una fracción más pequeña de la luz 229 pase a través del espejo 211 dicroico y sobre un dispositivo de medición de intensidad de luz/dispositivo 231 de registro, que detecta la intensidad y/o la potencia de la luz 229 después de pasar a través del espejo 211 dicroico y proporciona una salida de medición en forma de una señal electrónica tal como una tensión de salida. El dispositivo 231 de registro de luz puede ser un fotodiodo, un detector de CCD, un transistor térmico o una guía de fibra para dicho dispositivo, o similar.

50 Una ventaja de usar un dispositivo 231 de registro de luz es que permite una medición precisa de las variaciones en la intensidad de la luz entrante en todo momento. Esto asegura que las variaciones en la intensidad de la luz 221 alterada debidas a la deriva en la intensidad de la luz láser se pueden compensar para evitar variaciones aparentes en la concentración de analito que de otro modo serían causadas por variaciones en la intensidad de la luz entrante. La señal registrada por la unidad de detección de luz en el espectrofotómetro se normaliza utilizando el valor medido

de la intensidad de la luz primaria. La normalización se puede hacer en el software cuando los datos se analizan y no en tiempo real.

5 Incorporar el dispositivo 231 de registro de luz en la sonda 201 óptica y posicionarlo después de acoplar la luz 205 entrante de la primera fibra 203 es una clara ventaja, ya que el proceso de acoplamiento de la luz láser en una fibra es bastante sensible tanto al ángulo en donde la luz del láser se enfoca en la fibra y la distancia entre el punto de enfoque de la lente, que enfoca el láser en la fibra y la fibra en sí. Las variaciones en la intensidad de la luz que sale de la fibra, por lo tanto, variarán como resultado de la eficiencia mediante la cual la luz láser se acopla en la fibra. Por lo tanto, el uso de un dispositivo de registro de luz colocado entre el láser y la fibra no proporcionará una medida precisa de las variaciones de intensidad de la luz enfocada en la piel. Sin embargo, la medición de la variación en la intensidad de luz entrante en la fuente de luz o en cualquier punto entre la fuente de luz y la piel está dentro de la invención en esta y otras realizaciones.

15 Además de los elementos ópticos descritos anteriormente, la sonda 201 óptica también puede estar equipada con al menos una primera abertura 233 óptica colocada antes del espectrofotómetro 227. La primera abertura 233 óptica funciona como un filtro de profundidad 3D que elimina las señales ópticas generadas fuera del área confocal, es decir, el punto 217 de enfoque. La ventaja de usar una sonda óptica confocal es que la luz 221 alterada que ingresa al espectrofotómetro 227 proviene únicamente de las interacciones entre la luz 205 entrante y la piel 213 en el punto 217 de enfoque; por lo tanto, las contribuciones de las áreas en forma de cono por encima y por debajo del punto 217 de enfoque se eliminan.

20 De acuerdo con esta primera realización de la invención, la primera abertura 233 está construida como un elemento espaciado. Sin embargo, una abertura estrecha de una segunda fibra (si está presente) que se conecta al espectrofotómetro 227 puede funcionar igualmente bien como una primera abertura 233.

25 Además de la primera abertura 233, se pueden emplear una o más aberturas para obtener un contraste más agudo en la dirección z (profundidad). Una segunda abertura 235 se coloca preferiblemente entre la segunda lente 215 y la piel 213. En una realización preferida, donde no hay ventana 219 y la segunda lente 215 es convexa o plano-convexa, la segunda lente 215 todavía estará en contacto directo con la piel 213 incluso con la segunda abertura 235 delgada colocada entre la piel 213 y la segunda lente 215.

En la realización actual de la invención, la segunda abertura 235 está construida como un elemento espaciado. Sin embargo, una abertura estrecha de la sonda 201 óptica en el punto donde la luz salidas/es recogida por la segunda lente 215 puede funcionar igualmente bien como una segunda abertura 235.

30 Una tercera abertura 237 se puede colocar preferiblemente justo antes de la tercera lente 225 como se muestra en la figura actual. Esto puede mejorar aún más el contraste en la dirección z.

35 La fibra 203 y el espectrofotómetro 227 están normalmente dispuestos de tal manera que la dirección 239 de la luz que sale de la primera fibra 203 y la dirección 241 de la luz que entra en el espectrofotómetro 227 están en un ángulo de  $\alpha = 90^\circ$  entre sí. También se pueden encontrar disposiciones alternativas de los dos componentes y, por consiguiente, la dirección de la luz que sale de/ingresa a ellos (239 y 241, respectivamente), produciendo un ángulo  $\alpha \neq 90^\circ$ .

La fibra 203 y una segunda fibra si están presentes son preferiblemente fibras de modo multimodo, pero también podrían ser fibras de modo individual.

40 Los detalles de una opción para la lente 215 objetivo se ven en la Figura 5. Aquí, la lente es una lente compuesta que tiene primero y segundo elementos 510 y 512, el elemento 512 se coloca distal con referencia al elemento 510. Los dos elementos de la lente se montan en las respectivas secciones 514, 516 de una carcasa cilíndrica entre las cuales se proporciona un elemento 518 de anillo piezoeléctrico. Se proporcionan medios (no mostrados) para aplicar una tensión al elemento 518 de anillo para hacer que su longitud axial varíe desplazando la sección 514 con respecto a sección 516, por lo que se altera la ubicación del punto focal de la lente 215.

45 En la Figura 6, se muestra una forma alternativa de objetivo de longitud focal variable en la que la sección 514 es un tornillo hembra roscado y está montado en un cilindro 520 macho con rosca de tornillo fijado a la sección 516 en una cabeza 522 anular. Las secciones 514 y 516 están espaciados por un espacio 524 variable. El paso de la rosca del tornillo es suficientemente fino para proporcionar el control necesario de la distancia focal. La rotación de la sección 514 desplaza la posición axial de la sección 514 a lo largo del cilindro 520 para alterar la longitud focal del objetivo.

50 Una alternativa adicional es que la lente objetivo sea intercambiable y que se proporcione una pluralidad de lentes objetivo de distancia focal fija diferente o como se mencionó anteriormente para una pluralidad de lentes objetivo de la misma distancia focal, cada una con un miembro de acoplamiento a piel diferente para definir diferentes profundidades de enfoque.

La Figura 11 muestra el perfil de profundidad deseable para el origen de las señales Raman tal como se reciben en la sonda y se pasan al espectrofotómetro. El origen de la profundidad es la superficie de la piel. La intensidad relativa indica la probabilidad de que un fotón surja de una profundidad dada alcanzando al espectrofotómetro. Los fotones que surgen a menos de 200  $\mu\text{m}$  por debajo de esta tienen pocas posibilidades de llegar al detector del espectrofotómetro. La mayoría de los fotones recibidos se originan entre 250 y 400  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie de la piel. Es probable que la intensidad de los picos Raman asociados con la concentración de un analito elegido, como la glucosa en el líquido intersticial, proporcione una base precisa para la medición.

Para verificar que las señales Raman de glucosa medidas se originan en el fluido intersticial y no en el estrato córneo, de acuerdo con la invención, se analizan las intensidades de otros picos del espectro Raman. Los espectros típicos se ven en la Figura 7.

Se puede observar que en la mayoría de estos espectros, el pico en  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  es algo más alto que el pico en  $893\text{-}6\text{ cm}^{-1}$ . Para estos espectros también se ha encontrado que la altura de los picos asociados con la glucosa se correlaciona bien con las mediciones de naturaleza química de glucosa en sangre.

El espectro del paciente No. 127, que está en la parte superior de la Figura 7, no proporcionó una correlación tan buena. La relación entre la altura del pico de  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  y la altura del pico de  $893\text{-}6\text{ cm}^{-1}$  en este caso fue inferior a 0.75, siendo en promedio de varias mediciones solo 0.34. Este paciente tenía un estrato córneo inusualmente grueso en el sitio de medición. Las mediciones de OCT muestran que para este paciente, el grosor del estrato córneo medido en la región de la pulpa del dedo fue de 350-500  $\mu\text{m}$  cuando para el paciente 114 fue de 150 a 300  $\mu\text{m}$ . Para el paciente 114, el promedio de la relación de altura de pico en varias mediciones fue de 1.23. En el espectro para el paciente 127, el orden de altura de estos dos picos se invierte.

La Figura 8 muestra una gráfica de la glucosa pronosticada obtenida usando la invención, con respecto a la glucosa medida químicamente para numerosos pacientes y se puede observar que las mediciones obtenidas del paciente 127 (puntos sólidos) no comparten la buena correlación general entre la medición Raman y la química.

La Figura 9 muestra una gráfica de correlación similar para varias mediciones diferentes realizadas en un paciente (paciente 114). Esto puede contrastarse con los puntos sólidos en la Figura 8.

Como se ve en la Figura 7, el espectro para cada paciente tiene un fondo ascendente o un nivel de referencia hacia números de onda más cortos. Las alturas máximas se miden desde el nivel de referencia local.

Después de la ubicación de la posición de pico, la línea de base de pico se puede estimar tomando el nivel de línea de base en cada lado del pico. La altura de la línea de base en cada lado se promedia y se resta de la intensidad en el pico máximo para generar la altura de pico corregida de la línea de base. Alternativamente, una línea de base polinómica con ventana podría estimarse mediante un enfoque iterativo y se podría restar en una región específica estrecha alrededor del pico. Esto moverá la línea base de la región espectral a alrededor de 0 y, por lo tanto, eliminará la línea base debajo del pico.

En el espectro del paciente No.127, también es notable que los picos en los números de onda  $1445\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  son inusualmente grandes. Cuando el pico en  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  es algo más alto que el pico en  $893\text{-}6\text{ cm}^{-1}$  pero los picos en los números de onda  $1445\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  son inusualmente grandes, puede haber motivos para desconfiar de la conveniencia de la profundidad de medición.

Como se ve en la Figura 10, incluso cuando la relación entre las alturas de los picos del pico de  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  y el pico de  $893\text{-}6\text{ cm}^{-1}$  es mayor que uno, es posible que la altura de los  $1445\text{ cm}^{-1}$  y los  $1650\text{ cm}^{-1}$  picos pueden ser inusualmente grandes. En la Figura 10, dicha relación tanto para el espectro del paciente 17 (superior) como para el espectro del paciente 107 (inferior) es mayor que uno, pero la altura del pico de  $1445\text{ cm}^{-1}$  para el paciente 17 es sustancialmente mayor que para el paciente 107. Se encontró que el error cuadrático medio de la validación cruzada de predicción (RMSEPCV) en las mediciones para el paciente 17 fue de 10.7 mmol/l, mientras que en promedio se ha encontrado que es solo de 2.5 mmol/l. Por consiguiente, puede preferirse rechazar la medición para un paciente como el paciente 17 y buscar un mejor sitio de medición.

Cualquiera o ambos de estos picos se pueden considerar como inusualmente grandes si se basan en una multiplicidad de mediciones, están a más de una desviación estándar por encima de la media de dichas mediciones, como se explicó anteriormente.

Cuando la proporción de los picos en los números de onda  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  y  $893\text{-}6\text{ cm}^{-1}$  está por debajo de 0.75 u otro número de corte seleccionado R, o los picos en los números de onda  $1445\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  son inusualmente grandes, de tal manera que hay motivos para desconfiar de la idoneidad de la disposición para medir la concentración de un componente de la piel del analito, se puede seleccionar un sitio de medición alternativo. Alternativamente, la sonda puede ajustarse manualmente o mediante un proceso automático para alterar la profundidad a partir de la cual se originan las señales Raman. Esto tendría el efecto de empujar hacia la derecha la ubicación del pico en la Figura 11. Por lo tanto, el usuario puede ajustar la sonda para aumentar la profundidad por debajo de la superficie de la piel en

la que se enfoca la lente y puede repetir el análisis de altura de pico. Alternativamente, la sonda puede ajustarse mediante la entrada desde el ordenador 111 para alterar la profundidad de enfoque hasta que se logren las relaciones de altura de pico requeridas.

5 Estas disposiciones de análisis de espectro y ajuste de lente se aplican a todas las siguientes realizaciones modificadas por igual.

10 La Figura 3 muestra una segunda realización de la invención, donde la sonda 301 óptica comprende una fibra 203 óptica de luz entrante para guiar la luz hacia la sonda 301 óptica, una primera lente 207 para colimar la luz 205 entrante, un primer filtro 209 que bloquea cualquier porcentaje entre 0 y 100 de frecuencias fuera de la frecuencia de la luz entrante, una segunda lente 215 que enfoca la luz 205 entrante en y para recoger la luz 221 alterada de la piel 213, un segundo filtro 223 para filtrar ópticamente la luz 221 alterada, una tercera lente 225 para enfocar la luz 221 alterada en un espectrofotómetro 227, y un dispositivo 231 de registro de luz, que detecta variaciones de intensidad en la luz entrante.

15 La fibra 203 y cualquier segunda fibra que pueda estar presente son preferiblemente fibras de modo multimodo, pero también podrían ser fibras de modo individual. La fibra 203 y el espectrofotómetro 227 están normalmente dispuestos de tal manera que la dirección de la luz que sale de la primera fibra 203 y la dirección de la luz que entra en el espectrofotómetro 227 son perpendiculares entre sí. También se pueden usar disposiciones alternativas de estos componentes 203 y 227 y, por consiguiente, la dirección de la luz que los emite/ingresa.

Los dos filtros 209 y 223 son normalmente un filtro de paso de banda, un filtro de muesca, un filtro de borde o similar. La segunda lente 215 es preferiblemente convexa, pero también podría ser esférica o plana.

20 La sonda 301 óptica comprende además un espejo 303 dicróico que refleja o transmite cualquier porcentaje entre 0 y 100 de la luz. El espejo 303 dicróico está en la realización actual posicionado en un ángulo de 45° con respecto a la dirección de propagación de la luz 205 entrante, pero también podría colocarse en un ángulo entre 0 y 90° de la misma forma.

25 De acuerdo con la segunda realización de la invención, el espejo 303 dicróico permite que la mayoría de la luz 205 entrante pase a través del espejo 303 dicróico y refleja solo una parte 229 más pequeña de la luz entrante que es detectada por el dispositivo 231 de registro de luz. La luz 221 alterada es reflejada por el espejo 303 dicróico en un ángulo aproximado de 90 grados.

30 En una realización de la invención, el porcentaje de la luz 205 entrante que se refleja y transmite por el espejo 303 dicróico es  $re_{in} \leq 30\%$  de  $(re_{in} + tr_{in})$  y  $tr_{in} \geq 70\%$  de  $(re_{in} + tr_{in})$ , respectivamente, y el porcentaje de luz 221 alterada que se refleja y transmite por el espejo 303 dicróico es  $re_{se} \geq 70\%$  de  $(re_{se} + tr_{se})$  y  $tr_{se} \leq 30\%$  de  $(re_{se} + tr_{se})$ , respectivamente.

35 En otra realización de la invención, el porcentaje de la luz 205 entrante que se refleja y transmite por el espejo 303 dicróico es  $re_{in} \leq 10\%$  de  $(re_{in} + tr_{in})$  y  $tr_{in} \geq 90\%$  de  $(re_{in} + tr_{in})$ , respectivamente, y el porcentaje de la luz 221 alterada que se refleja y transmite por el espejo 303 dicróico es  $re_{se} \geq 90\%$  de  $(re_{se} + tr_{se})$  y  $tr_{se} \leq 10\%$  de  $(re_{se} + tr_{se})$ , respectivamente.

40 La sonda 301 óptica puede además comprender opcionalmente una ventana 219 delgada que constituye un miembro de contacto con la piel, que se coloca entre la segunda lente 215 y la piel 213, una primera abertura 233 óptica, la segunda abertura 235 normalmente colocada entre la segunda lente 215 y la piel 213, y una tercera abertura 237 que normalmente se coloca justo antes de la tercera lente 225. Según esta segunda realización de la invención, las aberturas 233 y 235 están formadas en elementos separados. Sin embargo, una abertura estrecha de una segunda fibra que se comunica con el espectrofotómetro 227 puede funcionar igualmente bien como una primera abertura 233 y una abertura estrecha de la sonda 301 óptica en el punto donde la luz sale/es recogida por la segunda lente 215 puede funcionar igualmente bien como primera abertura 233.

45 La profundidad 220 de penetración en la piel se fija de nuevo idealmente en 200 (o 210)–300  $\mu\text{m}$ . Además, puede hacerse ajustable para otros usos y, de nuevo, las profundidades típicas de penetración de la muestra 220 están entonces en un rango de 150 a 500  $\mu\text{m}$  dependiendo de la distancia 218 focal de la segunda lente 215 y el grosor de la ventana 219, si es parte de la sonda 301 óptica. También se pueden obtener profundidades de penetración tanto más cortas como más largas.

50 Las ventajas con la sonda 301 óptica son las mismas que las descritas en relación con la sonda 201 óptica que se muestra en la Figura 2.

La Figura 4 muestra una tercera realización de la invención, donde la sonda 401 óptica comprende una fibra 203 óptica de luz entrante para guiar la luz hacia la sonda 301 óptica, una primera lente 207 para colimar la luz 205 entrante, un primer filtro 209 que bloquea cualquier porcentaje entre 0 y 100 de frecuencias fuera de la frecuencia de la luz entrante, una segunda lente 215 que enfoca la luz 205 entrante en y para recoger la luz 221 alterada de la piel 213, un segundo

filtro 223 para filtrar ópticamente la luz 221 alterada, una tercera lente 225 para enfocar la luz 221 alterada en un espectrofotómetro 227, y un dispositivo 231 de registro de luz, que detecta variaciones de intensidad en la luz entrante.

- 5 Como antes, la fibra 203 y cualquier fibra adicional que esté presente son preferiblemente fibras de modo multimodo, pero también podrían ser fibras de modo individual. Las dos fibras 203 y 227 están dispuestas normalmente de manera que la dirección de la luz que sale de la primera fibra 203 y la dirección de la luz que entra en el espectrofotómetro 227 son perpendiculares entre sí. También se pueden encontrar disposiciones alternativas de las dos fibras 203 y 227 y, en consecuencia, la dirección de la luz que las emite/ingresa.

Los dos filtros 209 y 223 son normalmente un filtro de paso de banda, un filtro de muesca, un filtro de borde o similar. La segunda lente 215 es preferiblemente convexa, pero también podría ser esférica o plana.

- 10 La sonda 401 óptica comprende además un espejo 403 dicroico que refleja o transmite cualquier porcentaje entre 0 y 100 de la luz. El espejo 403 dicroico está en la realización actual posicionado en un ángulo de 45° con respecto a la dirección de propagación de la luz 205 entrante, pero también podría colocarse en un ángulo entre 0 y 90° también.

- 15 De acuerdo con la tercera realización de la invención, el espejo 403 dicroico refleja la mayor parte de la luz 205 entrante en un ángulo de 90 grados sobre la piel 213 y permite que la luz 221 alterada pase a través de ella. Al contrario de la primera y la segunda formas de realización, la parte más pequeña 229 de la luz entrante, que se utiliza para el registro de la luz, no se recoge después de pasar a través del espejo 403 dicroico o de reflejarse en él. En cambio, un dispositivo óptico de división 405 colocado entre el primer filtro 209 y el espejo 403 dicroico se emplean para dirigir una fracción 229 más pequeña de la luz entrante al dispositivo 231 de registro de luz. El dispositivo 405 divisor puede ser un divisor de haz, un espejo dicroico que permite que pase la mayor parte de la luz entrante, un filtro de baja densidad o similar.
- 20

En una realización de la invención, el porcentaje de la luz 205 entrante que se refleja y transmite por el espejo 403 dicroico es  $re_{in} \geq 90\%$  de  $(re_{in} + tr_{in})$  y  $tr_{in} \leq 10\%$  de  $(re_{in} + tr_{in})$ , respectivamente, y el porcentaje de luz 221 alterada que se refleja y transmite por el espejo 403 dicroico es  $re_{se} \leq 10\%$  de  $(re_{se} + tr_{se})$  y  $tr_{se} \geq 90\%$  de  $(re_{se} + tr_{se})$ , respectivamente.

- 25 La sonda 401 óptica puede además comprender opcionalmente una ventana 219 delgada, que se coloca entre la segunda lente 215 y la piel 213, una primera abertura 233 óptica, la segunda abertura 235 normalmente colocada entre la segunda lente 215 y la piel 213, y una tercera abertura 237 normalmente se coloca justo antes de la tercera lente 225. Según esta segunda realización de la invención, las aberturas 233 y 235 están formadas cada una como un elemento espaciado. Sin embargo, una abertura estrecha de una segunda fibra que se comunica con el espectrofotómetro 227 puede funcionar igualmente bien como una primera abertura 233 y una abertura estrecha de la sonda 201 óptica en el punto donde la luz sale/es recogida por la segunda lente 215 puede funcionar igualmente bien como primera abertura 233.
- 30

- 35 Las profundidades 220 típicas de penetración de la muestra están en un rango de 150-500  $\mu\text{m}$  dependiendo de la distancia 218 focal de la segunda lente 215 y el grosor de la ventana 219, si es parte de la sonda 401 óptica. También se pueden obtener profundidades de penetración tanto más cortas como más largas.

Las ventajas con la sonda 401 óptica son las mismas que las descritas en relación con la sonda 201 óptica que se muestra en la Figura 2.

- 40 Las sondas ópticas 201, 301 y 401 están todas construidas de tal manera que los elementos ópticos en su interior están colocados muy cerca unos de otros, y las Figuras 2-4 son solo ilustraciones y no muestran las distancias precisas entre los diferentes elementos ópticos.

Una ventaja de colocar los elementos ópticos dentro de la sonda óptica lo más cerca posible, es que esta característica mejora tanto la intensidad de la luz entrante en el punto de enfoque de la muestra como la eficiencia con la que se recolecta la luz alterada, ya que los efectos de la difracción de la luz entrante y/o la luz alterada disminuye.

#### Ejemplos

- 45 El aparato en general como se describió anteriormente con referencia a la Figura 2, pero omitiendo la ventana 235, se configuró para enfocar su salida de luz a una profundidad de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  más allá de la cara inferior de la lente 215 objetivo que se puso directamente en contacto con la piel de la yema del dedo de una serie de voluntarios.

- 50 Se obtuvo un espectro Raman de cada paciente. Los resultados de la muestra se muestran en la Figura 7. Se observó si se podría obtener una medición significativa de la concentración de glucosa de cada paciente. En un caso (paciente 127) se observó que el estrato córneo era demasiado grueso para que esto fuera posible. Se puede ver en la Figura 7 que las alturas relativas de los picos en  $883/4 \text{ cm}^{-1}$  y  $893/4/5/6 \text{ cm}^{-1}$  se invierten en comparación con los otros pacientes, siendo el pico de colágeno tipo I en  $883/4 \text{ cm}^{-1}$  más pequeño que el de  $893/5/6 \text{ cm}^{-1}$  de pico de desoxirribosa fosfodiéster adyacente. Esto se debe a las diferentes abundancias de colágeno tipo I y ADN por encima y por debajo

5 del piso del estrato córneo. Un pico de  $883/4 \text{ cm}^{-1}$  relativamente algo más alto o más preferiblemente más alto que el pico de  $893-6 \text{ cm}^{-1}$  es consistente con una situación tal que la señal recolectada se origine en la parte de la piel debajo del estrato córneo. Un pico de  $893-6 \text{ cm}^{-1}$  solo un poco menos alto o incluso relativamente más alto que el pico de  $883/4 \text{ cm}^{-1}$  es un valor atípico que tiene un estrato córneo más grueso de lo normal e indica que la señal se origina desde dentro del estrato córneo.

Los picos relativamente altos a  $1445 \text{ cm}^{-1}$  y  $1650 \text{ cm}^{-1}$  también indican un valor atípico, es decir, un paciente con un estrato córneo grueso, que conduce a la señal que probablemente se derive del estrato córneo.

Al detectar la altura relativa de estos picos, el aparato pudo proporcionar una salida que indicaba si el estrato córneo de cada paciente era lo suficientemente delgado como para obtener una buena lectura de glucosa.

10 Como seguridad adicional, cuando la relación de los picos de  $883/4 \text{ cm}^{-1}$  y  $893-896 \text{ cm}^{-1}$  está por encima de un umbral seleccionado, de modo que la situación sea consistente con las señales que surgen desde debajo del estrato córneo, se puede elegir considerar que tal situación es dudosa si al mismo tiempo los picos de  $1445 \text{ cm}^{-1}$  y  $1650 \text{ cm}^{-1}$  son relativamente grandes en comparación con su tamaño medio en una muestra estadísticamente relevante de dichas mediciones en otros sitios y en otras personas.

15 La Figura 12 muestra los espectros Raman obtenidos utilizando un aparato ajustado a una profundidad focal muy corta de  $160 \mu\text{m}$  en aire, que es demasiado corta para realizar mediciones de glucosa en la piel. Los espectros separados en la Figura 12 se obtuvieron de las yemas de los dedos de cada dedo y del pulgar y también del tenar. El estrato córneo será más grueso en el pulgar y más delgado en el tenar. Es observable que un pico a  $1420 \text{ cm}^{-1}$  es más grande en el pulgar y más pequeño en el espectro del tenar. Este pico puede originarse a partir de 2-desoxirribosa, un  
20 componente del ADN. Como los espectros se originan en la parte superior del estrato córneo, debido al corto enfoque utilizado, estos hallazgos pueden indicar una mayor concentración de ADN en las capas superiores del estrato córneo. Esto podría deberse a un menor contenido de agua.

25 Un pico relativamente grande en esta ubicación también se puede tomar como una indicación de que el espectro Raman se está obteniendo desde una profundidad muy baja por debajo de la superficie de la piel, lo que indica la necesidad de reajustar el aparato. En particular, si el pico a  $1420 \text{ cm}^{-1}$  es mayor que  $1/3$  del tamaño del pico a  $1445 \text{ cm}^{-1}$ , entonces el sistema debe considerarse como no configurado adecuadamente para mediciones de concentración confiables y la profundidad del enfoque de la luz y la profundidad a partir de la cual se recogen las señales Raman deben aumentarse.

Lista de números de referencia:

- 30 101: Sonda óptica  
103: Fuente de luz, por ej. un laser  
105: fibra óptica de luz entrante  
107: Muestra, es decir, un brazo de un paciente.  
109: Conexión de señal eléctrica
- 35 111: Ordenador  
201: Sonda óptica según la primera realización.  
203: Fibra óptica de luz entrante  
205: Luz entrante  
207: Primera lente
- 40 209: Primer filtro  
211: Espejo dicróico  
213: Piel  
215: Segunda lente  
217: Punto de enfoque
- 45 218: Longitud focal de la primera lente

- 219: Ventana
- 220: Profundidad de penetración
- 221: Luz alterada
- 223: Segundo filtro
- 5 225: Tercer lente
- 227: Espectrofotómetro
- 229: Parte menor de la luz entrante utilizada para el registro de luz
- 231: Dispositivo de registro de luz
- 233: Primera apertura
- 10 235: Segunda apertura
- 237: Tercera apertura
- 301: Sonda óptica según la segunda realización.
- 303: Espejo dicroico
- 401: Sonda óptica según la tercera realización.
- 15 403: Espejo dicroico
- 405: Dispositivo de división óptica
- 510: lente de primer elemento compuesto
- 512: lente de segundo elemento compuesto
- 514: primera sección de la carcasa de la lente
- 20 516: segunda sección de la carcasa de la lente
- 518: elemento de anillo piezoeléctrico
- 520: cilindro roscado
- 522: cabeza anular
- 524: brecha variable
- 25 En esta especificación, a menos que se indique expresamente lo contrario, la palabra 'o' se usa en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando se cumple una o ambas de las condiciones establecidas, en oposición al operador 'exclusivo o' que requiere que sólo se cumpla una de las condiciones. La palabra "que comprende" se utiliza en el sentido de "incluir" en lugar de significar "que consiste en". Ningún reconocimiento de ningún documento publicado anteriormente en este documento debe considerarse como una admisión o
- 30 representación de que su enseñanza fue de conocimiento general en Australia o en cualquier otro lugar a la fecha del presente documento.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir si un espectro de señales Raman que se recibe transdérmicamente en un aparato detector confocal y tiene al menos un componente que se espera que tenga una intensidad que represente la concentración de un componente de la piel en un punto de origen de dichas señales Raman debajo de la superficie de la piel representará con precisión dicha concentración, cuyo método comprende analizar las características de dicho espectro relacionadas con componentes de la piel distintos del componente de la piel cuya concentración se va a medir y, por lo tanto, determinar si las señales Raman se originan primariamente en el estrato córneo para que el espectro menos probablemente represente dicha concentración con precisión o se origine principalmente por debajo del estrato córneo, de modo que el espectro más probablemente represente dicha concentración, **caracterizado porque** el método comprende analizar mediante una unidad de análisis de señal dichas señales para comparar las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel y señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de la piel, en donde dichas intensidades relativas son indicativas de si las señales Raman se originan primariamente dentro del estrato córneo o primariamente debajo del estrato córneo y en donde dicho primer componente de piel produce un primer pico en el espectro Raman en  $883\text{-}884\text{ cm}^{-1}$  y en donde dicho segundo componente de piel produce un segundo pico en el espectro Raman en  $893\text{-}896\text{ cm}^{-1}$ .
2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho primer componente de la piel es colágeno tipo I.
3. Un método como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho segundo componente de la piel es ADN y la señal respectiva surge de los enlaces fosfodiéster de los mismos.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa de comparar las intensidades de dichos picos primero y segundo y producir una salida indicativa de que las señales surgen desde debajo del estrato córneo si el tamaño de dicho primer pico dividido por el tamaño de dicho segundo pico es más que un valor R seleccionado.
5. Un método como se reivindica en la reivindicación 4, en donde R se selecciona para que sea uno de 0.75, 0.95 o 1.0.
6. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde si la comparación de las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel y las señales Raman que se originan de un segundo componente de la piel es indicativa de que las señales Raman se originan primariamente por debajo del estrato córneo, dicho método comprende además determinar si el tamaño de un pico adicional en el espectro asociado con un componente de la piel que prevalece en el estrato córneo es más que y desviaciones estándar mayor que un valor medio para el tamaño de ese pico en una muestra estadísticamente válida de espectros similares, indicando una determinación positiva una probabilidad de que las señales Raman no se originen principalmente por debajo del estrato córneo, en donde y es un valor preseleccionado en el rango de 0.5 a 2.
7. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, que comprende además ajustar dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico en respuesta a un hallazgo de que las señales Raman se originan primariamente desde dentro del estrato córneo, alterando dicho ajuste la profundidad de origen de dichas señales Raman de manera que ya no se determina que la profundidad esté dentro del estrato córneo.
8. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, en donde dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico comprende una lente objetivo que tiene una distancia focal y dicho método para alterar la profundidad de origen de las señales Raman comprende alterar la longitud focal de la lente objetivo mediante el reemplazo de la lente objetivo o mediante el ajuste de la lente objetivo.
9. Un método como se reivindica en la reivindicación 8, en donde dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico comprende una lente objeto compuesta que comprende al menos un primer elemento y un segundo elemento espaciado del primer elemento, y dicho método de alterar la profundidad de origen de las señales Raman comprende alterar el espaciado de dos o más elementos para ajustar la longitud focal de la lente objetivo compuesta.
10. Aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico para la medición in vivo no invasiva mediante espectroscopía Raman de la concentración de un componente de la piel presente en la piel de un sujeto, que comprende una fuente de luz, componentes ópticos que definen una trayectoria de luz desde dicha fuente de luz hasta una ubicación de medición, una unidad de análisis de espectro, componentes ópticos que definen una ruta de retorno para la luz dispersada Raman desde dicha ubicación de medición a dicha unidad de análisis de espectro, en donde dicha unidad de análisis de espectro opera para determinar si el origen de las señales Raman recibidas en el mismo se encuentra dentro del estrato córneo o por debajo de él analizando las características de la luz Raman dispersada relacionada con componentes de la piel distintos del componente de la piel cuya concentración se va a medir y, de ese modo, determinar si las señales Raman se originan primariamente en el estrato córneo o primariamente debajo del estrato córneo **caracterizado porque** dicha unidad de análisis de espectro opera analizando dichas señales para comparar las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel

y las señales Raman que se originan a partir de un segundo componente de la piel, en donde dichas intensidades relativas son indicativas de si las señales Raman se originan primariamente dentro del estrato córneo o primariamente debajo del estrato córneo, y

5 en donde dicha unidad de análisis de espectro determina una relación entre el tamaño de un primer pico en el espectro Raman en  $883-884\text{ cm}^{-1}$  y el tamaño de un segundo pico en el espectro Raman en  $893-896\text{ cm}^{-1}$ .

11. Aparato como se reivindica en la reivindicación 10, en donde dicha unidad de análisis de espectro produce una salida indicativa de que las señales surgen desde debajo del estrato córneo si el tamaño de dicho primer pico dividido por el tamaño de dicho segundo pico es más que un valor R seleccionado.

10 12. Aparato como se reivindica en la reivindicación 11, en donde R se establece previamente como uno o más de 0.75, 0.95 o 1.0.

15 13. Aparato como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde si la unidad de análisis de señales determina que la comparación de las intensidades relativas de las señales Raman que se originan a partir de un primer componente de la piel y las señales Raman que se originan de un segundo componente de la piel es indicativa de que las señales Raman se originan primariamente por debajo del estrato córneo, dicha unidad de análisis de señales determina además si el tamaño de un pico adicional en el espectro asociado con un componente de la piel que prevalece en el estrato córneo es más que y desviaciones estándar mayor que un valor medio para el tamaño de ese pico en una muestra estadísticamente válida de espectros similares, una determinación positiva que indica una probabilidad de que las señales Raman no se originen principalmente por debajo del estrato córneo, en donde y es un valor preseleccionado en el rango de 0.5 a 2.

20 14. Aparato como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde dicho aparato detector confocal de funcionamiento transdérmico comprende una lente objetivo que tiene una longitud focal ajustable.

25 15. Aparato como se reivindica en la reivindicación 14, en donde dicha lente objetivo es una lente objetivo compuesta que comprende al menos un primer elemento y un segundo elemento espaciado del primer elemento, y dicha lente es ajustable alterando el espaciamiento de dos o más elementos para ajustar la distancia focal de la lente objetivo compuesta.

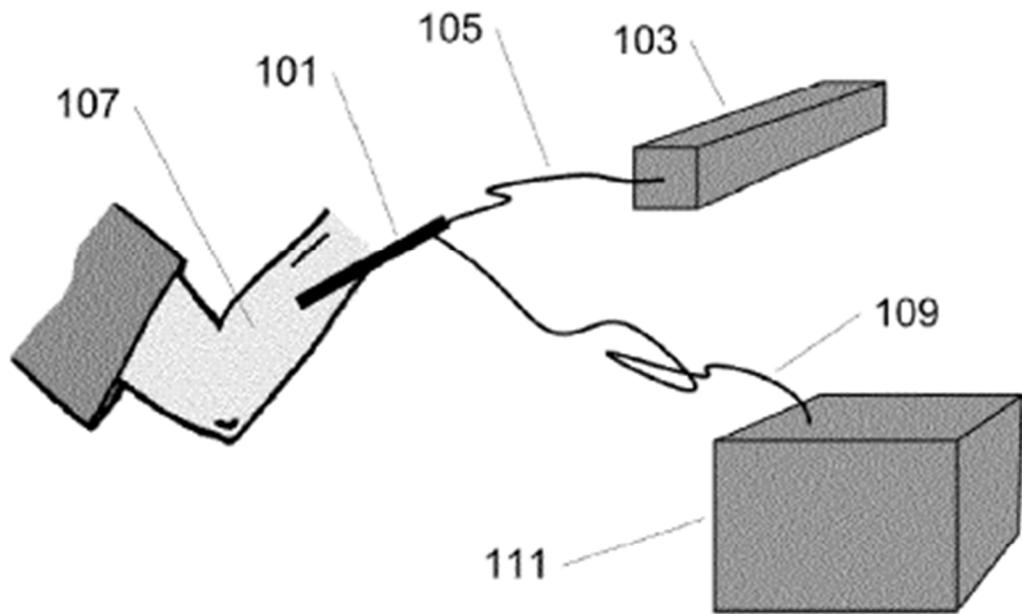


Figura 1

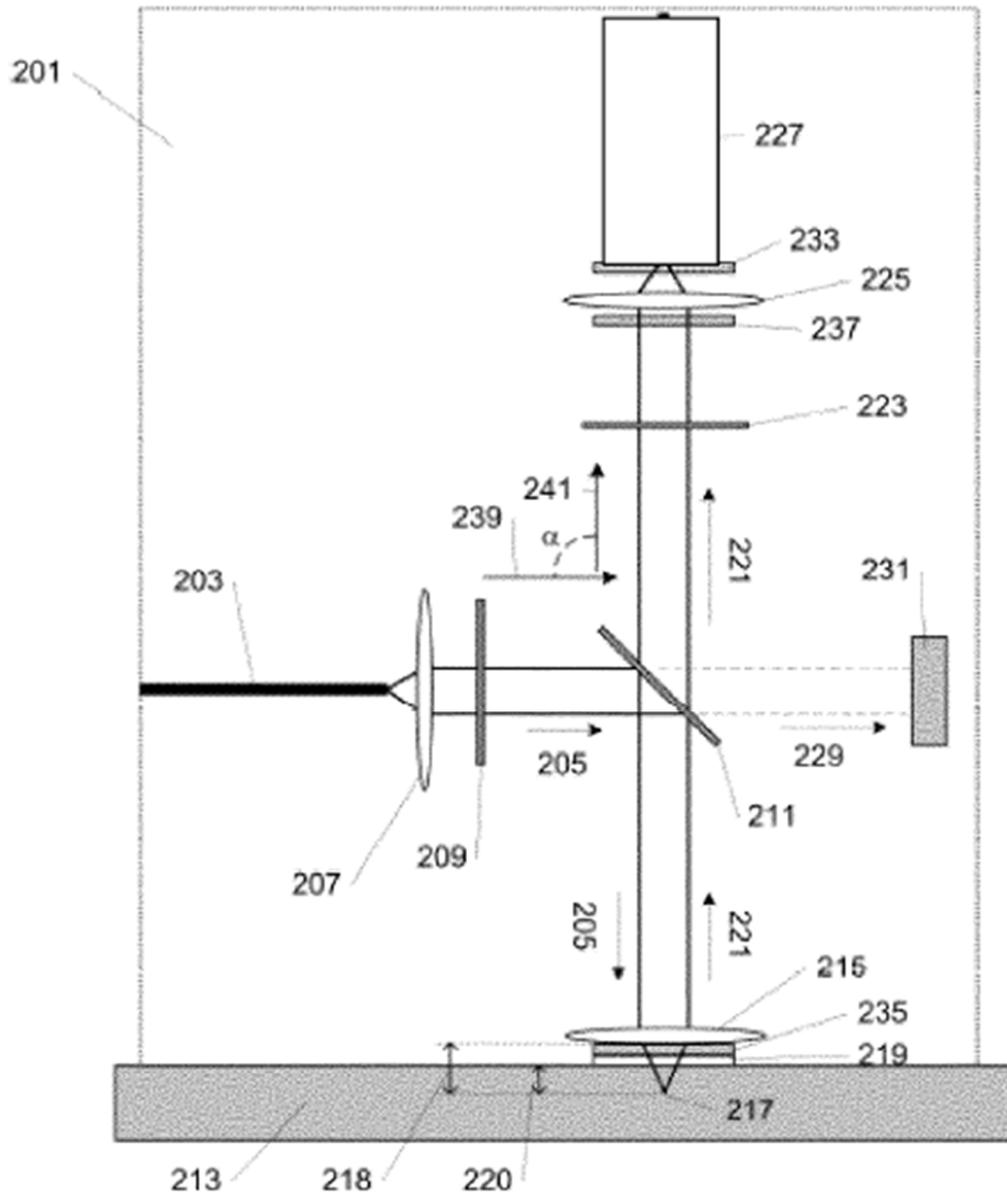


Figura 2

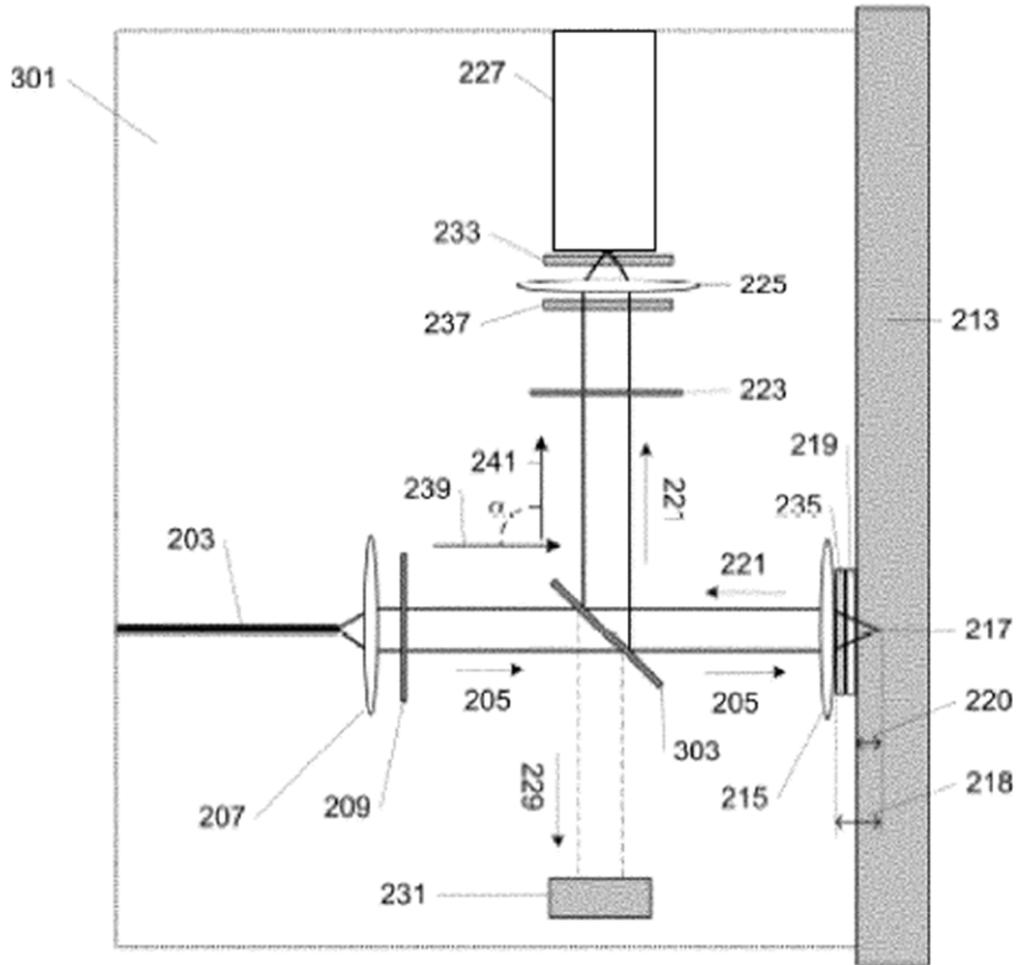


Figura 3

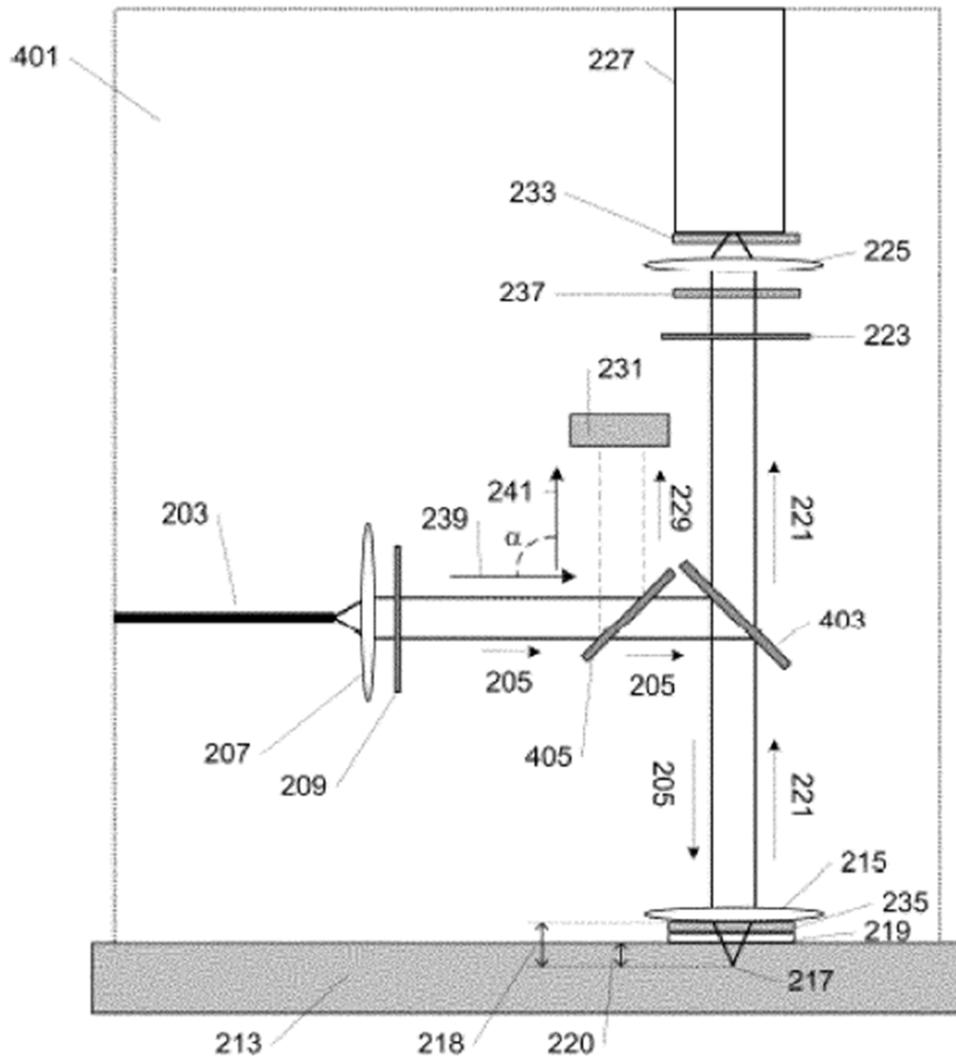


Figura 4

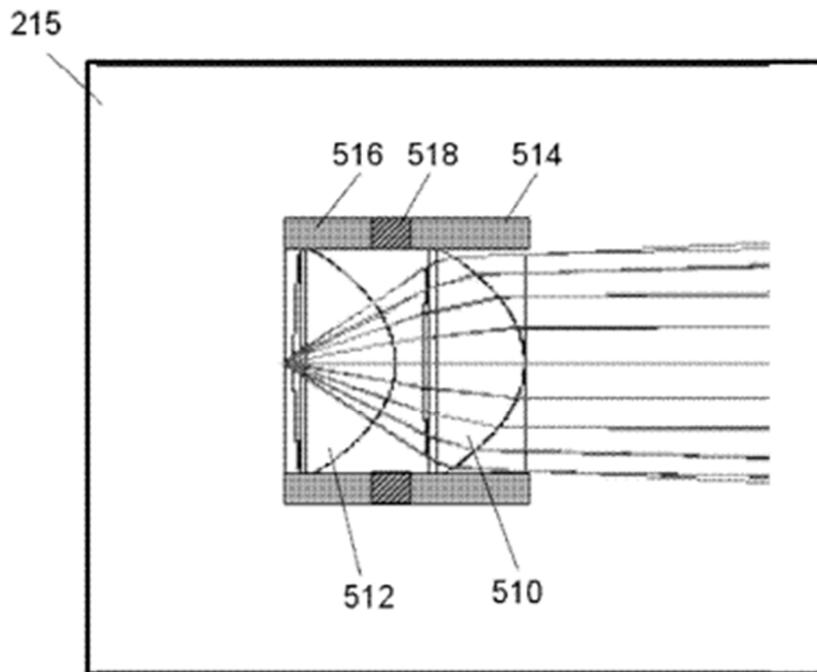


Figura 5

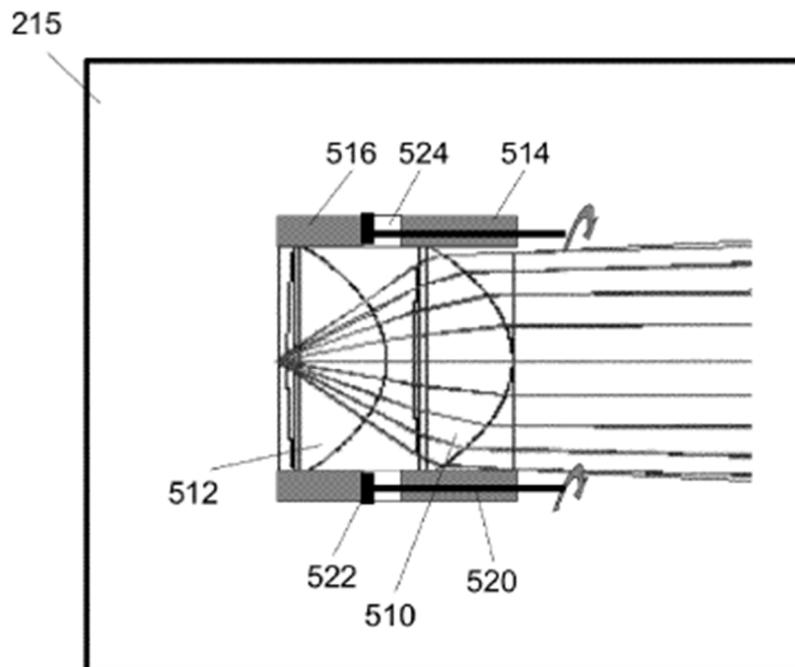


Figura 6

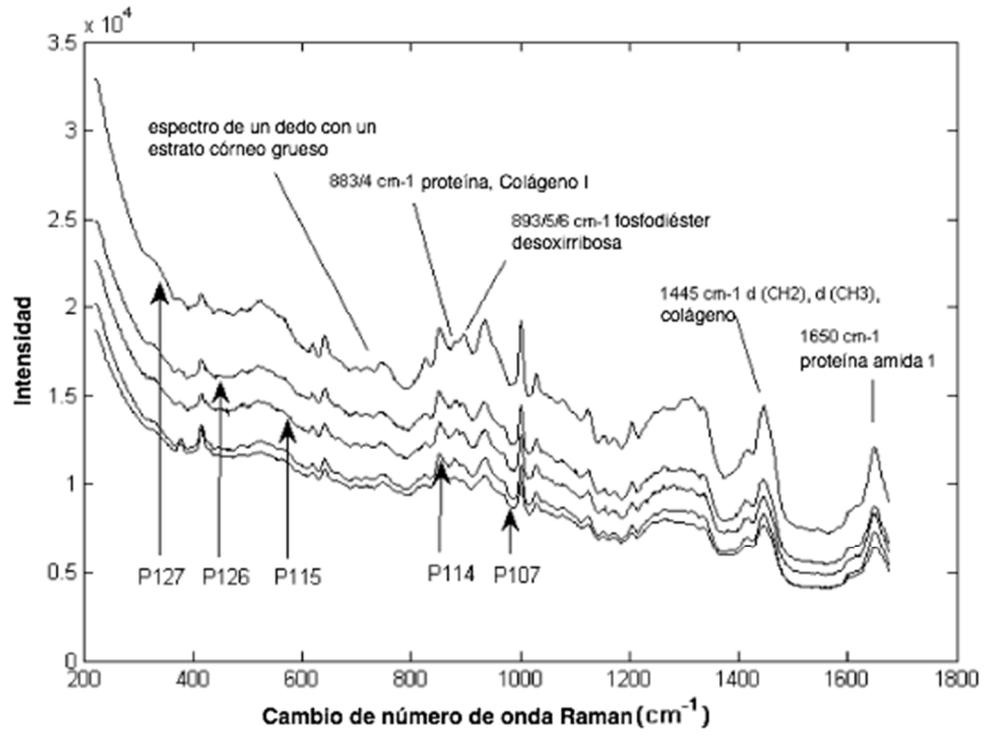


Figura 7

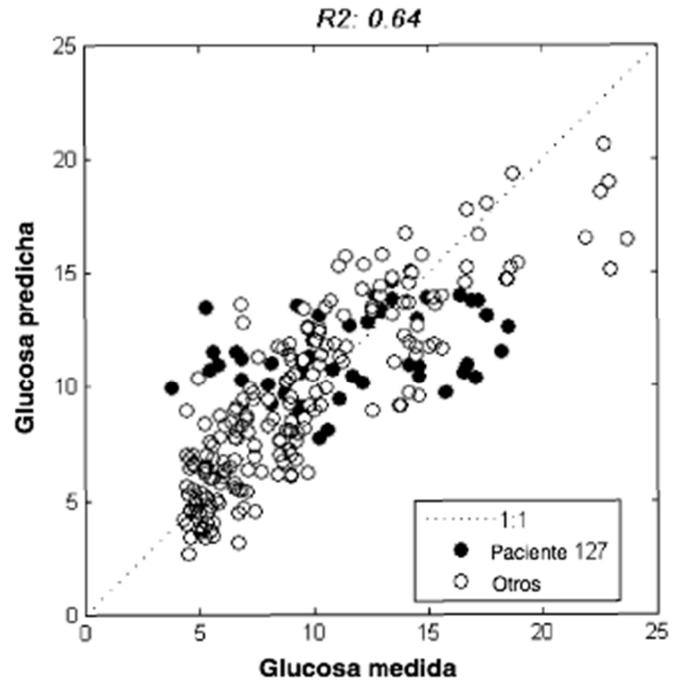


Figura 8

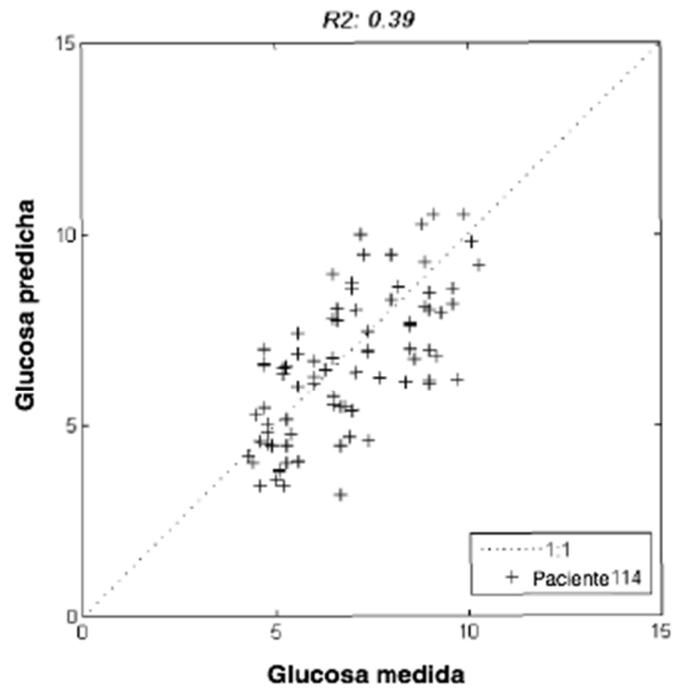


Figura 9

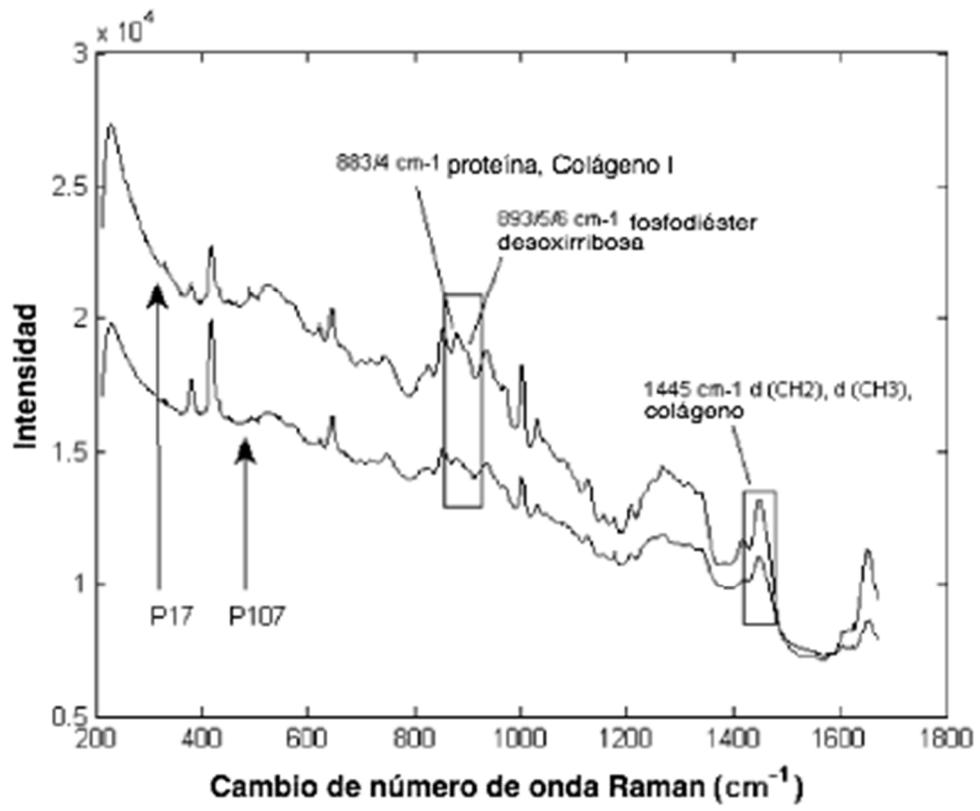


Figura 10

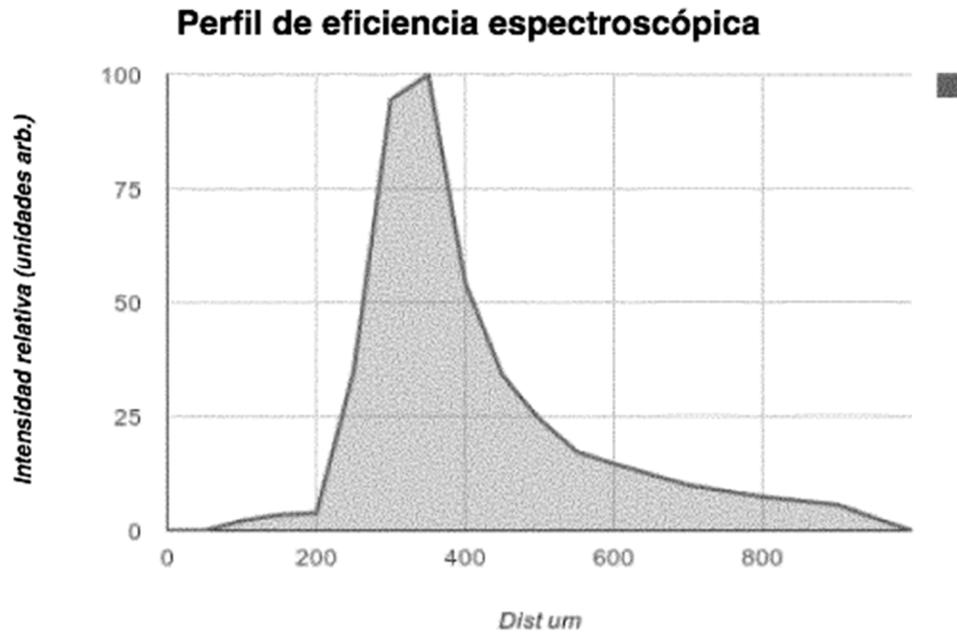


Figura 11

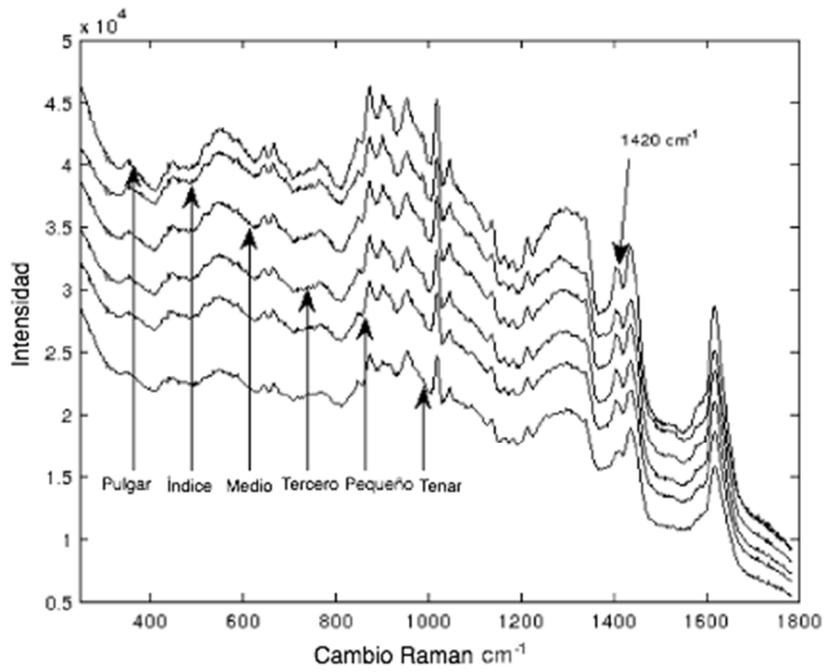


Figura 12