

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 648**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012 PCT/GB2012/051188**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12729693 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2715369**

54 Título: **Calibración de un biosensor de glucosa óptico utilizando distintas soluciones de calibración por temperatura**

30 Prioridad:

27.05.2011 US 201161490951 P
03.08.2011 GB 201113435

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2019

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

BARWELL, NICHOLAS PAUL;
EDGLEY, PETER;
MACKENZIE, ALASDAIR ALLAN;
PATERSON, WILLIAM y
CRANE, BARRY COLIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 719 648 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

Calibración de un biosensor de glucosa óptico utilizando distintas soluciones de calibración por temperatura

5 **Campo**

El presente documento describe un método para la calibración de un sensor para la detección de un analito. En realizaciones particulares, el método de calibración de un sensor se puede utilizar en el punto de uso.

10 **Antecedentes**

El objetivo habitual en el desarrollo de un sensor químico o biosensor es producir una señal electrónica digital, cuya magnitud depende de la concentración de un producto químico específico o conjunto de productos químicos (analito). El sensor habitualmente incluye dos componentes principales, una parte química o biológica que reacciona o forma un complejo con el analito en cuestión (idealmente de forma específica) para formar nuevos productos químicos o biológicos, o cambios en la energía que pueden detectarse mediante el segundo componente, un transductor. Se puede decir que el componente químico/biológico actúa como un receptor/indicador para el analito. Se puede usar una variedad de métodos de transducción, incluyendo electroquímicos (tales como potenciométricos, amperométricos, conductimétricos, impedimétricos), ópticos, calorimétricos y acústicos. Después de la transducción, la señal habitualmente se convierte en una señal digital electrónica.

Dado que la señal generada por la reacción química/biológica con el analito habitualmente depende no solo de la concentración del analito sino también de las características del propio sensor, estos sensores habitualmente precisan una calibración antes de poder utilizarse cuantitativamente. La forma en que la señal varía con la concentración de analito determina la forma de la curva de calibración (señal frente a la concentración de analito) y puede definir el número de puntos de calibración. Las curvas de calibración típicas pueden ser una línea recta, exponenciales, con forma s , etc. y el principio de la calibración se aplica a todas las metodologías de transducción para sensores químicos o biológicos. Idealmente, el sensor debe calibrarse justo antes de su uso, dado que algunas características del sensor que pueden afectar la curva de calibración varían con el tiempo (efecto debido al paso del tiempo). A menudo ocurre que el tiempo entre la fabricación y el uso del sensor puede ser de muchos meses, por lo que la calibración en el punto de fabricación puede conducir a imprecisiones en el resultado final.

En el caso de un sensor médico, es posible que se precise que un médico o enfermero asistente realice la calibración mientras se mantiene la esterilidad del sensor. Las limitaciones adicionales aplicadas por el médico/enfermero son que el procedimiento de calibración debe ser simple de realizar, de manera ideal invisible para la persona que realiza la calibración, y debe finalizarse rápidamente (preferentemente en menos de 10 minutos). La calibración de muchos de los sensores médicos disponibles actualmente precisa que el médico/enfermero lleve a cabo una serie de etapas específicas que pueden conducir a errores o imprecisiones en la medición si el procedimiento no se sigue correctamente.

Por lo tanto, existe la necesidad de un método de calibración de un sensor que evite las imprecisiones provocadas por los efectos debidos al paso del tiempo, y que sea un procedimiento simple, que se pueda llevar a cabo en el punto de uso por un usuario sin experiencia.

En el artículo de Tierney *et al.*, "Determination of glucose levels using a functionalized hydrogel-optical fiber biosensor: towards continuous monitoring of blood glucose *in vivo*", *Analytical Chemistry*, vol. 81, n.º 9, 2009, pág. 3630-3636, describen el uso de una matriz de hidrogel que contiene ácido 3-fenilborónico y dimetilaminopropilacrilamida en un sensor de glucosa.

50 **Sumario**

En el presente documento se describe un método para la calibración de un sensor de unión reversible para la detección de un analito. El método incluye al menos las siguientes etapas:

- (i) variar la temperatura de una primera solución de calibración de una primera temperatura (T_1) a una segunda temperatura (T_2) mientras la primera solución de calibración está en contacto con una región de detección del sensor;
- (ii) determinar la salida del sensor para la primera solución de calibración en función de la temperatura;
- (iii) variar la temperatura de una segunda solución de calibración de una tercera temperatura (T_3) a una cuarta temperatura (T_4) mientras que la segunda calibración tiene una concentración de analito que es distinta de la de la primera solución de calibración;
- (iv) determinar la salida del sensor para la segunda solución de calibración en función de la temperatura; y
- (v) usar la salida del sensor determinada en las etapas (ii) y (iv) para calibrar el sensor;

65 en donde el analito se une reversiblemente a un receptor en una región de detección del sensor en una relación de analito:receptor de 1:1

La curva de calibración para un sensor depende normalmente de la temperatura. Por ejemplo, cuando un sensor detecta un analito uniéndose reversiblemente al analito, la constante de equilibrio para el enlace reversible, que depende de la temperatura, afectará la curva de calibración. Por consiguiente, si la temperatura a la que se lleva a cabo la calibración no es idéntica a la temperatura a la que se usa el sensor, y no se tiene en cuenta la dependencia de la temperatura de los parámetros del sensor determinados durante la calibración, los parámetros de la calibración podrían no ser precisos. Por lo tanto, se pueden introducir errores en las lecturas de concentración del analito proporcionadas por el sensor.

Un método de calibración para un sensor biológico puede asumir que la medición se hace siempre a 37 °C, y tiene como objetivo proporcionar una curva de calibración adecuada para su uso a esa temperatura. Sin embargo, no todos los pacientes tienen exactamente la misma temperatura. Por lo tanto, este tipo de calibración puede conducir a resultados inexactos en pacientes que tienen una temperatura superior o inferior a 37 °C.

Un método de calibración para un sensor biológico también podría precisar que se determine un coeficiente de temperatura en el punto de fabricación. En tales métodos, los coeficientes de temperatura se pueden determinar llevando a cabo una calibración convencional a múltiples temperaturas fijas, por ejemplo 3 temperaturas fijas. Por lo tanto, tales métodos pueden implicar (a) tomar lecturas de salida del sensor para una primera, segunda y tercera solución de calibración, teniendo cada solución de calibración una concentración de analito distinta y tomándose cada lectura a una primera temperatura; (b) tomar un segundo conjunto de lecturas de salida del sensor para la primera, segunda y tercera solución de calibración, tomándose cada lectura en el segundo conjunto a una segunda temperatura; y (c) tomar un tercer conjunto de lecturas de salida del sensor para la primera, segunda y tercera solución de calibración, tomándose cada lectura en el tercer conjunto a una tercera temperatura.

La calibración a múltiples temperaturas fijas es lenta, precisa la estabilización de la temperatura del sensor, es difícil de automatizar y de realizar mientras se mantiene la esterilidad del sensor. Por consiguiente, es más fácil confiar en un coeficiente de temperatura promedio determinado en el punto de fabricación para un lote de sensores, y después aplicarlo a la curva de calibración para todos los sensores de ese lote. Dicho enfoque tiene la desventaja de que los coeficientes de temperatura promedio no están optimizados para ningún sensor en particular al que se puedan aplicar. Adicionalmente, la dependencia de la temperatura de un sensor puede cambiar a lo largo del tiempo transcurrido entre la fabricación y el uso, lo que puede llevar a imprecisiones adicionales debido a los efectos debidos al paso del tiempo.

El método descrito actualmente mejora estos métodos, y en particular aborda los efectos debido al paso del tiempo observados en la técnica, al proporcionar una calibración que puede finalizarse completamente en el punto de uso y que evita la necesidad de usar los coeficientes de temperatura generados en el momento de la fabricación. Esto se logra determinando la salida del sensor en función de la temperatura para al menos dos soluciones de calibración con distintas concentraciones.

En el contexto de la presente divulgación, "determinar la salida del sensor en función de la temperatura" significa medir la tasa de cambio de la señal frente a la temperatura. Esto se puede lograr, por ejemplo, tomando lecturas de salida del sensor a cada una de dos o más temperaturas, a medida que se varía la temperatura de una solución de calibración. Después, las lecturas de salida y las temperaturas se pueden analizar para determinar cómo un cambio en la temperatura afecta la salida del sensor para esa solución de calibración.

De este modo, este método puede determinar los parámetros necesarios para la calibración y su dependencia de la temperatura, sin prolongar el tiempo de calibración y sin necesidad de estabilizar la temperatura del sensor. Este método se puede llevar a cabo rápidamente, se puede automatizar y es adecuado para la calibración en el punto de uso.

En algunas realizaciones, el método incluye adicionalmente:

- (vi) variar la temperatura de una tercera solución de calibración de una quinta temperatura (T_5) a una sexta temperatura (T_6) mientras la tercera solución de calibración está en contacto con la región de detección, teniendo la tercera solución de calibración una concentración de analito que es distinta de las de las primera y segunda soluciones de calibración; y
- (vii) determinar la salida del sensor para la tercera solución de calibración en función de la temperatura;

en donde la etapa (v) incluye el uso de la salida del sensor determinada en las etapas (ii), (iv) y (vii) para calibrar el sensor.

La tercera solución de calibración puede tener una concentración de analito distinta de la primera y la segunda soluciones. Determinando la salida del sensor en función de la temperatura para esta tercera solución, se puede generar un tercer conjunto de puntos de calibración. Dado que una gran cantidad de dispositivos precisa una calibración de tres puntos para calibrarse de forma precisa con un algoritmo de calibración predeterminado, es preferente una calibración de tres puntos. Si se desea, se puede llevar a cabo una calibración de cuatro o más puntos mediante el uso de cuatro o más soluciones de calibración.

Además, se describen sistemas de calibración. El sistema de calibración incluye al menos una cámara de calibración, un sensor de temperatura, uno o más elementos de calentamiento o enfriamiento, y uno o más módulos de control configurados para poner en contacto la región de detección de un sensor de unión reversible con soluciones de calibración consecutivas; verificar la temperatura de las soluciones de calibración; controlar los uno o más elementos de calentamiento o enfriamiento para ajustar la temperatura de las soluciones de calibración suministrando calor o eliminando calor de la cámara de calibración; introducir o cambiar la solución de calibración dentro de la cámara de calibración, o mover el sensor de unión reversible entre una pluralidad de cámaras de calibración; determinar la salida del sensor de dicho sensor en función de la temperatura para cada una de dichas soluciones de calibración; y determinar los parámetros de calibración para el sensor basándose en los datos obtenidos; en donde los uno o más módulos de control están configurados para llevar a cabo el método de la invención.

El sistema también puede incluir al menos un sensor de unión reversible. En algunas realizaciones, los uno o más módulos de control pueden calibrar el sensor.

Por ejemplo, los uno o más módulos de control están configurados para controlar la salida del sensor y la salida de temperatura del sensor, para suministrar calor o eliminar calor de la cámara de calibración, para introducir o cambiar la solución de calibración dentro de la cámara de calibración (por ejemplo, añadiendo o diluyendo analito) y para determinar los parámetros de calibración para el sensor basándose en los datos obtenidos de la ejecución de la calibración. Por consiguiente, los uno o más módulos de control están configurados para realizar los métodos de calibración descritos en el presente documento. Los uno o más módulos de control pueden configurarse para mover el sensor entre una pluralidad de cámaras de calibración.

En una realización, las etapas (i) a (v), y, cuando se usen, las etapas (vi) y (vii), se llevan a cabo utilizando uno o más módulos de control, estando configurados los uno o más módulos de control para poner en contacto la región de detección de un sensor de unión reversible con soluciones de calibración consecutivas; verificar y/o ajustar la temperatura de las soluciones de calibración; y determinar la salida del sensor de dicho sensor en función de la temperatura para cada una de dichas soluciones de calibración. Los uno o más módulos de control normalmente están configurados adicionalmente para calibrar el sensor. Para disipar cualquier duda, "soluciones de calibración consecutivas" significa, en primer lugar, la primera solución de calibración, en segundo lugar, la segunda solución de calibración, y, cuando se usen, en tercer lugar, la tercera solución de calibración. La expresión también incluye cualquier solución de calibración posterior utilizada, por ejemplo, una cuarta o quinta solución de calibración, en orden.

La cámara de calibración puede incluir múltiples compartimentos. Por ejemplo, un primer compartimento puede incluir una primera solución de calibración y compartimentos adicionales pueden incluir cantidades de analito o de líquido diluyente. Los compartimentos pueden estar separados por materiales de división impermeables al agua. Al romper o retirar los materiales de división, la solución de calibración se puede modificar para obtener diferentes soluciones de calibración.

En algunas realizaciones, la cámara de calibración puede incluir una o más herramientas de corte o perforación configuradas para ser avanzadas para romper los materiales de división entre los compartimentos. En algunas realizaciones, el uno o más módulos de control pueden configurarse para avanzar o activar una o más herramientas de corte o perforación de acuerdo con un procedimiento de calibración predeterminado.

En algunas realizaciones, un sensor o una región de sensor de un sensor puede empaquetarse con una cámara de calibración. Por ejemplo, la región de detección se puede colocar dentro de la cámara de calibración para mantener la cámara de calibración y la región de sensor estériles antes y durante el procedimiento de calibración. Por ejemplo, la región de detección se puede colocar dentro de un primer compartimento de una cámara de calibración que incluye una primera solución de calibración y los segundo y tercero compartimentos de la cámara de calibración pueden incluir analito (por ejemplo, en forma sólida). Después, el sensor y la cámara de calibración se pueden acoplar a una o más estaciones de registro, incluyendo los uno o más módulos de control para ejecutar el procedimiento de calibración. En algunas realizaciones, la cámara de calibración incluye los uno o más elementos de calentamiento o elementos de enfriamiento que son controlados por el uno o más módulos de control. En otras realizaciones, los elementos de calentamiento o enfriamiento pueden suministrarse en una estación registro. En algunas realizaciones, la estación de registro de calibración se puede incluir como parte de un dispositivo que genera datos del sensor.

Breve descripción de las figuras

El método se describe adicionalmente a continuación con referencia a realizaciones ejemplares y dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra un sensor que puede calibrarse utilizando el método descrito actualmente.

La Figura 2 representa la región de detección del sensor de la Figura 1 con más detalle.

Las Figuras 3a a 3c representan realizaciones de la cámara de calibración de un kit de sensor, cuyo kit puede contener el sensor a calibrar utilizando el método descrito actualmente.

La Figura 4 representa de forma esquemática los cambios de temperatura y señal durante una realización del método de calibración de tres puntos.

La Figura 5 muestra los datos registrados procedentes de la calibración del Ejemplo 1.

La Figura 6 muestra la intensidad frente a la temperatura registrada durante la calibración del Ejemplo 1.

La Figura 7 muestra los resultados de la calibración del Ejemplo 1.

La Figura 8 muestra la concentración de glucosa frente a la temperatura para un sensor calibrado con y sin corrección de temperatura.

La Figura 9 muestra la concentración de glucosa medida con y sin compensación de temperatura frente a temperatura. La concentración real de glucosa de la muestra es de 5,08 mM.

La Figura 10 muestra un diagrama de flujo que representa las etapas implicadas en una realización del método de calibración de tres puntos de la invención.

Descripción detallada

El método descrito actualmente se puede usar para calibrar un sensor de unión reversible. Normalmente, en un sensor de unión reversible, la salida del sensor se produce al transducir un efecto provocado por el analito que se une de forma reversible a un receptor en la región de detección del sensor. La reacción de unión reversible entre el analito y el receptor está, normalmente, en equilibrio químico.

El analito se une reversiblemente al receptor en una relación de analito:receptor de 1:1. Para tales sensores, existe una relación lineal entre la concentración de analito y la salida del sensor en equilibrio.

La técnica de calibración descrita actualmente es adecuada para su uso con cualquier tipo de sensor de unión reversible. Por ejemplo, el sensor puede ser un sensor electroquímico, por ejemplo, un sensor de pH. En algunas realizaciones, el sensor es un sensor óptico. En un sensor óptico, el efecto provocado por la unión reversible del analito al receptor es un efecto óptico y, típicamente, un efecto luminiscente. Por ejemplo, el sensor óptico puede ser un sensor fluorescente y el sensor puede incluir un fluoróforo asociado con el receptor. Cuando hay un fluoróforo asociado con el receptor, indica que la unión de una molécula de analito al receptor perturba la fluorescencia del fluoróforo, por ejemplo, su longitud de onda, intensidad o tiempo de vida. Dichos sensores fluorescentes, por lo tanto, presentan un cambio en la longitud de onda, la intensidad y/o el tiempo de vida de la fluorescencia cuando el analito se une al receptor. Por lo tanto, el sensor puede detectar o cuantificar la cantidad de analito presente en una muestra verificando los cambios en la longitud de onda, la intensidad y/o el tiempo de vida de la fluorescencia. Normalmente, se mide la intensidad o el tiempo de vida.

En algunas realizaciones, el analito es glucosa. Para un sensor de glucosa, el sensor puede incluir un receptor de glucosa que tenga un sitio de unión que tiene uno o más (por ejemplo, dos) grupos de ácido borónico. Por ejemplo, pueden estar presentes dos grupos de ácido borónico y estar separados por un grupo espaciador. Cuando el sensor se expone a una solución que contiene glucosa, la glucosa se une a los grupos de ácido borónico y forma un complejo 1:1 con el receptor. También se divulga en el presente documento una diversidad de analitos distintos y sus receptores correspondientes, donde se produce la unión reversible. El experto en la materia podría identificar tales analitos y receptores, pero los ejemplos adicionales de parejas de analito/receptor incluyen los que se muestran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1

Analito	Receptor
Cl ⁻ , Br ⁻	Katapinandos, criptandos protonados, criptandos cuaternizados
Na ⁺ , K ⁺	Éteres de corona, criptandos
K ⁺	Valinomicina (selectivo)

Calibración

Como se usa en el presente documento, el término calibración se usa para referirse a un procedimiento que incluye la determinación de parámetros (en lo sucesivo denominados en el presente documento, "parámetros de calibración") que permiten relacionar cuantitativamente la salida del sensor o la señal con la concentración del analito. En algunas realizaciones, al menos un parámetro de calibración depende de la temperatura.

En algunas realizaciones, la etapa (ii) incluye determinar la salida del sensor para la primera solución de calibración a dos o más temperaturas en un intervalo de temperaturas de T₁ a T₂; la etapa (iv) incluye determinar la salida del sensor para la segunda solución de calibración a dos o más temperaturas en un intervalo de temperaturas de T₃ a T₄; y,

cuando se usan las etapas (vi) y (vii), la etapa (vii) incluye determinar la salida del sensor para la tercera solución de calibración a dos o más temperaturas en un intervalo de temperaturas de T_5 a T_6 .

5 El número de temperaturas a las que se determina la salida del sensor para la primera, segunda y/o tercera solución de calibración puede ser de 50 o más, preferentemente de 100 o más, más preferentemente de 150 o más, muy preferentemente de 200 o más. Se puede obtener una calibración más precisa a medida que aumenta el número de mediciones. Por ejemplo, las mediciones se pueden obtener midiendo la salida del sensor para cada solución de calibración una vez por segundo, preferentemente dos veces por segundo, más preferentemente tres veces por segundo y muy preferentemente cuatro veces por segundo durante un período de treinta segundos a dos minutos, preferentemente un minuto.

15 Para un sensor invasivo, el método se puede llevar a cabo a una temperatura de sensor de entre 30 y 40 °C, es decir, en torno a la temperatura corporal. Por ejemplo, el método se puede llevar a cabo a una temperatura de sensor de entre 35 y 39 °C, y más preferentemente de entre 36 y 38 °C. Para sensores que no son para utilizarse *in vivo*, la calibración se puede llevar a cabo en un intervalo de temperaturas que refleje la temperatura a la que se usará el sensor, por ejemplo, en torno a la temperatura ambiente.

20 En algunas realizaciones, la segunda solución de calibración se forma mezclando la primera solución de calibración con una cantidad de analito, y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), la tercera solución de calibración se forma mezclando la segunda solución de calibración con una cantidad adicional de analito. De forma similar, si se usa la cuarta solución de calibración, se puede formar mezclando la tercera solución de calibración con aún otra cantidad de analito. En algunas realizaciones, la segunda solución de calibración se deja equilibrar antes de llevar a cabo la etapa (iv), y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), la tercera solución de calibración se puede dejar equilibrar antes de llevar a cabo la etapa (vii). Un experto en la materia puede determinar la cantidad de tiempo necesaria para que la solución de calibración se equilibre y dependerá de la solubilidad del analito, si se utiliza o no una mezcla mecánica y del tiempo de respuesta del sensor. En algunas realizaciones en que se calibra un sensor de glucosa, las soluciones de calibración se dejan equilibrar esperando al menos 10 segundos después de añadir el analito (por ejemplo, glucosa), preferentemente al menos 30 segundos después de añadir el analito. Por ejemplo, se puede dejar que la solución de calibración se equilibre durante 1 minuto.

30 Para minimizar el tiempo necesario para finalizar la calibración, las etapas (iv) y, cuando se use, (vii) se pueden llevar a cabo tan pronto como la solución se haya equilibrado, es decir, cuando la salida de señal en función de la temperatura se hace de primer orden. Debido a que la relación de unión analito:receptor es de 1:1, la salida de señal es de primer orden en función de la temperatura. Por lo tanto, el equilibrio se finaliza una vez que la salida de señal se hace lineal con la temperatura.

40 Cuando el analito es glucosa, la glucosa que se mezcla con la primera solución para formar la segunda solución puede incluir tanto glucosa α como glucosa β . En algunas realizaciones, cuando el analito es glucosa y se usan las etapas (vi) y (vii), la glucosa que se mezcla con la segunda solución para formar la tercera solución también incluye glucosa α y glucosa β . Los métodos para calibrar sensores de glucosa usando glucosa α y β se describen en el documento WO 2010/133831, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, la calibración incluye las siguientes fases (representadas en la Figura 4)

45 Calentamiento

Aumento inicial de temperatura y configuración electrónica automática

50 Primera solución de calibración (cal1): Medida

Medir la señal en función de la temperatura para la primera solución de calibración en cero analito. Calentamiento aplicado ($T_1 \rightarrow T_2$)

55 Segunda solución de calibración (cal2): Mezcla

Mezclar la primera solución de calibración con el analito para formar la segunda solución de calibración y esperar el equilibrio con la concentración de analito modificada. Calentamiento no aplicado ($T_2 \rightarrow T_3$)

60 Segunda solución de calibración (cal2): Medida

Medir la señal en función de la temperatura para la segunda solución de calibración en analito 5 mmol. Calentamiento aplicado ($T_3 \rightarrow T_4$)

65 Tercera solución de calibración (cal3): Mezcla

Mezclar la segunda solución de calibración con el analito para formar la tercera solución de calibración y esperar el

equilibrio con la concentración de analito modificada. Calentamiento no aplicado ($T_4 \rightarrow T_5$)

Tercera solución de calibración (cal3): Medida

- 5 Medir la señal en función de la temperatura para la tercera solución de calibración en analito 10 mmol. Calentamiento aplicado ($T_5 \rightarrow T_6$)

10 En algunas realizaciones, T_2 es mayor que T_1 , T_4 es mayor que T_3 , y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), T_6 es mayor que T_5 . Dicho de otra forma, las etapas (i), (iii) y, cuando se use, (vi), normalmente implican calentar las soluciones de calibración. Calentar la solución de calibración puede ser una forma conveniente de proporcionar un gradiente de temperatura.

15 Los intervalos T_1 a T_2 , T_3 a T_4 y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), T_5 a T_6 pueden estar muy próximos en términos de temperatura. En algunas realizaciones, los intervalos pueden solaparse. En otras palabras T_3 puede ser menor que o igual a T_2 , y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), T_5 puede ser menor que o igual a T_4 . En algunas realizaciones, todos los intervalos de temperaturas utilizados (por ejemplo, T_1 a T_2 , T_3 a T_4 , y opcionalmente T_5 a T_6) corresponden al mismo intervalo, que abarca todas las temperaturas a las que es probable que se use el sensor, por ejemplo, 36-38 °C para un sensor invasivo.

20 Por lo tanto, en algunas realizaciones como se representa en el esquema anterior, el calentamiento se produce durante los periodos de medición T_1 a T_2 , T_3 a T_4 y T_5 a T_6 , pero el calentamiento se detiene (o se aplica enfriamiento) durante los periodos de mezcla T_2 a T_3 y T_4 a T_5 . Esto provoca que la solución de calibración se enfríe, o mantenga sustancialmente la misma temperatura, durante la fase de mezcla. En algunas realizaciones, el enfriamiento de la solución se produce durante la mezcla, de forma que la temperatura T_3 a la que comienza la segunda fase de medición es aproximadamente la misma que la temperatura T_1 a la que comienza la primera fase de medición. Como alternativa, la segunda fase de medición puede iniciarse a una temperatura más alta, de forma que T_3 es mayor que T_1 . De forma similar, para una calibración de tres puntos, la temperatura T_5 puede ser aproximadamente igual, o mayor que, T_3 .

30 La concentración de analito en la primera solución de calibración puede ser de cero. El experto en la materia sería capaz de determinar las concentraciones adecuadas de analito para las primera, segunda y opcional tercera, o para soluciones de calibración adicionales. Las concentraciones típicas deben incluir cero (primera solución de analito) y concentraciones en el extremo superior e inferior de las que probablemente vaya a medir el sensor. En el ejemplo de calibración de un sensor de glucosa para su uso con pacientes de cuidados intensivos, normalmente una primera solución de calibración tiene una concentración de cero, mientras que las segunda y tercera soluciones de calibración normalmente tienen concentraciones de, por ejemplo, 5 mmol⁻¹ y 10 mmol⁻¹, respectivamente. En una realización alternativa en el caso de un sensor de glucosa, las concentraciones de las primera, segunda y tercera soluciones de calibración son de 0 mmol⁻¹, aproximadamente de 15 mmol⁻¹ y aproximadamente 30 mmol⁻¹, respectivamente. Se podrían seleccionar otras concentraciones alternativas dependiendo del tipo y uso final del sensor.

40 En algunas realizaciones, el método incluye adicionalmente:
(viii) poner en contacto la región de detección del sensor con una muestra y determinar la concentración de analito en la muestra.

45 La muestra puede ser cualquier líquido que deba analizarse mediante el uso de un sensor de unión reversible. Por ejemplo, pueden usarse como muestra líquidos corporales tales como sangre entera o plasma. Para un sensor invasivo, la muestra es normalmente sangre o fluido intersticial. Además, se pueden contemplar otras muestras para sensores no invasivos, tales como muestras de agua o productos alimenticios.

50 El sensor se puede calibrar en el punto de uso. Como se usa en el presente documento, "calibrado en el punto de uso" significa que el tiempo entre el comienzo de la calibración en la etapa (i) y el uso del sensor para determinar la concentración de analito en la etapa (viii) es de 24 horas o menos. En algunas realizaciones, el tiempo entre el comienzo de la calibración en la etapa (i) y el uso del sensor para determinar la concentración de analito en la etapa (viii) es de 12 horas o menos, 5 horas o menos, o 1 hora o menos.

55 La siguiente descripción explica cómo se pueden determinar los parámetros de calibración para un sensor óptico que proporciona mediciones de fluorescencia. El experto podría adaptar este procedimiento a otros tipos de sensor.

Una ecuación de calibración que se puede usar para relacionar la salida del sensor con la concentración de analito es

$$I = \frac{I_0 + k\rho I_\infty}{1 + k\rho} \quad (1)$$

60 donde I es la salida del sensor y ρ es la concentración de analito. En esta ecuación hay tres parámetros que deben obtenerse de un procedimiento de calibración:

- I_0 la salida del sensor a concentración cero
- I_∞ la salida del sensor (teórica) a concentración infinita
- k la constante de modulación

5 I_0 se puede restar de ambos lados de la ecuación (1) para proporcionas

$$I - I_0 = \frac{k\rho}{1 + k\rho} (I_\infty - I_0)$$

o

10

$$\Delta = \frac{k\rho}{1 + k\rho} \Delta_m \quad (2)$$

donde Δ es el cambio en la salida del sensor y Δ_m es el máximo cambio posible en la salida del sensor. El cambio es relativo a la salida del sensor a una concentración de analito cero.

15

La calibración dependiente de temperatura puede incluir dos fases, (I) obtener la ecuación de calibración a partir de la química de unión reversible de receptor-analito y (II) aplicar la ecuación para determinar los parámetros de calibración.

(I) Obtención de la ecuación de calibración a partir de la química de unión reversible de receptor-analito

20

Aunque el método de calibración descrito actualmente no está limitado a sensores que tengan una relación de unión de receptor/analito de 1:1, el equilibrio de un proceso de unión de 1:1 que conduce a una salida del sensor aumentada en presencia de analito puede representarse por

25



donde $[H]$ es la concentración del receptor u hospedador, $[G]$ es la concentración del huésped (analito), y K_a es la constante de asociación de la reacción. Hay que tener en cuenta que aunque $[H]$ es desconocido, es muy pequeño en comparación con $1/K_a$ y también es pequeño en comparación con $[G]$ (excepto a la concentración de analito exactamente cero).

30

La constante de asociación de la reacción está relacionada con las concentraciones en el equilibrio por

$$K_a = \frac{[HG]}{[H][G]} \quad (3)$$

35

La notación con corchete para la concentración puede reemplazarse por el símbolo griego ρ , por ejemplo ρ_g en lugar de $[G]$ y ρ_h en lugar de $[H]$. Por lo tanto

$$K_a = \frac{\rho_c}{\rho_h \rho_g} \quad (4)$$

40

donde ρ_c es la concentración del complejo molécula "hospedador + huésped".

Es posible escribir:

45

$$\rho_g = \rho_{gi} - \rho_c \quad (5)$$

$$\rho_h = \rho_{hi} - \rho_c \quad (6)$$

donde ρ_{gi} es la concentración inicial de analito conocida y ρ_{hi} es la concentración inicial desconocida del hospedador.

50

Sustituyendo (5) y (6) en (4) da

$$K_a = \frac{\rho_c}{(\rho_{gi} - \rho_c)(\rho_{hi} - \rho_c)} \quad (7)$$

Reorganizar (7) da una ecuación cuadrática para la ρ_c desconocida:

$$\rho_c^2 - \left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right) \rho_c + \rho_{hi} \rho_{gi} = 0 \quad (8)$$

La solución convencional de una cuadrática da

$$\rho_c = \frac{\left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right) \pm \sqrt{\left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4\rho_{hi}\rho_{gi}}}{2}$$

y debe tomarse el signo más bajo (menos) de modo que ρ_c tienda a cero, ya que las concentraciones iniciales del hospedador y el huésped tienden a cero. Por lo tanto

$$\rho_c = \frac{\left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right)}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4\rho_{hi}\rho_{gi}}{\left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right)^2}} \right]$$

debido a que $K_a\rho_{hi} \ll 1$ el término de la raíz cuadrada se puede desarrollar al primer orden.

$$\begin{aligned} \rho_c &\approx \frac{\left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right)}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{2\rho_{hi}\rho_{gi}}{\left(\rho_{gi} + \rho_{hi} + \frac{1}{K_a} \right)^2} \right) \right] \\ &= \frac{\rho_{hi}\rho_{gi}}{\rho_{hi} + \rho_{gi} + \frac{1}{K_a}} \end{aligned} \quad (9)$$

De nuevo, el hecho que $K_a\rho_{hi} \ll 1$ permite eliminar el término ρ_{hi} en el denominador de (9), dando

$$\frac{\rho_c}{\rho_{hi}} = \frac{K_a\rho_{gi}}{1 + K_a\rho_{gi}} \quad (10)$$

Esta es, de hecho, la forma canónica de la fórmula de calibración, la ecuación (2), que puede escribirse

$$\frac{\Delta}{\Delta_m} = \frac{k\rho}{1 + k\rho} \quad (11)$$

Comparando las ecuaciones (10) y (11), el cambio fraccionario en la salida del sensor es igual a la fracción del hospedador convertida al complejo que conduce a la salida del sensor. El parámetro de modulación k se puede identificar con la constante de asociación química K_a .

Dado que la ecuación de calibración se puede obtener de la ecuación de equilibrio químico, el ajuste de los datos a cualquiera de las dos debe dar esencialmente los mismos resultados.

(II) Aplicación de la ecuación de calibración para determinar los parámetros de calibración

En la ecuación (10), el lado derecho (LD) tiene una dependencia de la temperatura oculta en el término K_a , mientras

que el lado izquierdo (LI) no tiene una dependencia explícita de la temperatura. El denominador del LI es una constante (para un sensor dado) mientras que el numerador es la cantidad que se mide (indirectamente). La misma interpretación se puede aplicar a la ecuación (11): Δ es la medición, mientras que Δ_m es una constante para un sensor dado.

- 5 El denominador del LI de la ecuación (11) es: $\Delta_m = I_\infty - I_0$. I_0 se sabe experimentalmente que es dependiente de la temperatura. I_0 e I_∞ tienen la *misma* dependencia de la temperatura, debido a I_0 , dado que $I_\infty = \Delta_m + I_0$. En palabras, Δ_m es la señal de fluorescencia esperada cuando todo el hospedador está unido al analito y no tiene dependencia de la temperatura. Así, para Δ_m pueden utilizar valores nominales de temperatura de calibración de I_0 y I_∞ .
- 10 El numerador del LI de la ecuación (11) es: $\Delta = I - I_0$. la medición real es I y se debe permitir la dependencia de la temperatura observada de I_0 . Se observa experimentalmente que la dependencia de la temperatura de I_0 es muy lineal y se puede aproximar a:

$$I_0 = [1 + \alpha(T - T_c)]I_{0c} \quad (12)$$

- 15 donde α es el coeficiente de temperatura lineal, T_c es la temperatura nominal de calibración, e I_{0c} la salida medida del sensor a T_c y cero analito

- 20 El último término, cuya dependencia de la temperatura debe considerarse es K_a , que se espera que sea una función exponencial de la inversa de la temperatura absoluta:

$$G = -RT \ln K_a$$

- 25 donde G es la energía de Gibbs y R es la constante de los gases,
o

$$K_a \propto \exp\left(-\frac{eV}{k_B T}\right)$$

- 30 donde V es la barrera de energía y k_B es la constante de Boltzmann.

Una forma de escribir la dependencia de la energía de K_a de una forma adecuada para el cálculo es

$$K_a = K_{ac} \exp\left[\beta\left(1 - \frac{T_c}{T}\right)\right] \quad (13)$$

- 35 donde K_{ac} es la constante de asociación a la temperatura nominal de calibración y β es una medida de la energía de Gibbs, o la energía en voltios, convertida en una constante no dimensional.

Incluyendo todas las dependencias de temperatura sustituyendo (12) y (13) en (11), obtenemos

$$\frac{I - I_0 [1 + \alpha(T - T_c)]}{I_\infty - I_0} = \frac{\rho K_a \exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right)}{1 + \rho K_a \exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right)}$$

- 40 donde se ha eliminado el subíndice 'c' - en lo sucesivo en el presente documento las cantidades I_0 , I_∞ , K_a denotan todas "a la temperatura de calibración". Por lo tanto

$$I = I_0 [1 + \alpha(T - T_c)] + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a \exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right)}{1 + \rho K_a \exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right)} \quad (14)$$

- 45 Si α y β fueran iguales para todos los sensores, entonces sería suficiente una calibración de tres puntos, es decir, se podría aplicar la misma corrección de temperatura a todos los sensores. Dado que este no es el caso, un procedimiento

de calibración debe determinar cinco incógnitas ($I_0, I_\infty, K_a, \alpha, \beta$) a partir de mediciones a dos concentraciones de analito en función de la temperatura.

5 A lo largo de la calibración la temperatura absoluta T está siempre cerca de T_c , es decir $T/T_c \approx 1$ y, así, los términos exponenciales se pueden desarrollar al primer orden

$$1 - \frac{T_c}{T} = 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{T - T_c}{T_c}\right)} \approx 1 - \left(1 - \frac{T - T_c}{T_c}\right) = \frac{T - T_c}{T_c}$$

10 de forma que la exponencial se pueda desarrollar

$$\exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right) \approx \exp \left(\beta \frac{T - T_c}{T_c}\right) \approx 1 + \beta \frac{T - T_c}{T_c}$$

El numerador en (14) se puede desarrollar más

$$1 + \rho K_a \exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right) \approx 1 + \rho K_a \left(1 + \beta \frac{T - T_c}{T_c}\right) = (1 + \rho K_a) \left(1 + \frac{\rho K_a \beta}{1 + \rho K_a} \frac{T - T_c}{T_c}\right)$$

15

de forma que

$$\frac{1}{1 + \rho K_a \exp \beta \left(1 - \frac{T_c}{T}\right)} \approx \frac{1}{(1 + \rho K_a)} \left(1 - \frac{\rho K_a \beta}{1 + \rho K_a} \frac{T - T_c}{T_c}\right)$$

20

Entonces (14) se convierte en

$$I = I_0 [1 + \alpha(T - T_c)] + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a}{1 + \rho K_a} \left(1 + \beta \frac{T - T_c}{T_c}\right) \left(1 - \frac{\rho K_a \beta}{1 + \rho K_a} \frac{T - T_c}{T_c}\right)$$

25 y al eliminar los términos de segundo orden, la ecuación se vuelve lineal en el desplazamiento de temperatura $T - T_c$:

$$I = I_0 [1 + \alpha(T - T_c)] + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a}{1 + \rho K_a} \left(1 + \beta \frac{T - T_c}{T_c} - \frac{\rho K_a \beta}{1 + \rho K_a} \frac{T - T_c}{T_c}\right)$$

$$I = I_0 + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a}{1 + \rho K_a} I_0 \alpha (T - T_c) + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a}{1 + \rho K_a} \left(1 - \frac{\rho K_a \beta}{1 + \rho K_a}\right) \beta \frac{T - T_c}{T_c}$$

$$I = I_0 + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a}{1 + \rho K_a} + I_0 \alpha (T - T_c) + (I_\infty - I_0) \frac{\rho K_a}{(1 + \rho K_a)^2} \beta \frac{T - T_c}{T_c} \quad (15)$$

30 La legitimidad del desarrollo de (14) al primer orden en $T - T_c$ se confirma por el experimento: se ha observado sistemáticamente en muchos lotes de sensores que siempre se puede hacer un buen ajuste a una línea recta para la variación de la señal con la temperatura a *analito constante*.

La salida del sensor se determina en función de la temperatura para la primera y la segunda soluciones de calibración:

$$35 \quad I = I_1 + s_1(T - T_c) \quad \rho = \rho_1 \quad (16)$$

$$I = I_2 + s_2(T - T_c) \quad \rho = \rho_2 \quad (17)$$

Los valores nominales de temperatura de calibración I_0, I_∞, K_a se puede encontrar a partir de las intensidades I_1, I_2, I_3 por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, los utilizados para las técnicas de calibración de temperatura fija).

5 Igualando las pendientes de (15) y (16), y de (15) y (17) se obtiene:

$$I_0\alpha + (I_\infty - I_0)\frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2} \frac{\beta}{T_c} = s_1 \quad (18)$$

$$I_0\alpha + (I_\infty - I_0)\frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} \frac{\beta}{T_c} = s_2 \quad (19)$$

10 Esta pareja de ecuaciones simultáneas se puede resolver α y β :

$$\alpha = \frac{1}{I_0} \frac{s_1 \frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} - s_2 \frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2}}{\frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} - \frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2}} = \frac{s_1}{I_0} \left[\frac{1 - \frac{\rho_1 s_2 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 s_1 (1 + \rho_1 K_a)^2}}{1 - \frac{\rho_1 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 (1 + \rho_1 K_a)^2}} \right] \quad (20)$$

$$\beta = \frac{\frac{(s_2 - s_1)T_c}{I_\infty - I_0}}{\frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} - \frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2}} = \frac{(1 + \rho_2 K_a)^2 T_c (s_2 - s_1)}{(I_\infty - I_0) \rho_2 K_a} \left[\frac{1}{1 - \frac{\rho_1 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 (1 + \rho_1 K_a)^2}} \right] \quad (21)$$

15 Donde $\rho_1 = 0$, (20) se convierte en:

$$\alpha = \frac{s_1}{I_0} \quad (22)$$

20 y (21) se convierte en:

$$\beta = \frac{(1 + \rho_2 K_a)^2 T_c (s_2 - s_1)}{(I_\infty - I_0) \rho_2 K_a} \quad (23)$$

25 Los tres parámetros K_a, I_∞ y I_0 que deben obtenerse de un procedimiento de calibración pueden, por lo tanto, obtenerse por:

- la determinación de s_1 y s_2 ajustando la salida del sensor medida y las lecturas de temperaturas a las siguientes expresiones lineales:

$$I = I_1 + s_1(T - T_c) \quad \rho = \rho_1 \quad (16)$$

$$I = I_2 + s_2(T - T_c) \quad \rho = \rho_2 \quad (17)$$

- el uso de s_1 y s_2 , junto con los valores de K_a, I_∞ y I_0 que son conocidos para una temperatura de referencia T_c , para determinar α y β con las ecuaciones (20) y (21):

$$\alpha = \frac{1}{I_0} \frac{s_1 \frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} - s_2 \frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2}}{\frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} - \frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2}} = \frac{s_1}{I_0} \left[\frac{1 - \frac{\rho_1 s_2 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 s_1 (1 + \rho_1 K_a)^2}}{1 - \frac{\rho_1 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 (1 + \rho_1 K_a)^2}} \right] \quad (20)$$

$$\beta = \frac{\frac{(s_2 - s_1) T_c}{I_\infty - I_0}}{\frac{\rho_2 K_a}{(1 + \rho_2 K_a)^2} - \frac{\rho_1 K_a}{(1 + \rho_1 K_a)^2}} = \frac{(1 + \rho_2 K_a)^2 T_c (s_2 - s_1)}{(I_\infty - I_0) \rho_2 K_a} \left[\frac{1}{1 - \frac{\rho_1 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 (1 + \rho_1 K_a)^2}} \right] \quad (21)$$

- 5 - el uso de α y β para determinar los valores de K_a , I_∞ y I_0 a la temperatura de calibración real T con las ecuaciones (12) (13) y $I_\infty = I_0 + \Delta_m$ (véase el denominador del LI de la ecuación (11)).

$$I_0 = [1 + \alpha(T - T_c)] I_{0c} \quad (12)$$

$$K_a = K_{ac} \exp \left[\beta \left(1 - \frac{T_c}{T} \right) \right] \quad (13)$$

10

Descripción detallada del sensor y del kit para su uso en el método

15 En algunas realizaciones, el sensor a calibrar se proporciona como parte de un kit. El kit también puede incluir una cámara de calibración y un controlador de temperatura. Por ejemplo, el kit se puede disponer de tal manera que:

- la primera solución de calibración esté presente en un primer compartimento de la cámara de calibración,
- una cantidad de analito está presente en un segundo compartimento de la cámara de calibración,
- 20 - el segundo compartimento de la cámara de calibración está inicialmente separado del primer compartimento de la cámara de calibración por un primer material de división impermeable al agua, y
- por lo que el método descrito actualmente se realiza utilizando el kit rompiendo o retirando el primer material de división para formar la segunda solución de calibración.

25 En otras realizaciones adicionales, el kit se puede disponer adicionalmente de forma que: la cámara de calibración incluya adicionalmente un tercer compartimento que contiene una cantidad adicional del analito,

- el tercer compartimento está inicialmente separado del resto de la cámara de calibración por un segundo material de división impermeable al agua, y
- 30 - por lo que determinadas realizaciones del método descrito actualmente se realizan utilizando el kit rompiendo o retirando el segundo material de división para formar la tercera solución de calibración.

35 El analito en el segundo y/o tercer compartimentos puede estar en forma sólida. Por ejemplo, la glucosa puede proporcionarse en forma sólida. En algunas realizaciones, la glucosa sólida está presente en una forma sólida que incluye glucosa alfa y beta. Cuando el tercer compartimento de la cámara de calibración está presente, la glucosa en el tercer compartimento también se puede proporcionar en forma sólida (por ejemplo, una forma sólida que incluye glucosa alfa y beta).

40 El sensor puede incluir un sensor de temperatura. En algunas realizaciones, el sensor incluye un termistor. El sensor de temperatura se puede utilizar para controlar la temperatura real durante la calibración.

La temperatura de las soluciones de calibración se puede variar utilizando un controlador de temperatura. Por ejemplo, la temperatura se puede controlar mediante un calentador (por ejemplo, un elemento de calentamiento).

45 A continuación se describe en detalle un ejemplo de un sensor de glucosa invasivo que se puede calibrar utilizando el método descrito actualmente. Los sensores invasivos normalmente operan en un intervalo de temperatura de 35-39 °C. Un sensor puede contener un sensor de temperatura, de forma que se pueda determinar la temperatura del sensor. Se puede proporcionar un elemento de calentamiento para variar la temperatura dentro de la cámara de calibración durante la calibración. Se puede utilizar un sensor de temperatura dentro del sensor para controlar la temperatura real durante la calibración. Otros métodos de calibración de sensores se describen en WO 2008/001091, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La cámara de calibración puede

50 incluir un mezclador (por ejemplo, un elemento de mezcla o un dispositivo que imparte vibración) con el que mezclar

las soluciones de calibración después de la adición de analito.

Un sensor de glucosa invasivo en particular está basado en una técnica de fibra óptica y se representa en la Figura 1. El sensor 1 incluye una punta insertable 2 que está adaptada para la inserción en un paciente, por ejemplo, la inserción en un vaso sanguíneo a través de una cánula. La punta insertable incluye una región de detección 3 (representada con más detalle en la Figura 2) en la que están posicionados el receptor de glucosa 4 y también un sensor de temperatura 5. El receptor de glucosa está inmovilizado sobre o en una fibra óptica 6, de forma que se transmita a través de la fibra óptica una señal emitida por el receptor. La fibra óptica se extiende a través del cable 7 al conector 8, que está adaptado para acoplarse con un monitor apropiado (no representado). El monitor incluye, normalmente, un cable óptico adicional que se acopla con el conector en un extremo y en el otro se bifurca para conectarse a (a) una fuente de luz apropiada para el sensor óptico y (b) un detector para la señal emitida. La conexión eléctrica al sensor de temperatura también se proporciona a través del conector 8 y el monitor proporciona el equipo de detección apropiado. El monitor también puede comprender los uno o más módulos de control para llevar a cabo el método de detección, como se describe en el presente documento.

La región de detección del sensor está recubierta con una membrana 9 que generalmente debe ser hemocompatible y permitir la difusión de glucosa (u otro analito cuando sea apropiado) desde la sangre o el fluido corporal circundante hasta el receptor 4.

Los receptores para varios analitos que podrían incorporarse en tal sensor son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse éteres de corona para detectar potasio y también son útiles diversas enzimas. En el caso de la glucosa, un receptor útil es un compuesto de ácido borónico que tenga un fluoróforo. La especie de ácido borónico proporciona la capacidad de formar un complejo con la glucosa y el patrón de emisión de fluorescencia de la molécula se altera en presencia de glucosa, lo que permite la detección óptica.

El receptor está normalmente inmovilizado en la fibra óptica, en un hidrogel que permite la difusión de agua y glucosa hacia el compuesto receptor. La poliacrilamida reticulada o el polihidroxietilmetacrilato (p-HEMA) son ejemplos de hidrogeles que pueden usarse.

En la Figura 3a se representa una cámara de calibración. La cámara de calibración 10 incluye dos compartimentos 101 y 102, que están separados por un material de división impermeable al agua 11, por ejemplo un material de división rompible. El primer compartimento 101 contiene agua o una solución acuosa. Normalmente, este compartimento contiene una solución isotónica y no contiene el analito. Por lo tanto, la determinación de la salida del sensor en función de la temperatura para la primera solución de calibración proporciona un conjunto de lecturas para la concentración de analito cero. Sin embargo, el analito puede estar contenido en el primer compartimento, por ejemplo a baja concentración, si se desea.

El segundo compartimento contiene una fuente del analito 12, por ejemplo, glucosa. Esta puede estar en forma de una solución concentrada del analito o, como se representa en 12 en la Figura 3a, el propio analito en forma sólida. Cuando el analito es glucosa, el segundo compartimento contiene normalmente glucosa en forma sólida (por ejemplo, un polvo, un comprimido, etc.), mientras que el primer compartimento no contiene glucosa. Se ha descubierto que las soluciones acuosas de glucosa se degradan en la esterilización con calor o radiación gamma. Por lo tanto, esta realización tiene la ventaja de que no está presente una solución acuosa de glucosa y se minimiza la degradación. El segundo compartimento puede estar en una atmósfera de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno seco) para evitar la degradación por irradiación inducida por oxígeno.

La calibración del sensor se puede llevar a cabo exponiendo la región de detección del sensor al primer compartimento 101 que contiene la primera solución de calibración. En un aspecto de esta realización, la región de detección del sensor se inserta en el primer compartimento 101. Para permitir que se inserte el sensor, normalmente la pared exterior 13 del primer compartimento es, al menos en parte, perforable. Por ejemplo, la pared exterior 13 puede ser un tabique que se puede perforar mediante una aguja. El sensor se puede insertar en el primer compartimento a través o dentro de la aguja. Una vez que la región de detección está en su lugar dentro del primer compartimento, la temperatura de la primera solución de calibración se varía aplicando calor desde el calentador 14 y se determina la salida del sensor en función de la temperatura para la primera solución de calibración.

En un aspecto alternativo de la presente realización, se proporciona un sello entre el sensor y el primer compartimento. La rotura del sello, por ejemplo, mediante el movimiento del sensor o de una parte de la pared exterior 13 del primer compartimento, provoca que el contenido del primer compartimento fluya alrededor del sensor, exponiendo así el sensor a la primera solución de calibración.

El material de división que separa los primero y segundo compartimentos se rompe o se retira, permitiendo que se mezclen los contenidos de estos compartimentos. Durante este periodo, generalmente no se aplica calentamiento a la cámara de calibración. El material de división normalmente se rompe o se retira sin abrir la cámara de calibración sellada para mantener la esterilidad. Por lo tanto, el material se rompe perforando, por ejemplo, con una aguja insertada en el primer compartimento a través de la pared exterior 13. En una realización, el sensor se inserta en el primer compartimento dentro de una aguja, y la aguja, que contiene el sensor, puede empujarse después hacia

adelante para romper el material de división.

El material de división puede ser cualquier material que pueda romperse, quebrarse o retirarse, provocando que los contenidos de los primero y segundo compartimientos se mezclen. En una realización, el material de división es un material elastomérico que se mantiene bajo tensión de forma que, al perforar con una aguja, el material se quiebre completamente. Los cauchos naturales o sintéticos son ejemplos de tales materiales. En una realización alternativa, el material es rígido, pero está ranurado con líneas de fractura de forma que al perforar con una aguja se fracture fácilmente en componentes. Los plásticos y las cerámicas son ejemplos de materiales rígidos adecuados. Ambos tipos de materiales de división proporcionan una gran abertura entre los primero y segundo compartimientos, permitiendo una rápida mezcla de los contenidos de los compartimientos. Los materiales de división alternativos incluyen láminas metálicas (por ejemplo, lámina de aluminio), que pueden estar recubiertas con plástico.

El material de división debe ser impermeable al agua y al analito para evitar filtraciones entre los dos compartimientos de la cámara de calibración. En una realización, una superficie del material de división está metalizada para ayudar a prevenir la difusión del agua. La superficie metalizada está, normalmente, en contacto con el segundo compartimiento, que preferentemente está en una atmósfera de gas inerte.

Para acelerar la mezcla de los contenidos de los primero y segundo compartimientos (por ejemplo, la disolución de un analito sólido en el agua o solución acuosa), se puede usar mezcla física de la cámara de calibración, por ejemplo agitación o mezcla ultrasónica, o alternativamente, se pueden añadir aditivos químicos efervescentes a la cámara de calibración para proporcionar la mezcla.

Una vez mezclados los contenidos de los dos compartimientos, se proporciona una segunda solución de calibración que tiene una concentración de analito distinta de la primera solución de calibración. Se aplica nuevamente calor desde el elemento de calentamiento 14 y la salida del sensor en función de la temperatura determinada a partir de las lecturas tomadas en esta solución, por lo tanto, proporciona un segundo conjunto de puntos de calibración. Esto, junto con un algoritmo de calibración predeterminado, permite generar una curva de calibración y calibrar el sensor. A la luz de la presente divulgación, el experto en la materia sería capaz de proporcionar algoritmos apropiados para la calibración de cualquier tipo de sensor particular dado.

Normalmente, la calibración se lleva a cabo conectando la conexión 8 del sensor a un monitor adaptado para la medición continua de la salida del sensor. El monitor puede comprender uno o más módulos de control configurados para llevar a cabo el método de calibración descrito en el presente documento. Por lo tanto, tan pronto como el sensor se expone al primer compartimiento de la cámara de calibración, el monitor se conecta y se enciende, y la cámara de calibración se calienta hasta la temperatura inicial T_1 , se puede tomar un primer conjunto de lecturas.

Después, se lleva a cabo una ruptura o rotura del material de división y el monitor registrará continuamente la salida del sensor durante la mezcla de la fuente de analito con el agua o la solución acuosa del primer compartimiento. La cámara de calibración no se calienta durante la mezcla, por lo que el intervalo de temperaturas en el que se registra la salida del sensor para la segunda solución de calibración está cerca de, y puede superponerse con, el intervalo de temperaturas en el que se registra la salida del sensor para la primera solución de calibración. El calentamiento se reanuda cuando la salida del sensor se vuelve lineal debido a que la mezcla se ha finalizado y el segundo conjunto de lecturas se toma durante esta segunda fase de calentamiento. El segundo conjunto de lecturas normalmente se puede finalizar en aproximadamente 5 minutos, preferentemente aproximadamente 2 minutos, más preferentemente aproximadamente 1 minuto, Desde el inicio del proceso de calibración.

En un proceso automatizado, una o más de las etapas de exposición del sensor al primer compartimiento y de retirada o rotura del material de división 11 pueden ser impulsadas por una máquina. A este respecto, se puede utilizar un motor paso a paso o un motor paso a paso unido a un husillo.

La Figura 3b representa una cámara de calibración alternativa adecuada para llevar a cabo una calibración de 3 puntos. La cámara incluye un compartimiento 101 que normalmente incluye agua o una solución acuosa que forma la primera solución de calibración, y compartimientos 102, 103, conteniendo cada uno glucosa en forma sólida. La ruptura sucesiva de los materiales de división 11, 11a proporcionará en primer lugar una segunda solución de calibración que contiene glucosa añadida procedente del compartimiento 102, y posteriormente una tercera solución de calibración que contiene adicionalmente la glucosa procedente del compartimiento 103. Por lo tanto, la calibración se puede llevar a cabo como se describe anteriormente, pero con la adición de etapas adicionales para determinar la salida del sensor en función de la temperatura de la tercera solución de calibración. En particular, una vez que se han tomado las lecturas para la segunda solución de calibración, se rompe el segundo material de división 11a y se mezclan los contenidos de los compartimientos, normalmente hasta que se alcanza el equilibrio. Se aplica nuevamente calor desde el elemento de calentamiento 14 y la salida del sensor en función de la temperatura determinada a partir de las lecturas tomadas en esta tercera solución proporciona un tercer conjunto de puntos de calibración. La calibración se lleva a cabo entonces utilizando los primero, segundo y tercer puntos de calibración.

Ejemplo 1

Un sensor óptico de glucosa como se representa en la Fig. 1 en un calibrador lleno de PBS (solución tamponadora de fosfato), que contiene dos cápsulas selladas de una mezcla de glucosa α/β de 40:60, se insertó en una unidad de calibración que tiene la capacidad de agitar y calentar la solución de calibración. La temperatura de la solución de calibración se elevó a 25 °C y se ajustaron las ganancias del instrumento. La temperatura se aumentó adicionalmente y se registró la salida del sensor (datos de llamada) a medida que se variaba la temperatura entre 30 (T₁) y 36 °C (T₂). La primera cápsula de glucosa se rompió entonces y una vez que el sensor alcanzó el equilibrio (es decir, una vez que la salida del sensor varió de forma lineal con la temperatura), se registró la salida del sensor (datos cal2) a medida que se variaba la temperatura entre 36 (T₃) y 38 °C (T₄). La segunda cápsula de glucosa se rompió entonces y una vez que el sensor alcanzó el equilibrio, se registró la salida del sensor (datos cal3) entre 38 (T₅) y 40 °C (T₆).

Efecto de la modulación

En la Figura 5 se muestran los resultados de tres calibraciones con sensores de modulación distinta, las intensidades de fluorescencia a glucosa 0 mM (37 °C) se han normalizado a 1.

Se puede observar a partir de estas calibraciones que a medida que la modulación del sensor disminuye, el valor de K también disminuye y los valores de α y β también varían. Esto indica que el sensor debe calibrarse a la temperatura en el punto de uso para minimizar los errores cuando se mide la concentración de glucosa.

Resultados

Los datos registrados a partir de una calibración se pueden observar en la Figura 6. Como se esperaba, la intensidad de fluorescencia (I, eje y) disminuyó a medida que la temperatura aumentaba para las tres concentraciones de glucosa distintas, en este caso [Glc] = 0, 14,1 y 28,2 mmol.

Se midieron los gradientes de estos tres puntos de calibración y se determinaron las intensidades para los puntos de calibración 1-3 a 37 °C. Esto permitió el cálculo de los parámetros I₀, I_∞ y K a 37 °C, y obtener las dos constantes dependientes de la temperatura α y β , Figura 7.

Después de calibrar el sensor, se colocó en una solución de PBS que contenía glucosa (5,08 mM) y se varió la temperatura. Los resultados de esto se muestran en la Figura 8, de la cual es evidente que la precisión del sensor cuando se aplica la calibración de temperatura variable es inferior al 4 % (32-40 °C), mientras que en el caso en que se lleve a cabo una calibración de temperatura fija, el error es de hasta el 58 %, Figura 9.

La divulgación anterior hace referencia a diversas realizaciones y ejemplos específicos. Sin embargo, debe entenderse que las siguientes reivindicaciones no se limitan de ninguna manera a estas realizaciones y ejemplos específicos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la calibración de un sensor de unión reversible para la detección de un analito, método que comprende:

- 5 (i) variar la temperatura de una primera solución de calibración de una primera temperatura (T_1) a una segunda temperatura (T_2) mientras la primera solución de calibración está en contacto con una región de detección del sensor;
- 10 (ii) determinar la salida del sensor para la primera solución de calibración en función de la temperatura;
- (iii) variar la temperatura de una segunda solución de calibración de una tercera temperatura (T_3) a una cuarta temperatura (T_4) mientras la segunda solución de calibración está en contacto con la región de detección, teniendo la segunda solución de calibración una concentración de analito que es distinta de la de la primera solución de calibración;
- 15 (iv) determinar la salida del sensor para la segunda solución de calibración en función de la temperatura; y
- (v) usar la salida del sensor determinada en las etapas (ii) y (iv) para calibrar el sensor;

en donde el analito se une reversiblemente a un receptor en una región de detección del sensor en una relación de analito:receptor de 1:1.

20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

- 25 (vi) variar la temperatura de una tercera solución de calibración de una quinta temperatura (T_5) a una sexta temperatura (T_6) mientras la tercera solución de calibración está en contacto con la región de detección, teniendo la tercera solución de calibración una concentración de analito que es distinta de las de las primera y segunda soluciones de calibración; y
- (vii) determinar la salida del sensor para la tercera solución de calibración en función de la temperatura;

en donde la etapa (v) comprende el uso de la salida del sensor determinada en las etapas (ii), (iv) y (vii) para calibrar el sensor.

30 3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde T_2 es mayor que T_1 , T_4 es mayor que T_3 , y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), T_6 es mayor que T_5 , preferentemente en donde T_3 es menor que o igual a T_2 , y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), T_5 es menor que o igual a T_4 .

35 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la segunda solución de calibración se forma mezclando la primera solución de calibración con una cantidad de analito, y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), la tercera solución de calibración se forma mezclando la segunda solución de calibración con una cantidad adicional de analito.

40 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la concentración de analito en la primera solución de calibración es de cero.

45 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el sensor es un sensor óptico.

7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el analito es glucosa.

50 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde una primera cantidad de glucosa se mezcla con la primera solución de calibración para formar la segunda solución de calibración y, cuando se usan las etapas (vi) y (vii), una segunda cantidad de glucosa se mezcla con la segunda solución de calibración para formar la tercera solución de calibración, en donde dichas primera y segunda cantidades de glucosa se proporcionan en forma sólida, forma sólida que comprende glucosa alfa y beta.

55 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el analito es glucosa y el receptor comprende una especie de ácido borónico.

60 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente (viii) poner en contacto la región de detección del sensor con una muestra y determinar la concentración de analito en la muestra;

en donde el tiempo entre la etapa (i) que se lleva a cabo y la etapa (viii) que se lleva a cabo es de 24 horas o menos.

11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la etapa (ii) comprende:

- a. ajustar dos o más temperaturas en un intervalo de temperaturas de T_1 a T_2 a la siguiente ecuación:

65

$$I = I_1 + s_1(T - T_c)$$

en donde I es la salida del sensor, T es la temperatura, T_c es la temperatura de calibración nominal, I_1 es la salida del sensor para la primera solución de calibración a T_c y s_1 es una constante; y

5 b. determinar s_1 ;

la etapa (iv) comprende

a. ajustar dos o más temperaturas en un intervalo de temperaturas de T_3 a T_4 a la siguiente ecuación:

10

$$I = I_2 + s_2(T - T_c)$$

en donde I , T , y T_c , son como se define anteriormente, I_2 es la salida del sensor para la segunda solución de calibración a T_c , y s_2 es una constante; y

15 b. determinar s_2 ;

la etapa (v) comprende

a. determinar los valores de los coeficientes de temperatura α y β usando las siguientes ecuaciones:

20

$$\alpha = \frac{s_1}{I_0} \left[\frac{1 - \frac{\rho_1 s_2 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 s_1 (1 + \rho_1 K_a)^2}}{1 - \frac{\rho_1 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 (1 + \rho_1 K_a)^2}} \right]$$

$$\beta = \frac{(1 + \rho_2 K_a)^2 T_c (s_2 - s_1)}{(I_\infty - I_0) \rho_2 K_a} \left[\frac{1}{1 - \frac{\rho_1 (1 + \rho_2 K_a)^2}{\rho_2 (1 + \rho_1 K_a)^2}} \right]$$

25 en donde I_0 es la salida del sensor para la concentración de analito cero a T_c , I_∞ es la salida del sensor a concentración de analito infinita, ρ_1 es la concentración de analito en la primera solución de calibración, ρ_2 es la concentración de analito en la segunda solución de calibración, K_a es la constante de asociación para la unión reversible de receptor y analito, y s_1 y s_2 son como de determina anteriormente; y

30 b. usar α y β para calibrar el sensor.

12. Un sistema de calibración que comprende al menos una cámara de calibración, un sensor de temperatura, uno o más elementos de calentamiento o enfriamiento, y uno o más módulos de control, en donde los uno o más módulos de control están configurados para:

35 poner en contacto la región de detección de un sensor de unión reversible con soluciones de calibración consecutivas;

verificar la temperatura de las soluciones de calibración;

controlar los uno o más elementos de calentamiento o enfriamiento para ajustar la temperatura de las soluciones de calibración suministrando calor o eliminando calor de la cámara de calibración;

40 introducir o cambiar la solución de calibración dentro de la cámara de calibración, o mover el sensor de unión reversible entre una pluralidad de cámaras de calibración;

determinar la salida del sensor de dicho sensor en función de la temperatura para cada una de dichas soluciones de calibración; y determinar los parámetros de calibración para el sensor basándose en los datos obtenidos;

45 y en donde los uno o más módulos de control están configurados para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Un sistema de calibración de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el sistema de calibración comprende adicionalmente un sensor de unión reversible para la detección de un analito.

Fig. 1

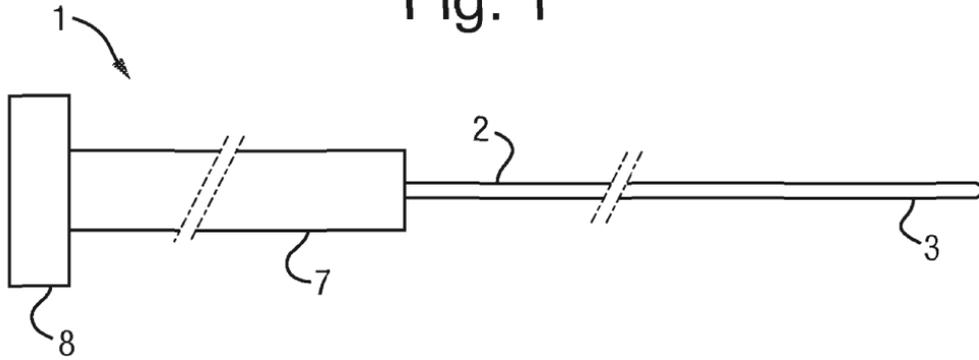


Fig. 2

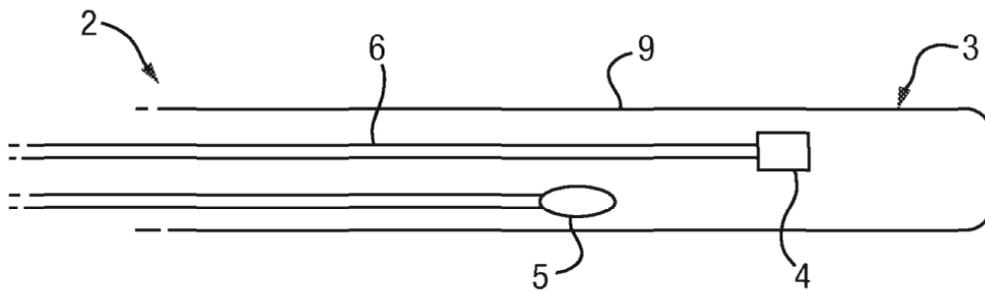


Fig. 3a

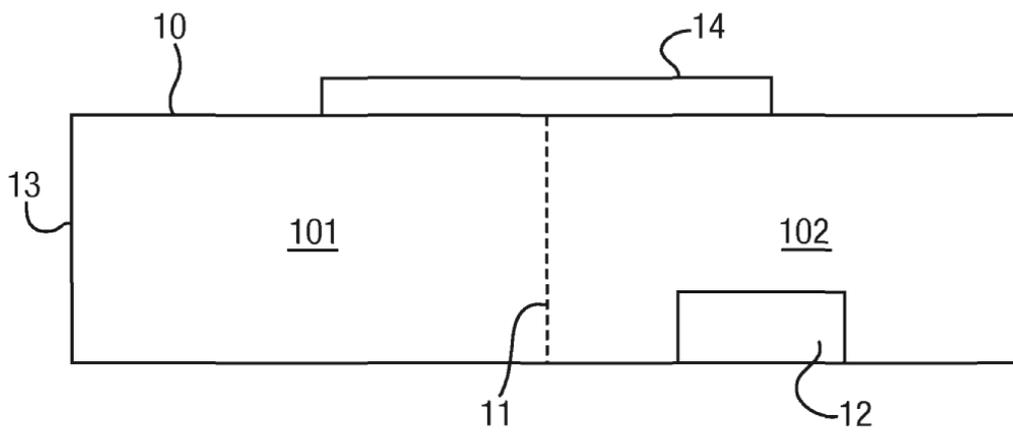


Fig. 3b

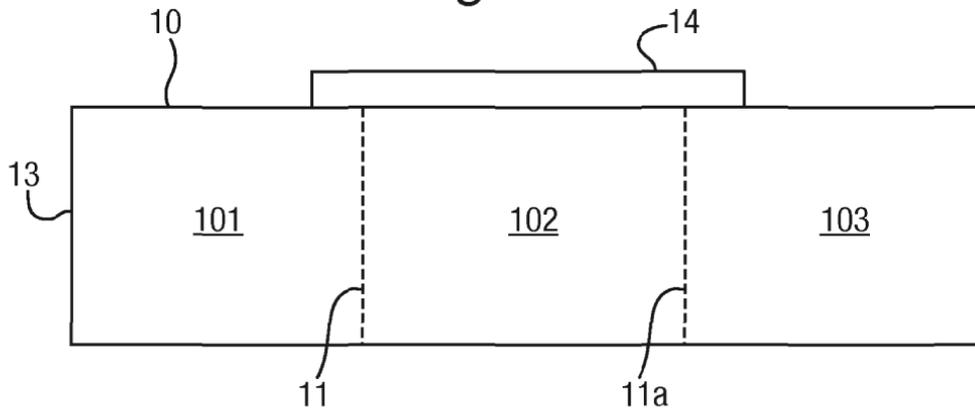


Fig. 4

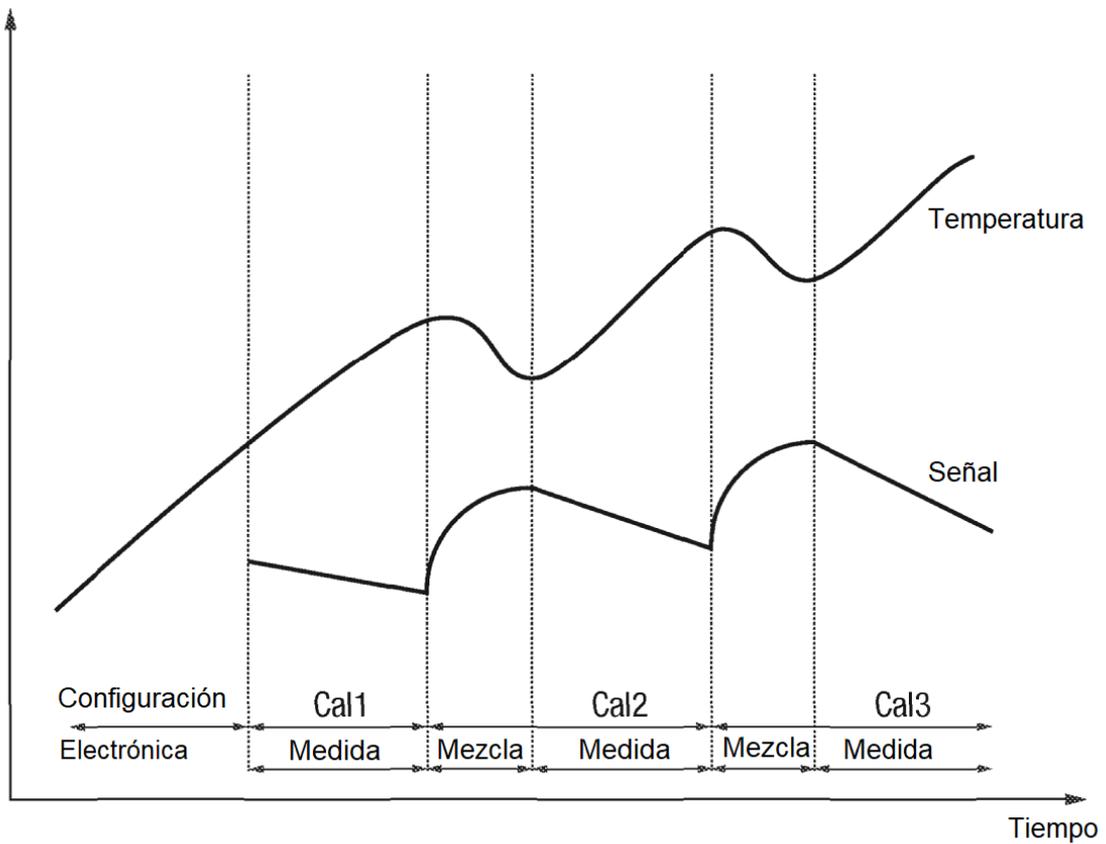


Fig. 5

Resultados de Calibración de FHU		
mmol	señal	CT
0	1,0000	-0,0220
13,4	1,2502	-0,0339
23,4	1,3873	-0,0386
I_0	1,0000	
I_∞	2,4538	
K	0,0155	
Mod _{5mM}	9,48	
α	-0,0220	
β	-17,8015	

Resultados de Calibración de FHU		
mmol	señal	CT
0	1,0000	-0,0148
14,1	1,3989	-0,0412
28,2	1,6000	-0,0402
I_0	1,0000	
I_∞	2,2096	
K	0,0349	
Mod _{5mM}	15,23	
α	-0,0148	
β	-26,0293	

Resultados de Calibración de FHU		
mmol	señal	CT
0	1,0000	-0,0205
13,1	1,8677	-0,0513
27	2,3059	-0,0700
I_0	1,0000	
I_∞	3,4925	
K	0,0408	
Mod _{5mM}	29,68	
α	-0,0205	
β	-24,6896	

Fig. 6

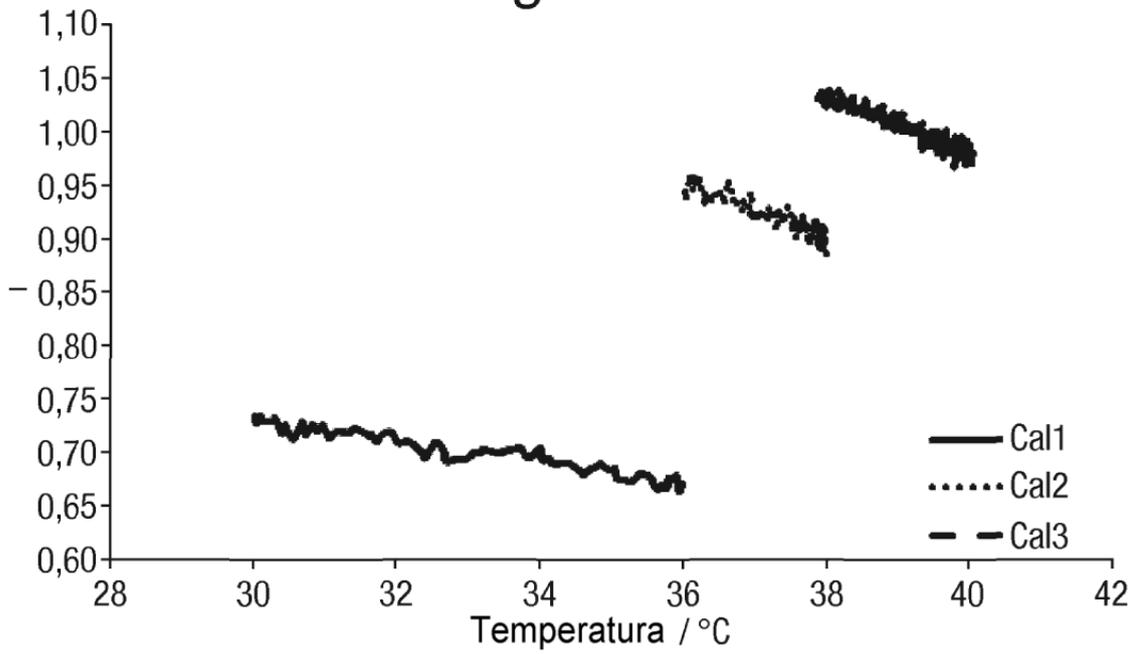


Fig. 7

Resultados de Calibración de FHU		
mmol	señal	CT
0,0	0,6620	-0,0098
14,1	0,9261	-0,0273
28,2	1,0592	-0,0266
I_0	0,6620	
I_∞	1,4588	
K	0,03526	
Mod _{5mM}	15,28	
α	-0,014804	
β	-26,15886	

Fig. 8

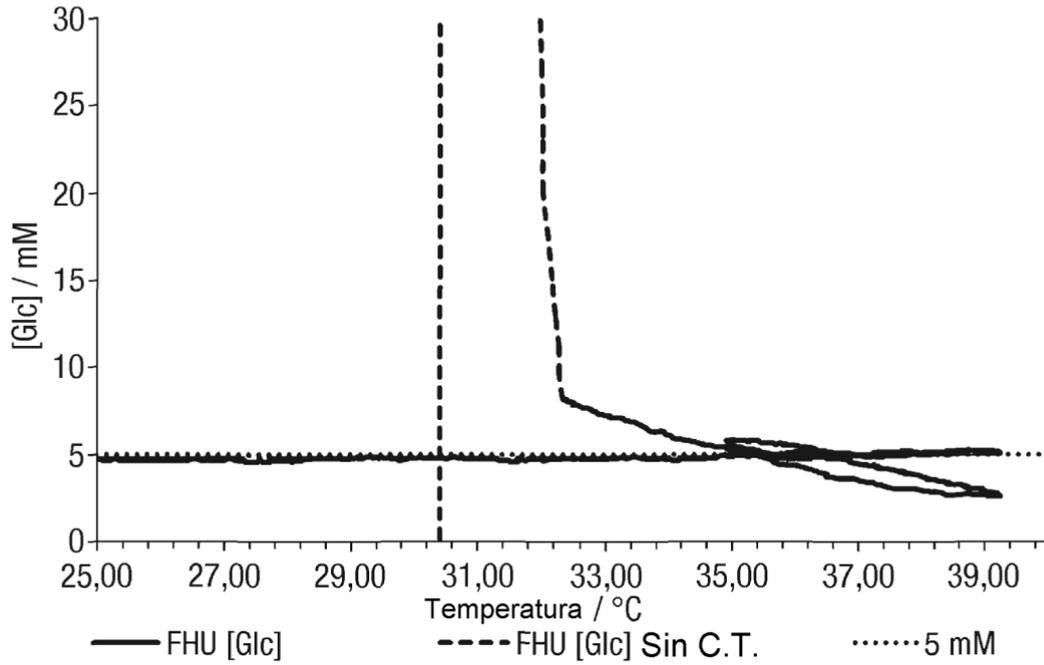


Fig. 9

Temp / °C	Calibración por Temperatura Variable		Calibración por Temperatura Fija	
	[Glc] / mM	% de error	[Glc] / mM	% de error
32	4,9	-3,8	7,6	50,6
33	4,9	-3,5	7,0	37,0
34	4,9	-3,3	6,3	23,4
35	4,9	-3,1	5,6	9,9
36	4,9	-2,8	4,9	-3,7
37	4,9	-2,6	4,2	-17,3
38	5,0	-2,4	3,5	-30,9
39	5,0	-2,1	2,8	-44,4
40	5,0	-1,9	2,1	-58,0

Fig. 10

