

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 857**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/487** (2006.01)

**G01N 33/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2013 PCT/GB2013/051582**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13190281**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2013 E 13733032 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2864780**

54 Título: **Sensor de glucosa**

30 Prioridad:

**21.06.2012 US 201261662560 P**  
**27.11.2012 US 201213686760**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CRANE, BARRY COLIN;**  
**PATERSON, WILLIAM;**  
**BARWELL, NICHOLAS PAUL y**  
**EDGLEY, PETER**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 728 857 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

Sensor de glucosa

- 5 La invención se refiere a sensores de glucosa para detectar y cuantificar la cantidad de glucosa en una muestra que puede contener una especie interferente, por ejemplo, manitol. También se proporcionan métodos para cuantificar la cantidad de glucosa en dicha muestra.

10 **Antecedentes**

- 10 Se sabe que los ácidos borónicos forman aductos reversibles con 1,2- y 1,3-dioles. Este fenómeno se ha utilizado al unir un receptor de ácido borónico a los cromóforos o fluoróforos en un intento de diseñar sensores para la medición continua de la glucosa. También se han diseñado productos químicos fluoróforos de ácido diborónico que producen aductos 1:1 con 1,2-dioles. Además, si el ácido diborónico está unido a los fluoróforos a través de un enlace corto, entonces, la química funciona mediante un mecanismo de transferencia de electrones fotoinducido ("PET").

15 Ha habido un enorme impulso para utilizar estas químicas en el desarrollo de sensores para medir la glucosa fisiológica. El objetivo ha sido mejorar la precisión y la fiabilidad para calcular la concentración de glucosa.

20 **Sumario**

Las especies interferentes a veces pueden estar presentes en cantidades significativas en la sangre. Por ejemplo, el manitol puede estar presente en un entorno clínico. Las especies interferentes, incluyendo el manitol, pueden ser capaces de competir con la glucosa para unirse al receptor de ácido borónico en un sensor de glucosa.

- 25 Las especies interferentes, tales como el manitol, pueden llevar a errores durante los métodos de detección de glucosa. Algunos posibles interferentes, tales como los sacáridos (por ejemplo, manitol), tienen un peso molecular y una estructura química similares a la glucosa. Por lo tanto, aunque se pueden usar capas de barrera protectora para bloquear algunos posibles interferentes, ciertos posibles interferentes, incluyendo el manitol, pueden atravesar las capas de barrera permeables a la glucosa. Cuando surgen errores significativos durante la monitorización de los niveles de glucosa de un paciente (por ejemplo, debido a la presencia de un interferente tal como el manitol en la sangre), pueden surgir diagnósticos y/o patrones de tratamiento médico erróneos potencialmente peligrosos.

- 30 Los sensores de glucosa y los métodos proporcionados en el presente documento, por lo tanto, abordan el problema de las imprecisiones que surgen durante la detección química de los sensores de glucosa, en particular, cuando estas imprecisiones surgen debido a la presencia de un interferente en la muestra.

- 35 Los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir la obtención de dos mediciones de la cantidad de glucosa usando un primer y un segundo método de medición, métodos que difieren en su sensibilidad a la cantidad de interferente de la muestra. La comparación entre las dos mediciones se puede usar para determinar si hay algún interferente presente en la muestra y, si es así, para tomar las medidas adecuadas para abordar este problema, por ejemplo, para obtener una evaluación precisa de la concentración de glucosa en la muestra.

- 40 Por lo tanto, un método para cuantificar la cantidad de glucosa de una muestra que puede incluir un interferente puede incluir:

- 45 proporcionar luz incidente a la región de detección de un sensor de glucosa expuesto a la muestra, en el que el sensor de glucosa comprende una región de detección que comprende al menos un primer sistema indicador que incluye un primer receptor para la unión a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor, un
- 50 segundo sistema indicador que comprende un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, y una matriz polimérica, en el que el primer receptor y el primer fluoróforo y el segundo receptor y el segundo fluoróforo están unidos a la matriz polimérica de modo que la primera matriz polimérica porta simultáneamente el primer receptor y el primer fluoróforo junto con el segundo receptor y el segundo fluoróforo, y
- 55 una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección;
- obtener una primera medición de la cantidad de glucosa mediante un primer método de medición que incluye detectar la emisión de dicho primer fluoróforo;
- obtener una segunda medición de la cantidad de glucosa mediante un segundo método de medición que comprende detectar la emisión de dicho segundo fluoróforo, en el que el segundo método de medición difiere en
- 60 su sensibilidad hacia la cantidad de dicho interferente en la muestra con respecto al primer método de medición; y comparar dicha primera medición y dicha segunda medición y, de ese modo, determinar si cualquier dicho interferente está presente en la muestra;

- 65 en el que dicho interferente es una sustancia que es capaz de interferir en la unión de la glucosa a dicho primer receptor.

En algunos casos, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen:

proporcionar luz incidente a la región de detección de un sensor de glucosa expuesto a la muestra, en el que el sensor de glucosa comprende una región de detección que incluye:

5 un primer sistema indicador que incluye un primer receptor para unirse a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor, en el que dicho primer receptor tiene una constante de asociación  $K_{G1}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M1}$  con dicho interferente, y  
 10 un segundo sistema indicador que incluye un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, en el que dicho segundo receptor tiene una constante de asociación  $K_{G2}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M2}$  con dicho interferente, y en el que  $K_{G2}/K_{M2}$  es diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ ; y

15 una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección;  
 obtener una primera medición de la cantidad de glucosa mediante un primer método de medición que incluye detectar la emisión de dicho primer fluoróforo;  
 obtener una segunda medición de la cantidad de glucosa mediante un segundo método de medición que incluye detectar la emisión de dicho segundo fluoróforo; y  
 20 comparar dicha primera medición y dicha segunda medición, determinando de este modo si alguno de dichos interferentes está presente en la muestra, y corrigiendo la presencia de cualquier dicho interferente en la muestra.

Este método preferido es particularmente ventajoso, porque se puede usar un solo protocolo experimental simultáneamente para obtener la primera y la segunda medición, es decir, una técnica de fluorescencia de emisión que implica proporcionar luz incidente a la región de detección del sensor (en una sola etapa) y detectar (en un solo espectro de emisión/una sola medición de emisión) la emisión tanto del primer como del segundo fluoróforo. La comparación entre la fluorescencia de los dos fluoróforos puede permitir la corrección (eliminación) de cualquier contribución interferente a la fluorescencia del sistema, como se describirá más adelante.

Por lo tanto, en este método preferido, no hay necesidad de realizar por separado una verificación experimental del contenido de interferente de la muestra, por ejemplo, tomando una muestra de sangre y sometiéndola a análisis de laboratorio (por ejemplo, mediante métodos electroquímicos). Por consiguiente, el método preferido del documento es particularmente conveniente, rápido y fácil de manejar (por ejemplo, sin la presencia de médicos especialistas capacitados).

El presente documento también proporciona un sensor de glucosa relacionado, en concreto, un sensor de glucosa para cuantificar la cantidad de glucosa de una muestra que puede incluir además un interferente, incluyendo el sensor:

una región de detección que incluye:

40 un primer sistema indicador que incluye un primer receptor para unirse a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor, en el que dicho primer receptor tiene una constante de asociación  $K_{G1}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M1}$  con dicho interferente, y  
 un segundo sistema indicador que incluye un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, en el que dicho segundo receptor tiene una constante de asociación  $K_{G2}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M2}$  con dicho interferente, y en el que  $K_{G2}/K_{M2}$  es diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ , una matriz polimérica;

45 y  
 una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección, en el que:

50 dicho primer receptor y dicho segundo receptor son receptores de ácido borónico, o comprenden uno o más grupos de fórmula  $H_3AsO_3$ ,  $H_2AsO_3^-$ ,  $H_6TeO_6$ ,  $H_5TeO_6^-$ ,  $Ge(OH)_6$  o  $GeO(OH)_3$ , o sus derivados; y  
 el primer receptor y el primer fluoróforo y el segundo receptor y el segundo fluoróforo están unidos a la matriz polimérica de modo que la matriz polimérica porta simultáneamente el primer receptor y el primer fluoróforo  
 55 junto con el segundo receptor y el segundo fluoróforo.

Este sensor de glucosa se puede usar para llevar a cabo el método preferido del documento.

60 Otras características y realizaciones preferidas se describen en la descripción que se acompaña y en las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 y 1a representan un sensor que tiene incorporados una fibra óptica y un monitor para dicho sensor. Las Figuras 2, 3 y 3a representan diversas realizaciones de una región de detección de un sensor.

5 La Figura 4 muestra un diagrama de flujo que ilustra esquemáticamente un método proporcionado en el presente documento.

La Figura 5 muestra un diagrama de flujo que ilustra esquemáticamente una realización del método proporcionado en el presente documento.

10 La Figura 6 muestra un diagrama de flujo que ilustra esquemáticamente otra realización de un método similar a los métodos proporcionados en el presente documento.

La Figura 7 representa los resultados del Ejemplo 2 de la siguiente manera: A) Espectros de emisión de fluorescencia registrados en el estudio de unión de hidrogel **4** frente a D-glucosa en PBS a longitudes de onda de excitación de 350 y 405 nm y al valor de [D-glucosa]<sub>valorante</sub> de 214 mM (cabe señalar que las líneas inferiores a las líneas superiores siguen en el orden de las concentraciones inferiores a las concentraciones altas); B) Espectros

15 de emisión de fluorescencia registrados en el estudio de unión de hidrogel **4** frente a D-manitol en PBS a longitudes de onda de excitación de 350 y 405 nm y a [manitol]<sub>valorante</sub> de 184 mM (cabe señalar que las líneas inferiores a las líneas superiores siguen en el orden de las concentraciones inferiores a las concentraciones altas); C) Perfil de intensidad de fluorescencia relativa frente a la concentración de carbohidratos de hidrogel **4** frente a D-glucosa,  $\lambda_{ex} = 350$  nm,  $\lambda_{em} = 380$  nm y  $\lambda_{ex} = 405$  nm,  $\lambda_{em} = 487$  nm; y D) Perfil de intensidad de fluorescencia relativa frente a la concentración de carbohidratos de hidrogel **4** frente a D-manitol,  $\lambda_{ex} = 350$  nm,  $\lambda_{em} = 380$  nm y  $\lambda_{ex} = 405$  nm,  $\lambda_{em} = 487$  nm.

### Descripción detallada

25 Un método descrito en el presente documento puede incluir el uso de un sensor de glucosa que incluye:

una región de detección que incluye al menos un primer sistema indicador que incluye un primer receptor para la unión a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor; y  
una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección.

30 Un método descrito en el presente documento puede usar sensores de glucosa de fibra óptica (es decir, un sensor de glucosa en el que la guía de onda óptica es una fibra óptica), pero los métodos descritos en el presente documento también pueden llevarse a cabo con sensores que tienen diferentes tipos de guías de onda ópticas.

35 Los métodos de detección de glucosa descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo en una solución acuosa. En algunos casos, los métodos de detección de glucosa descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en fluidos corporales, tales como tejido intersticial o sangre. Por ejemplo, los sensores de glucosa descritos en el presente documento pueden usarse como sensores invasivos e introducirse en un vaso sanguíneo. Los métodos de detección de glucosa proporcionados en el presente documento pueden usar sensores no invasivos para su uso *in vitro*, sensores implantables y/o sensores subcutáneos.

45 En las Figuras 1 y 1a, se presente un ejemplo de un sensor que tiene incorporada una fibra óptica. El sensor 1 incluye una fibra óptica 2 que incluye una región de detección 3 en su extremo distal. En algunos casos, el sensor 1 puede ser un sensor invasivo. El sensor 1 incluye una fibra 2. La fibra 2 puede estar adaptada para la introducción en un paciente, por ejemplo, la inserción en un vaso sanguíneo a través de una cánula. La región de detección 3 (representada con más detalle en las Figuras 2, 3 y 3a) contiene una celda o cámara 7 en la que está contenido el, o cada, sistema indicador. La fibra óptica se extiende a través del cable 4 al conector 5, que está adaptado para acoplarse con un monitor 8 apropiado. El monitor puede incluir otro cable óptico 4a que se acopla con el conector en 5a y en las otras bifurcaciones para conectarse a (a) una fuente de luz incidente apropiada para el sensor óptico 9 y  
50 (b) un detector para la señal de retorno 10.

En algunas realizaciones, el sensor es un sensor desechable. Un sensor desechable puede adaptarse para conectarse a un monitor no desechable que incluya una fuente de luz 9 y un detector 10.

55 Como se representa en la Figura 2, la región de detección 3 incorpora una celda 7 en forma de una cámara dentro de la fibra. La celda puede adoptar cualquier forma, siempre que el sistema indicador esté contenido en la trayectoria de la luz incidente dirigida por la guía de onda (por ejemplo, una fibra). Por lo tanto, la celda puede estar unida al extremo distal de la fibra o guía de onda, o puede estar en forma de una cámara dentro de la fibra que tiene cualquier forma deseada.

60 Opcionalmente, puede haber un agente de neutralización de especies reactivas de oxígeno ("ROS") en el sensor, por ejemplo, dentro de la región de detección o dentro de una capa de barrera opcional como se describe en el presente documento con más detalle. Un ejemplo de una especie de oxígeno reactivo es el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los agentes de neutralización de ROS adecuados son los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. 61/524.525 y el documento PCT/GB2012/051921. Los medios adecuados para incorporar el agente de neutralización de ROS en un sensor de glucosa también se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 61/524.525 y el documento

PCT/GB2012/051921.

La región de detección 3 del sensor de glucosa tiene una o más aberturas 6a, 6b para permitir que la glucosa entre en la celda. Opcionalmente, se puede proporcionar una capa de barrera "CB" permeable a la glucosa a través de estas aberturas para que la glucosa entre en la celda a través de la capa de barrera. Una capa de barrera permeable a la glucosa usada en un sensor de glucosa proporcionado en el presente documento puede ser capaz de restringir al menos parcialmente el paso de materiales de alto peso molecular, tales como las proteínas.

En las Figuras 2, 3 y 3a, la capa de barrera CB opcional se proporciona sobre toda la región de detección 3. Como alternativa, sin embargo, la capa de barrera CB opcional puede proporcionarse solo en una parte de la región de detección, por ejemplo, solo a través de aberturas 6a y 6b.

En resumen, la Figura 2 muestra una realización en la que la capa de barrera CB opcional se aplica directamente sobre la región de detección 3, en este caso, en la punta de la fibra óptica, a través de uniones (por ejemplo, puntos de unión termoformados) Ja y Jb. En la Figura 3, la región de detección 3 se proporciona dentro de un soporte 11 separado y la capa de barrera CB se proporciona en el soporte 11 (de nuevo a través de las uniones Ja y Jb). En la Figura 3a, la propia capa de barrera forma una estructura de soporte "CB/11". Detalles adicionales sobre construcciones de sensores adecuadas cuando se incorpora una capa de barrera, y sobre materiales adecuados para dichas capas de barrera, se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 61/524.525, el documento PCT/GB2012/051921 y el documento WO2011/101 626.

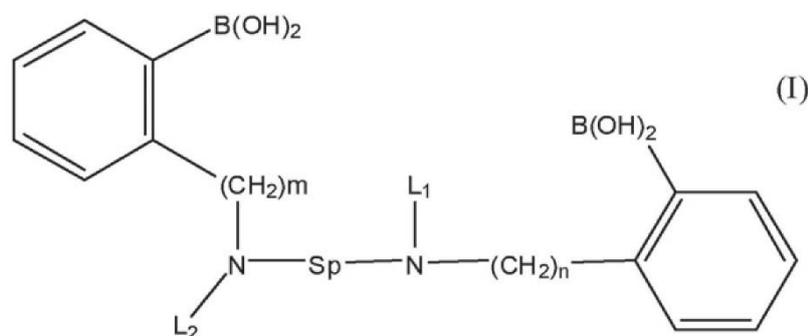
Como es evidente, son posibles sensores de glucosa que tengan características de diseño adicionales o diferentes de las que se muestran en las figuras adjuntas, siempre que estas incluyan ambos de los requeridos: (i) región de detección que incluye al menos un primer sistema indicador que incluye un primer receptor para la unión a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor; e (ii) una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección. Por ejemplo, se pueden usar sensores de glucosa como los descritos e ilustrados en los documentos WO2008/141241, WO2008/098087 y WO2011/113020.

Por "sistema indicador" se entiende una combinación de un receptor para unirse a la glucosa y un fluoróforo asociado con el mismo, de manera que el patrón de emisión (por ejemplo, la longitud de onda, la intensidad, la vida útil) del fluoróforo se altera cuando la glucosa se une al receptor (permitiendo así que el comportamiento de emisión del fluoróforo actúe como un "indicador" de la presencia de glucosa).

El primer receptor y el primer fluoróforo pueden unirse directamente entre sí como una primera construcción de receptor-primer fluoróforo. Los ejemplos de primeros fluoróforos adecuados incluyen antraceno, pireno y derivados de los mismos. Son ejemplos de primeros receptores adecuados los receptores de ácido borónico, tales como los compuestos que tienen al menos uno (por ejemplo, uno o dos), o al menos dos (por ejemplo, dos o tres) grupos de ácido borónico.

Los receptores adecuados también incluyen receptores que contienen arsénico, receptores que contienen telurio y receptores que contienen germanio, por ejemplo, receptores que comprenden uno o más grupos de fórmula  $H_3AsO_3$ ,  $H_2AsO_3^-$ ,  $H_6TeO_6$ ,  $H_5TeO_6^-$ ,  $Ge(OH)_6$  o  $GeO(OH)_3$ , o sus derivados. Los ejemplos de dichos receptores incluyen los receptores develados en el documento US 2005/0158245.

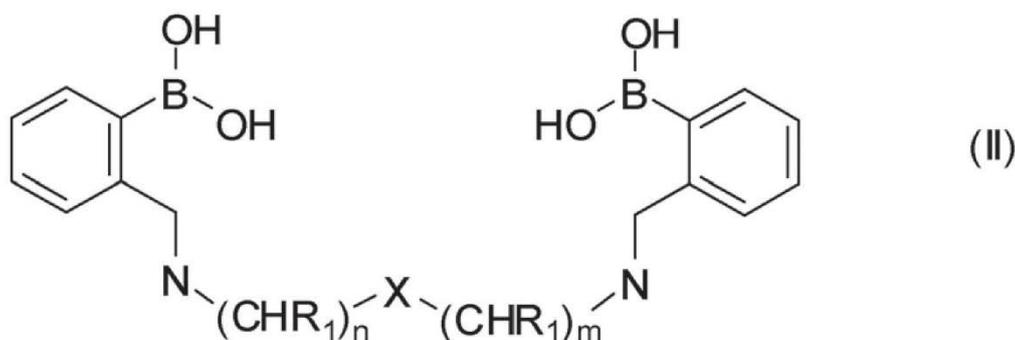
En una realización preferida, el primer receptor es un grupo de fórmula (I)



en la que m y n son iguales o diferentes, y son normalmente uno o dos, preferentemente uno; Sp es un espaciador alifático, normalmente una fracción de alquileo, por ejemplo, una fracción de alquileo  $C_1-C_{12}$ , por ejemplo, una fracción de alquileo  $C_6$ ; y  $L_1$  y  $L_2$  representan posibles puntos de unión a otras fracciones, por ejemplo, a un fluoróforo o a un hidrogel. Por ejemplo,  $L_1$  y  $L_2$  pueden representar una fracción de alquileo, alquilen-arileno o alquilen-arileno-alquileo, unida a un grupo funcional. Cuando no se prevé una unión a otra fracción, el grupo funcional está protegido o reemplazado por un átomo de hidrógeno. Los grupos alquileo típicos para  $L_1$  y  $L_2$  son grupos alquileo  $C_1-C_4$ , por

ejemplo, metileno y etileno. Los grupos arileno típicos son grupos fenileno. El grupo funcional normalmente es cualquier grupo que pueda reaccionar para formar un enlace con, por ejemplo, el fluoróforo o hidrogel, por ejemplo, éster, amida, aldehído o azida. La variación de la longitud del espaciador Sp altera la selectividad del receptor. Una cadena de alquileno C<sub>6</sub> puede proporcionar un receptor que tenga una buena selectividad hacia la glucosa. En el documento US 6.387.672, se encuentran más detalles de dichos receptores.

Otros ejemplos de primeros receptores adecuados para los sensores descritos en el presente documento incluyen aquellos de fórmula (II):



en la que X representa O, S, NR<sub>2</sub> o CHR<sub>3</sub>;

n es de 1 a 4;

m es de 1 a 4, y n + m es 5;

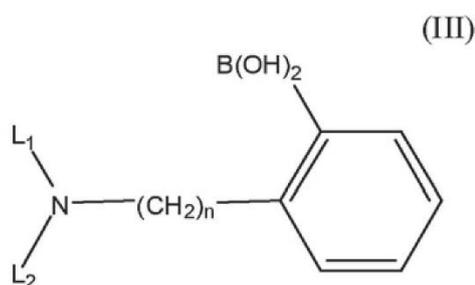
R<sub>2</sub> representa hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>;

cada R<sub>1</sub> es igual o diferente, y representa hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> o cicloalquilo C<sub>3-7</sub>;

o R<sub>1</sub>, junto con un grupo R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub> adyacente, y los átomos de carbono o nitrógeno a los que están unidos, forman un cicloalquilo C<sub>3-7</sub> o un grupo heterociclilo de 5 o 6 elementos,

en el que cuando X representa CHR<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> junto con un grupo R<sub>1</sub> adyacente y los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo cicloalquilo C<sub>3-7</sub>. En el documento US 61/431.756, se encuentran detalles adicionales de los receptores de este tipo.

Un ejemplo de un receptor de ácido borónico que tiene un grupo de ácido borónico es un compuesto de la siguiente fórmula (III)



en la que:

n es de uno a tres, preferentemente, uno o dos, y más preferentemente uno; y

L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> representan posibles puntos de unión a otras fracciones, por ejemplo, a un fluoróforo o a un hidrogel.

Por ejemplo, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> pueden representar una fracción de alquileno, alquilen-arileno o alquilen-arileno-alquileno, unida a un grupo funcional. Cuando no se prevé una unión a otra fracción, el grupo funcional está protegido o reemplazado por un átomo de hidrógeno. Los grupos alquileno típicos para L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> son grupos alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, por ejemplo, metileno y etileno. Los grupos arileno típicos son grupos fenileno. El grupo funcional normalmente es cualquier grupo que pueda reaccionar para formar un enlace con, por ejemplo, el fluoróforo o hidrogel, por ejemplo, éster, amida, aldehído o azida.

Como se ha explicado anteriormente, el primer receptor puede ser un compuesto que tenga un grupo de ácido borónico tal como el de fórmula (III). Sin embargo, más normalmente, el primer receptor incluye dos grupos de ácido borónico. Como se explica con más detalle más adelante, cuando hay además un segundo receptor presente, este segundo receptor puede ser un compuesto que tenga un grupo de ácido borónico, tal como un compuesto de fórmula (III). Como se usa en el presente documento, el término alquilo o alquileno es un grupo o una fracción alquilo lineal o

ramificado. Una fracción alquileo puede contener, por ejemplo, de 1 a 15 átomos de carbono tales como una fracción alquileo C<sub>1-12</sub>, una fracción alquileo C<sub>1-6</sub> o una fracción alquileo C<sub>1-4</sub>, por ejemplo, metileno, etileno, *n*-propileno, *i*-propileno, *n*-butileno, *l*-butileno y *t*-butileno. Alquilo C<sub>1-4</sub> normalmente es metilo, etilo, *n*-propilo, *l*-propilo, *n*-butilo o *t*-butilo. Para disipar cualquier duda, cuando están presentes dos grupos alquilo o fracciones alquileo, los grupos alquilo o las fracciones alquileo pueden ser iguales o diferentes.

Un grupo alquilo o una fracción alquileo puede estar no sustituida o sustituida, por ejemplo, puede portar uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, amina, (alquil C<sub>1-4</sub>)-amina, di(alquil C<sub>1-4</sub>)-amina y alcoxi C<sub>1-4</sub>. Preferentemente, un grupo alquilo o una fracción alquileo no está sustituido.

Como se usa en el presente documento, un grupo arileno es un grupo insaturado que puede ser monocíclico, bicíclico, o que puede contener tres o cuatro anillos condensados. Por lo general, un grupo arileno es fenileno. Los grupos arileno pueden estar sin sustituir o sustituidos. Los sustituyentes adecuados son grupos alquilo C<sub>1-4</sub>, por ejemplo, metilo y etilo. Preferentemente, un grupo arileno no está sustituido.

Como se usa en el presente documento, un grupo cicloalquilo C<sub>3-7</sub> normalmente es un grupo ciclopentilo o ciclohexilo. Los grupos cicloalquilo C<sub>3-7</sub> pueden estar sin sustituir o sustituidos. Los sustituyentes adecuados son grupos alquilo C<sub>1-4</sub>, por ejemplo, metilo y etilo. Preferentemente, un grupo cicloalquilo C<sub>3-7</sub> no está sustituido. Como se usa en el presente documento, un grupo heterociclilo de 5 o 6 elementos es un anillo saturado de 5 o 6 elementos que contiene uno o más, normalmente, uno o dos, por ejemplo, uno, heteroátomo seleccionado entre N, O y S. Los grupos heterociclilo preferidos son aquellos que contienen un átomo de nitrógeno, por ejemplo, piperidinilo y pirrolidinilo. Los grupos heterociclilo pueden estar sin sustituir o sustituidos. Los sustituyentes adecuados son grupos alquilo C<sub>1-4</sub>, por ejemplo, metilo y etilo. Preferentemente, un grupo heterociclilo no está sustituido.

El primer receptor y el primer fluoróforo se unen normalmente entre sí y además se unen a una matriz polimérica tal como un hidrogel, o a un dendrímero. Los ejemplos de hidrogeles y dendrímeros adecuados son los descritos en el documento WO 2011/101624.

Como alternativa, el primer receptor y el primer fluoróforo pueden no estar unidos directamente entre sí (por ejemplo, pueden estar unidos solo a través de una cadena polimérica tal como cadena polimérica contenida dentro de una matriz de hidrogel). Será evidente que cuando el primer receptor y el primer fluoróforo no están unidos directamente entre sí, todavía deben ser capaces de interactuar de manera que el comportamiento de fluorescencia del primer fluoróforo cambie cuando el sistema indicador se exponga a la glucosa. Por ejemplo, el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo pueden ser capaces de unirse electrostáticamente (por ejemplo, como un par de carga), cuya unión puede ser interrumpida al menos parcialmente por la presencia de glucosa. Los ejemplos de primeros fluoróforos adecuados incluyen piranina (HPTS) y sus derivados, tales como la propia HPTS y los derivados HPTS-PEG, HPTS-MA, HPTS-CO<sub>2</sub>, HPTS-TriCys-MA y HPTS-LysMA desvelados en el documento US 2009/0177143.

Otros primeros fluoróforos adecuados pueden incluir los colorantes SNAF y SNAFL comercializados por Molecular Probes. Los ejemplos de primeros receptores adecuados incluyen ácidos borónicos aromáticos unidos covalentemente a una estructura heterocíclica de bis-onio aromático que contiene nitrógeno (por ejemplo, un viologen). Se proporcionan ejemplos de dichos primeros receptores en el documento US 2009/0177143. Un primer receptor particularmente adecuado es 3,3'-oBBV, como se describe en el documento US 2009/0177143.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra *in vivo*" significa que la muestra es una muestra que está presente en el cuerpo humano o animal (preferentemente, humano). Por ejemplo, dicha muestra puede ser un fluido corporal tal como la sangre que está presente en el cuerpo humano o animal (preferentemente, humano). Una muestra *in vivo* puede contrastarse con una muestra *ex vivo*, por ejemplo, una muestra de sangre *ex vivo*, en la que la muestra se ha retirado (aislado) del cuerpo humano o animal. Por consiguiente, las referencias que aparecen a lo largo de la presente memoria descriptiva a métodos llevados a cabo en una "muestra *in vivo*" significan que el método es un método para cuantificar la cantidad de glucosa en el cuerpo humano o animal (preferentemente, humano). Se ha de aclarar, sin embargo, que una muestra *in vivo* puede someterse a una medición de glucosa (o interferente, por ejemplo, interferente de manitol), ya sea midiendo directamente la concentración de glucosa *in vivo*, por ejemplo, usando un método invasivo como se describe en el presente documento, o extrayendo la muestra del cuerpo y midiendo la concentración de glucosa *in vitro*. En este último caso, la concentración de glucosa (o de interferente, por ejemplo, de interferente de manitol) de la muestra medida se corresponde con la concentración de la muestra *in vivo* en el momento en que se extrajo del cuerpo.

Se deduce de lo anterior que una muestra *in vivo* como se usa en el presente documento variará en términos de su concentración de glucosa e interferente (por ejemplo, manitol) a lo largo del tiempo debido, por ejemplo, al metabolismo del interferente (por ejemplo, manitol) en el cuerpo. Por consiguiente, cuando los métodos descritos en el presente documento toman dos o más mediciones de una muestra *in vivo* en diferentes puntos de tiempo, la muestra no necesariamente tendrá la misma composición en esos diferentes puntos de tiempo.

En la medida en que los métodos del documento se llevan a cabo en muestras *in vivo*, todos los procedimientos llevados a cabo de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento (incluyendo la inserción en la

muestra de un sensor de glucosa y la medición electroquímica de la cantidad de glucosa o de interferente en la muestra) son procedimientos de rutina que no implican ningún riesgo importante para la salud del paciente humano o animal y que, además, pueden llevarse a cabo sin demasiada pericia médica. Se apreciará que las etapas como la inserción de una cánula (por ejemplo, en el contexto de la inserción de un sensor de glucosa ilustrativo del presente documento) y la extracción de muestras de sangre con el fin de obtener mediciones electroquímicas (por ejemplo, mediante la extracción con aguja) son habituales en la técnica y pueden ser llevadas a cabo, por ejemplo, por un profesional de enfermería en lugar de requerir la participación de los médicos. Por lo tanto, los métodos proporcionados en el presente documento no constituyen métodos quirúrgicos llevados a cabo en el cuerpo humano o animal.

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden proporcionar luz incidente a una región de detección de un sensor, y se obtiene una primera medición de la cantidad de glucosa mediante un primer método de medición que incluye la detección de la emisión de dicho primer fluoróforo.

El primer método de medición puede comprender realizar una medición en equilibrio de la emisión del primer fluoróforo tras poner el sensor de glucosa en contacto con la muestra.

En un aspecto, el primer sistema indicador puede comprender un primer receptor que sea capaz de inactivar al menos parcialmente la emisión de fluorescencia del primer fluoróforo cuando dicho primer fluoróforo se expone a la luz de excitación (por ejemplo, por asociación del receptor con un agente de inactivación). En este aspecto, cuando el sensor de glucosa se pone en contacto con la muestra, la glucosa de la muestra se une con el primer receptor y, por lo tanto, reduce al menos parcialmente la eficacia de inactivación del primer receptor, lo que conduce a una potenciación de la emisión del primer fluoróforo.

El primer método de medición puede usar una técnica de desplazamiento de colorante.

A la luz de la descripción del presente documento, se apreciará que esta primera medición puede contener una contribución que surge de la unión de un interferente (un ejemplo de los cuales es manitol), en lugar de la glucosa deseada, al receptor cuando hay presente un interferente en la muestra. Dicho de otra forma, la primera medición puede no ser capaz por sí misma de proporcionar una determinación cuantitativa precisa de la concentración de glucosa de una muestra que contiene interferente (es decir, sin tomar medidas adicionales para tener en cuenta la presencia de interferente).

Por consiguiente, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen además obtener una segunda medición de la cantidad de glucosa mediante un segundo método de medición, como se muestra esquemáticamente en el diagrama de flujo de la Figura 4. La naturaleza del segundo método de medición es irrelevante. Los métodos proporcionados en el presente documento son capaces de determinar cuantitativamente la cantidad de glucosa de una muestra.

El segundo método de medición difiere en su sensibilidad hacia la cantidad de interferente en la muestra con respecto al primer método de medición. Por "difiere en su sensibilidad hacia la cantidad de interferente" se entiende que, para una muestra que contiene algún interferente, la contribución hecha por ese interferente a la segunda medición, en relación con la contribución hecha por la glucosa, es diferente de la correspondiente contribución en la primera medición.

Un experto en la materia puede establecer fácilmente si dos métodos de medición "difieren en la sensibilidad hacia la cantidad de interferente de la muestra". Cuando el segundo método de medición incluye la detección de la emisión de un segundo fluoróforo en un segundo sistema indicador, por lo general, tanto el primer como el segundo sistema indicador se calibran previamente para evaluar sus sensibilidades de detección hacia la glucosa y el interferente, y las sensibilidades de detección del primer sistema indicador hacia la glucosa y hacia el interferente son diferentes de las sensibilidades de detección del segundo indicador hacia la glucosa y hacia el interferente.

En general, tanto el primer como el segundo método de medición son capaces de medir "directamente" la cantidad de glucosa de una muestra, es decir, tanto el primer como el segundo método de medición son sensibles a la cantidad de glucosa de la muestra y, por lo tanto, pueden, en ausencia de interferente, usarse para determinar cuantitativamente la concentración de glucosa de una muestra.

Sin embargo, se apreciará que los métodos proporcionados en el presente documento también pueden llevarse a cabo cuando el segundo método de medición sea sensible a la concentración de interferente, pero sea, en realidad, sustancial o completamente insensible a la concentración de glucosa. Por ejemplo, el segundo método de medición, en ciertos casos, solo indica directamente la concentración del interferente, pero todavía permite claramente la comparación con la primera medición para determinar si está presente dicho interferente. Dicho de otra forma, el segundo método de medición puede proporcionar una segunda medición "indirecta", en lugar de una "directa" de la cantidad de glucosa. Para disipar cualquier duda, cabe señalar que los métodos proporcionados en el presente documento pueden usar una segunda medición de una cantidad de glucosa que es directa (la segunda medición incluye una contribución de glucosa) o una segunda medición de una cantidad de glucosa que es indirecta (la segunda medida no incluyendo la contribución de glucosa).

En algunos casos, el segundo método de medición puede incluir, por ejemplo, detectar la emisión de un segundo fluoróforo incluido en un segundo sistema indicador que incluye un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo (como se muestra esquemáticamente en el diagrama de flujo de la Figura 5).

5

#### Segundos métodos de medición

Los métodos descritos en el presente documento pueden basarse en la eliminación metabólica *in vivo* de cualquiera de los interferentes inicialmente presentes en la muestra a lo largo del tiempo, por lo que, como es evidente, dichos métodos son adecuados específicamente para los interferentes que pueden eliminarse metabólicamente (es decir, metabolizarse). Los métodos descritos en el presente documento pueden obtener la concentración de glucosa final y cuantificada una vez que el interferente ha sido al menos sustancialmente metabolizado.

10

En algunos casos, un segundo método de medición usado en un método proporcionado en el presente documento incluye medir la cantidad de glucosa (o interferente) de la muestra, incluyendo el método:

15

- (i) obtener dicha primera medición en un punto temporal  $t_{\text{ensayo}}$ ;
- (ii) obtener dicha segunda medición mediante dicho segundo método de medición, en el que dicho segundo método de medición incluye medir la cantidad de glucosa, o interferente, en la muestra en dicho punto temporal  $t_{\text{ensayo}}$ ; y
- (iii) comparar dicha primera medición y dicha segunda medición, determinando de ese modo si dicha primera medición contiene una contribución del interferente en la muestra.

20

Los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden llevarse a cabo en un sujeto humano o animal, y la muestra es un fluido corporal *in vivo* de dicho sujeto. Por ejemplo, la etapa (i) puede incluir llevar a cabo una medición *in vivo* en dicho fluido corporal en el punto temporal  $t_{\text{ensayo}}$  (por ejemplo, una medición invasiva como se describe en el presente documento o cualquier otro método llevado a cabo directamente en el cuerpo sin extraer la muestra).

25

En algunos casos, los resultados obtenidos en  $t_{\text{ensayo}}$  pueden usarse para establecer si el interferente está teniendo un efecto adverso significativo en (es decir, está haciendo una contribución significativa de interferencia a) la concentración de glucosa medida por el sensor de glucosa (emisión de fluorescencia).

30

Si la etapa de comparación (iii) indica que no hay una contribución del interferente significativa a la primera medición, entonces, no es necesario que se realicen más etapas (se ha confirmado que la primera medición es precisa). Por supuesto, se apreciará que, durante el uso práctico del sensor de glucosa, esto significa que se puede llevar a cabo la medición en curso (continua) de la concentración de glucosa durante un período prolongado usando el primer sistema indicador, ahora se ha establecido que no existe peligro de una lectura falsa por un interferente no metabolizado en la muestra.

35

Si la etapa de comparación (iii) indica que hay una contribución del interferente significativa a la primera medición, un experto (por ejemplo, un profesional de enfermería) puede identificar que la precisión de la medición de la concentración de glucosa del sensor de glucosa se ve comprometida por el interferente. El experto en la materia puede determinar que una medición precisa usando el sensor de glucosa debe tomarse en un momento posterior cuando el interferente se haya metabolizado (al menos parcialmente) y, por lo tanto, se haya eliminado del sistema *in vivo*. En algunos casos, el experto en la materia (por ejemplo, un profesional de enfermería) y/o un sensor proporcionado en el presente documento pueden calcular un tiempo estimado para la eliminación del interferente del sistema *in vivo*. Por ejemplo, el sensor que se proporciona en el presente documento se puede conectar a un monitor que muestre un tiempo propuesto o temporizador de cuenta regresiva para mostrar cuándo se puede tomar una medición precisa. Por "dicha primera medición contiene una contribución del interferente en la muestra" se entiende que la primera medición es al menos un 1 %, por ejemplo al menos un 2 %, al menos un 5 % o al menos un 10 % diferente de la concentración "verdadera" (es decir, la concentración real) de glucosa en la muestra.

40

45

50

Un tiempo posterior adecuado para establecer cuándo se ha metabolizado (al menos parcialmente) el interferente implica llevar a cabo la secuencia de las etapas (i) a (iii) una o más veces, cada una en diferentes puntos de tiempo, hasta que, en dicha etapa (iii), de comparar dicha primera medición y dicha segunda medición, se determina que dicha primera medición contiene una contribución sustancialmente nula o reducida del interferente. Dicho de otra forma, se realizan una o más mediciones y comparaciones, hasta que el interferente se haya metabolizado en un grado aceptable. Por "contribución sustancialmente nula o reducida del interferente" se puede entender que la primera medición es a lo sumo un 10 %, preferentemente a lo sumo un 5 %, más preferentemente a lo sumo un 2 % y, más preferentemente aún, a lo sumo un 1 % superior o inferior a la concentración "verdadera" (es decir, la concentración real) de glucosa en la muestra. Por ejemplo, el método puede incluir llevar a cabo la secuencia de los etapas (i) a (iii) al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces o al menos cinco veces. En algunos casos, el método limita la ejecución de la secuencia de las etapas (i) a (iii) a no más de veinte veces, por ejemplo, no más de diez veces o no más de cinco veces. En algunos casos, el tiempo posterior adecuado para cuando el interferente se ha metabolizado (al menos parcialmente) se puede establecer comparando, en dicha etapa (iii), la primera medición y la segunda medición y, por lo tanto, obteniéndose una estimación de (por ejemplo, un cálculo) la cantidad de interferente

60

65

en la muestra en  $t_{\text{ensayo}}$ . La velocidad de metabolización de muchos interferentes *in vivo* es una cantidad conocida y, por lo tanto, el método puede incluir:

(iv) permitir un retraso de tiempo suficiente para que cualquier interferente presente en la muestra en  $t_{\text{ensayo}}$  se elimine sustancialmente de la muestra;

y

(v) proporcionar luz incidente a la región de detección del sensor y detectar la emisión de dicho primer fluoróforo, obteniéndose así una tercera medición de la cantidad de glucosa en la muestra, teniendo dicha tercera medición una contribución sustancialmente nula o reducida de dicho interferente.

Por permitir que "cualquier interferente presente en la muestra en  $t_{\text{ensayo}}$  se elimine sustancialmente de la muestra" se puede entender que hay un retraso de tiempo suficiente para que la tercera medición sea a lo sumo un 10 %, preferentemente a lo sumo un 5 %, más preferentemente a lo sumo un 2 % y, más preferentemente aún, a lo sumo un 1 % superior o inferior a la concentración "verdadera" (es decir, la concentración real) de glucosa en la muestra.

Como ejemplo ilustrativo, se considera la realización en la que dicho interferente es manitol. La semivida,  $t_{1/2}$ , del manitol *in vivo* es de aproximadamente 100 minutos, y sería una cuestión rutinaria para el experto determinar, una vez que se haya estimado la cantidad de manitol inicialmente presente en la muestra, cuánto tiempo de retraso se requeriría para llevar la concentración de interferente de manitol a un nivel aceptable. Por ejemplo, si después de la estimación inicial se establece que la cantidad de interferente de manitol debería reducirse a aproximadamente la mitad para obtenerse un resultado aceptable, entonces se permitiría un retraso de tiempo de aproximadamente 100 minutos. En algunos casos, un sensor puede calcular un tiempo estimado para cumplir con una cierta precisión, y el tiempo estimado se puede mostrar en un monitor (por ejemplo, como un temporizador de cuenta regresiva).

#### Fluorescencia de emisión como segundo método de medición

El método proporcionado en el presente documento incluye un segundo método de medición que incluye la detección de la fluorescencia de emisión. La segunda medición incluye detectar la emisión de un segundo fluoróforo incluido en un segundo sistema indicador que incluye un segundo receptor para la unión a la glucosa y el segundo fluoróforo. Este segundo sistema indicador está incluido en la región de detección del sensor de glucosa que incluye el primer sistema indicador.

En algunos casos, un sensor de glucosa proporcionado en el presente documento puede incluir un primer sistema indicador que incluye un primer receptor para unirse a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor, en el que dicho primer receptor tiene una constante de asociación  $K_{G1}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M1}$  con el interferente. Este sensor de glucosa puede incluir un segundo sistema indicador que incluye un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, en el que dicho segundo receptor tiene una constante de asociación  $K_{G2}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M2}$  con el interferente, y en el que  $K_{G2}/K_{M2}$  es diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ .

Los métodos para medir la constante de asociación para un receptor particular con una determinada sustancia hospedadora (por ejemplo, glucosa o el interferente, por ejemplo, manitol) son bien conocidos en la técnica. Uno de dichos medios consiste en calibrar los cambios en el comportamiento de la fluorescencia (por ejemplo, la intensidad) de un fluoróforo asociado con el receptor, a medida que varía la concentración de la sustancia hospedadora en una muestra de control que no contiene otras sustancias hospedadoras.

Un método proporcionado en el presente documento en el que se usa este sensor de glucosa puede llevarse a cabo proporcionando luz incidente a la región de detección del sensor y obteniéndose: (a) una primera medición de la cantidad de glucosa mediante un primer método de medición que incluye detectar la emisión de dicho primer fluoróforo; y (b) una segunda medición de la cantidad de glucosa mediante un segundo método de medición que incluye detectar la emisión de dicho segundo fluoróforo. La luz incidente proporcionada a la región de detección puede tener un perfil de longitud de onda adecuado para generar la emisión de fluorescencia tanto del primer fluoróforo como del segundo fluoróforo, es decir, la emisión de fluorescencia de los fluoróforos se produce al mismo tiempo y puede detectarse en un solo experimento. En algunos casos, se proporciona luz incidente de un primer perfil de longitud de onda para generar la emisión de fluorescencia del primer fluoróforo y se proporciona luz incidente de un segundo perfil de longitud de onda para generar la emisión de fluorescencia del segundo fluoróforo con un retraso temporal entre cada perfil de longitud de onda, por ejemplo, con un retraso de hasta diez segundos, por ejemplo, un retraso de hasta cinco segundos.

El segundo receptor y el segundo fluoróforo se seleccionan de modo que  $K_{G2}/K_{M2}$  sea diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ . El segundo receptor puede seleccionarse, por ejemplo, entre los receptores descritos en el presente documento como adecuados para el primer receptor (por ejemplo, aquellos compuestos de fórmulas (I) y/o (II) descritos en el presente documento). De forma similar, el segundo fluoróforo se puede seleccionar, por ejemplo, entre los fluoróforos descritos en el presente documento como adecuados para el primer fluoróforo. El segundo sistema indicador (es decir, el sistema de segundo fluoróforo/segundo receptor) es diferente del primer sistema indicador (es decir, el sistema de primer fluoróforo/primer receptor). En algunos casos, el segundo fluoróforo es diferente del primer fluoróforo y el segundo receptor es diferente

del primer receptor. Por lo general, el segundo receptor es diferente del primer receptor. Normalmente, tanto el primer receptor como el segundo receptor tienen una constante de asociación distinta de cero con la glucosa (es decir, tanto el primer receptor como el segundo receptor son capaces de unirse a la glucosa y, por lo tanto, son sensibles a los cambios en la concentración de glucosa de la muestra).

5 En algunos casos, el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo se seleccionan de modo que sus respectivas longitudes de onda de emisión de fluorescencia máxima difieran en al menos 5 nm, preferentemente, al menos 10 nm, más preferentemente, al menos 20 nm (cuando se asocian con sus respectivos receptores, y dichos receptores se unen a la glucosa y/o al interferente). Una separación de las longitudes de onda de emisión de fluorescencia máxima puede simplificar el análisis de un espectro de emisión de fluorescencia que contenga la emisión de la fluorescencia tanto del primer fluoróforo como del segundo fluoróforo.

10 En algunos casos, cuando las etapas para detectar la emisión del primer fluoróforo y del segundo fluoróforo, respectivamente, incluyen la detección de la vida útil de emisión del primer fluoróforo y del segundo fluoróforo, respectivamente, el primer y segundo fluoróforo se pueden seleccionar de modo que tengan una vida útil de fluorescencia sustancialmente diferente (por ejemplo, que difieran en al menos 0,5 ns o 1 ns o 2 ns).

15 El segundo receptor y el primer receptor pueden tener diferentes capacidades relativas para unirse a la glucosa y al interferente. En algunos casos, esta diferencia en las capacidades relativas para unirse a la glucosa y al interferente puede ser significativa. Por ejemplo, puede ser preferible que el cociente  $[K_{G2}/K_{M2}]/[K_{G1}/K_{M1}]$  sea superior a 2 o inferior a 0,5 (se aprecia que estos valores dan lugar a la misma diferencia eficaz, dependiendo de si es el primer o el segundo receptor el que tiene la sensibilidad hacia el interferente relativa más alta). Puede ser más preferible que el cociente  $[K_{G2}/K_{M2}]/[K_{G1}/K_{M1}]$  sea superior a 10 o inferior a 0,1, e incluso más preferible que el cociente  $[K_{G2}/K_{M2}]/[K_{G1}/K_{M1}]$  sea superior a 50 o inferior a 0,02. A medida que aumenta la diferencia en la capacidad relativa de los dos receptores para unirse a la glucosa y al interferente, la corrección de la presencia del interferente puede ser más precisa, incluso para concentraciones inferiores de interferente.

20 En algunos casos, los dos receptores que se unen a la glucosa y al interferente pueden tener propiedades químicas y/o estereoquímicas sustancialmente diferentes. Por ejemplo, tanto un primer receptor como un segundo receptor pueden ser receptores de ácido borónico, pero el primer receptor puede tener dos grupos de ácido borónico (por ejemplo, es un receptor de fórmula (I) o fórmula (II) como se definen en el presente documento), mientras que el segundo receptor puede tener solo un grupo de ácido borónico (por ejemplo, es un receptor de fórmula (III) como se define en el presente documento). Un ácido diborónico, tal como los de las fórmulas (I) o (II) anteriores, puede unirse tanto a la glucosa como a un interferente de manitol, mientras que un ácido monoborónico, tal como el de la fórmula (III), puede unirse más fuertemente a un interferente de manitol que a la glucosa.

25 El segundo receptor y el segundo fluoróforo se pueden unir entre sí. Están unidos a una matriz polimérica, tal como un hidrogel, o a un dendrímero. Los ejemplos de hidrogeles y dendrímeros adecuados son los descritos en el documento WO 2011/101624. Las partículas de matriz polimérica portan simultáneamente el primer receptor y el primer fluoróforo junto con el segundo receptor y el segundo fluoróforo.

Como alternativa, el segundo receptor y el segundo fluoróforo pueden no estar unidos directamente entre sí, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente con referencia al primer receptor y al primer fluoróforo.

45 *Comparación de las mediciones y, por lo tanto, determinación de si hay algún interferente presente en la muestra*

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir la comparación de la primera medición (la emisión del primer fluoróforo) y la segunda medición (la emisión del segundo fluoróforo) y, por lo tanto, determinar si hay cualquier interferente presente en la muestra. Preferentemente, cuando se determina que el interferente está presente en la muestra, el método incluye además (a) corregir la presencia de cualquier interferente en la muestra; (b) obtener una medición auxiliar de la concentración de la glucosa en un momento posterior cuando el interferente ya no esté (sustancialmente) presente en la muestra (por ejemplo, cuando se haya metabolizado *in vivo*). Por lo tanto, la etapa de corregir la presencia de cualquier interferente en la muestra u obtener una medición auxiliar de la concentración de glucosa puede entenderse como "obtener una medición de la cantidad de glucosa de la muestra, teniendo dicha medición una contribución sustancialmente nula o reducida del interferente", es decir, "cuantificar la cantidad de glucosa en la muestra".

Si la etapa de "comparar la primera medición y la segunda medición" lleva a la conclusión de que no hay (sustancialmente) interferente en la muestra, entonces se puede usar una o ambas mediciones para determinar la concentración de glucosa sin ninguna etapa de corrección o de medición auxiliar adicional.

La expresión "corregir la presencia de cualquier interferente en la muestra" adopta un significado amplio e incluye procedimientos tales como la eliminación matemática de la contribución realizada por el interferente a la primera (o segunda) medición.

65 En el contexto de un método proporcionado en el presente documento que implica dos fluoróforos, el experto apreciaría

fácilmente que, debido a que estos dos fluoróforos tienen diferentes sensibilidades hacia el interferente, se puede usar la comparación de su comportamiento de emisión en una sola muestra (que contiene concentraciones de glucosa y de interferente específicas) para eliminar (mediante análisis matemático) la contribución del interferente de cualquiera de las mediciones y, de ese modo, obtener un valor correcto para la concentración de glucosa en la muestra. Se apreciará que esta capacidad implícita para eliminar la contribución del interferente es la capacidad para calcular las concentraciones tanto de glucosa como de interferente en la muestra.

En el siguiente apartado de ejemplos, se presentan algunas ecuaciones matemáticas ilustrativas, pero no limitantes, que parametrizan el comportamiento de asociación de una solución mixta de glucosa e interferente en presencia de uno o dos receptores. Cabe señalar que, en general, estas ecuaciones son aplicables a los métodos proporcionados en el presente documento, y no se limitan de ninguna manera a los métodos y sistemas descritos específicamente (por ejemplo, determinados hidrogeles o especies interferentes) que se usan en estos ejemplos.

La etapa de "comparar la primera medición y la segunda medición, y determinar de ese modo si algún interferente está presente en la muestra" puede incluir evaluar inicialmente si la segunda medición es indicativa de la presencia de un interferente en la muestra. En caso negativo, se apreciará que no se requieren específicamente etapas adicionales para tener en cuenta la interferencia (no habiendo interferente en la muestra). Sin embargo, si la segunda medición indica la presencia de interferente, entonces, esta presencia de interferente en la muestra puede explicarse mediante la realización de una o varias mediciones adicionales en el/los punto/s de tiempo posterior/es, es decir, una vez que el interferente haya sido suficientemente metabolizado *in vivo*, como se describe en otra parte de el presente documento.

Los métodos y sistemas proporcionados en el presente documento pueden incluir un primer sistema indicador que está calibrado previamente para la sensibilidad de detección tanto de la glucosa como del interferente. El segundo sistema indicador también puede calibrarse previamente.

#### *El sensor de glucosa*

El presente documento también proporciona un sensor de glucosa. El sensor de glucosa puede adaptarse para llevar a cabo los métodos proporcionados en el presente documento. En algunos casos, los sensores de glucosa proporcionados en el presente documento pueden adaptarse para llevar a cabo un método en el que el segundo método de medición implique detectar la emisión de fluorescencia de un segundo fluoróforo, como se describe en el presente documento.

Los elementos constituyentes de los sensores de glucosa proporcionados en el presente documento pueden corresponder a los descritos en la descripción de los métodos proporcionados anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, la región de detección, el primer sistema indicador, el primer receptor, el primer fluoróforo, el segundo sistema indicador, el segundo receptor, el segundo fluoróforo y la guía de onda óptica, y sus aspectos preferidos, son todos como se describen en el presente documento con referencia a los métodos proporcionados en el presente documento según lo descrito anteriormente. Dado que tanto el primer sistema indicador como el segundo sistema indicador están comprendidos dentro de la región de detección, se configuran de manera que cuando el sensor de glucosa entra en contacto con la muestra, tanto el primer sistema indicador como el segundo sistema indicador entran en contacto con la muestra. Por lo tanto, normalmente la región de detección contiene una celda o cámara en la que están contenidos tanto el primer como el segundo sistema indicador.

El sensor de glucosa puede ser un sensor de glucosa en equilibrio.

Para disipar cualquier duda, cabe señalar que, a lo largo de la presente memoria descriptiva, las referencias a un receptor (por ejemplo, el primer o el segundo receptor) "para unirse a la glucosa" significa que el receptor es capaz de unirse a la glucosa (es decir, tiene una constante de asociación distinta de cero con la glucosa). Por consiguiente, el sistema indicador que comprende dicho receptor, junto con un fluoróforo correspondiente, es sensible a la concentración de glucosa de la muestra.

#### *El interferente*

Como se usa en el presente documento, un "interferente" es una sustancia que es capaz de interferir en la unión de la glucosa al primer receptor comprendido en la región de detección del sensor de glucosa. Por lo general, la sustancia es capaz de interferir en la unión a la glucosa al ser capaz de unirse al primer receptor (es decir, y competir, así, con la glucosa por los sitios receptores en el sensor de glucosa). Sin embargo, pueden abordarse otros medios de interferencia mediante los métodos y sensores descritos en el presente documento, por ejemplo, cuando la sustancia es capaz de interactuar con (por ejemplo, unirse a) la glucosa de manera que modifique la capacidad de la glucosa para unirse al primer receptor.

Por lo general, un interferente que es "capaz de interferir en la unión de la glucosa al primer receptor" es un interferente que tiene una constante de asociación distinta de cero con el primer receptor (y, por lo tanto, puede competir con la glucosa por el receptor). Para el ejemplo, la constante de asociación del interferente con el primer receptor puede ser

al menos el 1 %, o al menos el 10 %, o al menos el 25 % de la constante de asociación de la glucosa con el primer receptor.

5 Por lo general, el interferente es una sustancia distinta de protones o iones hidroxilo. Por lo general, el interferente es una sustancia que es capaz de interferir en la unión de la glucosa al primer receptor comprendido en la región de detección del sensor de glucosa por un medio distinto de la simple modificación del pH de la muestra.

10 La muestra puede comprender un interferente o una pluralidad de diferentes interferentes (es decir, químicamente diferentes). Cuando está presente una pluralidad de diferentes interferentes, los métodos proporcionados en el presente documento todavía pueden permitir la cuantificación de la cantidad de glucosa en la muestra.

El interferente puede ser un alcohol de azúcar o un sacárido distinto de la glucosa. Los alcoholes de azúcar y los sacáridos de particular interés incluyen aquellos que pueden estar presentes en cantidades significativas en la sangre.

15 El interferente puede comprender un grupo cis-diol. Por ejemplo, el interferente puede ser un poliol (por ejemplo, un alcohol de azúcar o un sacárido) que comprenda un grupo cis-diol. Es particularmente probable que las sustancias que comprenden un grupo cis-diol sean capaces de unirse a receptores de ácido borónico tales como el primer receptor comprendido en los sensores de glucosa descritos en el presente documento. Para disipar cualquier duda, el término "comprende/n un grupo cis-diol" no significa que no puedan estar presentes grupos hidroxilo en el interferente distintos  
20 de los comprendidos en el grupo cis-diol. Por lo tanto, por ejemplo, el interferente puede ser un poliol (por ejemplo, un alcohol de azúcar o un sacárido) que contenga al menos un grupo cis-diol y, por lo tanto, puede contener dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso más de seis grupos hidroxilo en total.

25 El interferente puede ser un alcohol de azúcar o un sacárido seleccionado del grupo que consiste en manitol, sorbitol, galactitol, inositol, fructosa, galactosa y arabinosa. El interferente puede ser manitol.

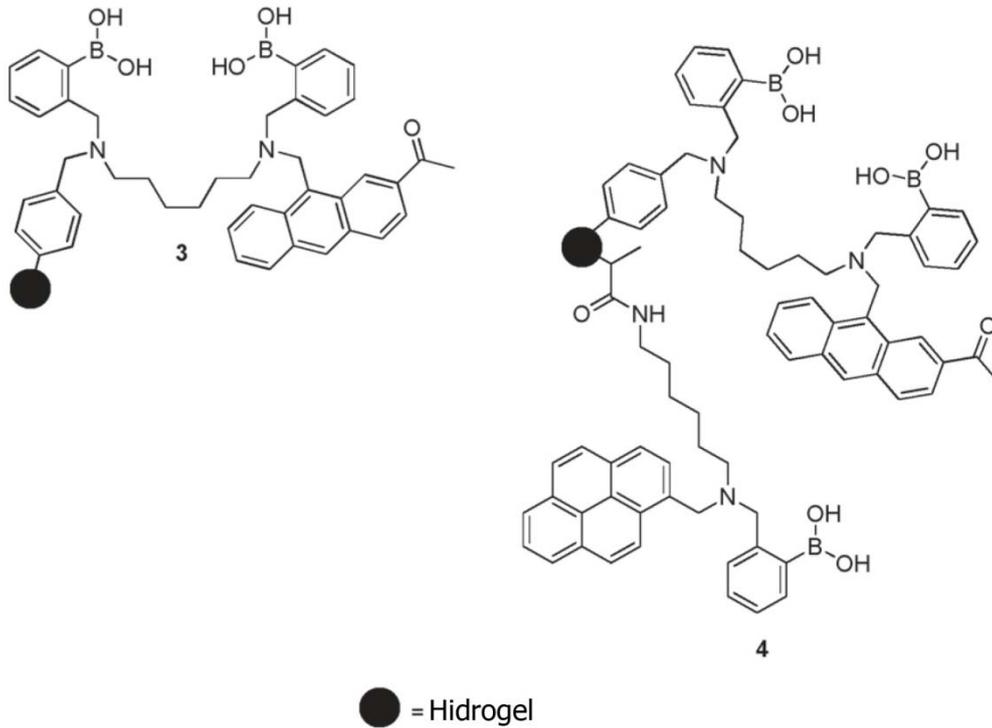
30 El interferente también puede ser una amina, es decir, un compuesto que contenga un grupo funcional amina. El grupo funcional amina puede ser un grupo amina primaria, secundaria o terciaria. Las aminas de particular interés incluyen aquellas que pueden estar presentes en cantidades significativas en la sangre. La amina puede seleccionarse, por ejemplo, entre glutamina y catecolaminas (por ejemplo, epinefrina, norepinefrina y dopamina).

35 El interferente puede tener un peso molecular inferior a 1.000 Da, tal como inferior a 500 Da, o inferior a 300 Da o inferior a 200 Da. Los presentes sistemas y métodos pueden ser particularmente útiles en el contexto de estos interferentes de bajo peso molecular, ya que puede ser difícil o imposible excluir dichos interferentes de la región de detección del sensor de glucosa mediante el uso de una capa de barrera del tipo descrito en otra parte del presente documento.

40 Los métodos y sensores proporcionados en el presente documento se describen a continuación con referencia a determinados ejemplos. La invención no pretende limitarse a estos ejemplos particulares.

### Ejemplos

Se usaron los siguientes hidrogeles en los ejemplos de trabajo:

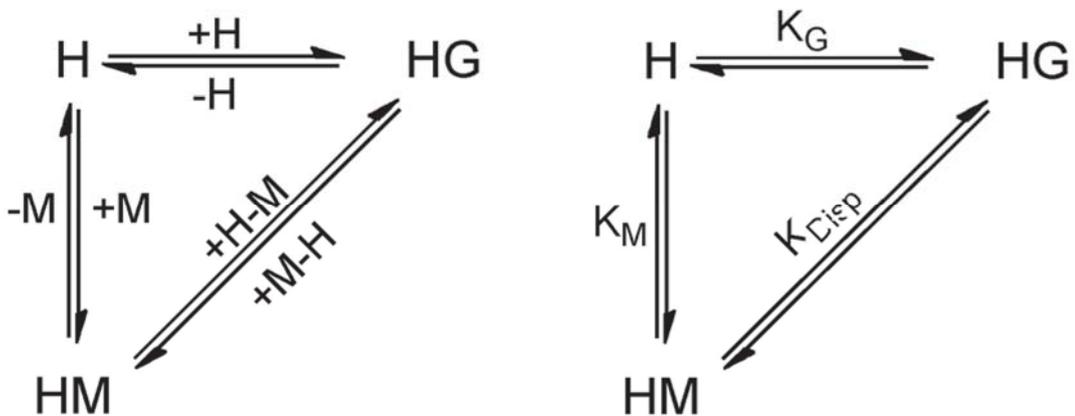


**Ejemplo 1**

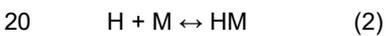
5 Este Ejemplo muestra que, cuando se obtiene una segunda medición (por ejemplo, una medición electroquímica) que determina la concentración de un interferente de manitol, la primera medición puede ser corregida basándose en la concentración de manitol conocida para obtener un valor corregido de la concentración de glucosa.

**Ecuaciones generales para la unión competitiva de dos analitos usando un receptor**

10 Los siguientes equilibrios están presentes cuando un hospedador, "H", "H", puede unirse a los analitos D-glucosa, "G", y D-manitol, "M".



15 Están presentes tres equilibrios:



lo que conduce a tres constantes de asociación:

$$K_G = \frac{[HG]}{[H][G]} \quad (4)$$

$$K_M = \frac{[HM]}{[H][M]} \quad (5)$$

$$K_{Disp} = \frac{[HM][G]}{[HG][M]} = \frac{K_M}{K_G} \quad (6)$$

A partir del balance de masas, también se sabe que

$$[G] = [G]_i - [HG] \quad (7)$$

$$[M] = [M]_i - [HM] \quad (8)$$

$$[H] = [H]_i - [HG] - [HM] \quad (9),$$

siendo  $[X]$  = concentración de equilibrio y  $[X]_i$  = concentración inicial.

Si se sustituyen (7) y (9) en (4), se obtiene

$$K_G = \frac{[HG]}{([G]_i - [HG])([H]_i - [HG] - [HM])} \quad (10)$$

La reorganización de (10) conduce a

$$[HG]^2 + \left[ [HM] - [G]_i - [H]_i - \frac{1}{K_G} \right] [HG] + [G]_i [H]_i - [HM] = 0 \quad (11)$$

Suponiendo que  $K_G[H]_i \ll 1$ , el término al cuadrado es despreciable y, por lo tanto,

$$[HG] = \frac{[G]_i [H]_i - [HM]}{[G]_i + [H]_i - [HM] + \frac{1}{K_G}} \quad (12)$$

También se puede suponer que  $[HM]$  y  $[H] \ll [G]_i$ , y  $1/K_G$ . Por lo tanto, (12) se simplifica a

$$[HG] = \frac{[G]_i [H]_i - [HM]}{[G]_i + \frac{1}{K_G}} \quad (13)$$

que se puede volver a escribir como

Si se sustituyen (8) y (9) en (5) y se llevan a cabo algunas manipulaciones, se puede obtener

$$\frac{[HM]}{[H]_i} = \frac{\left[ 1 - \frac{[HG]}{[H]_i} \right] K_M [M]_i}{1 + K_M [M]_i} \quad (15)$$

(14) y (15) se pueden resolver para  $[HG]$  y  $[HM]$  escribiéndose en forma de matriz

$$\begin{bmatrix} 1 + K_G [G]_i & K_G [G]_i \\ K_M [M]_i & 1 + K_M [M]_i \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [HG] \\ [H]_i \\ [HM] \\ [H]_i \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_G [G]_i \\ K_M [M]_i \end{bmatrix} \quad (16)$$

e invirtiendo la matriz:

$$\begin{bmatrix} [HG] \\ [H]_i \\ [HM] \\ [H]_i \end{bmatrix} = \frac{1}{\Delta} \begin{bmatrix} 1 + K_M [M]_i & -K_G [G]_i \\ -K_M [M]_i & 1 + K_G [G]_i \end{bmatrix} \begin{bmatrix} K_G [G]_i \\ K_M [M]_i \end{bmatrix} \quad (17),$$

siendo el determinante

$$\Delta = 1 + K_G[G]_i + K_M[M]_i \quad (18)$$

Por lo tanto,

$$\frac{[HG]}{[H]_i} = \frac{K_G[G]_i}{1 + K_G[G]_i + K_M[M]_i} \quad (19)$$

$$\frac{[HM]}{[H]_i} = \frac{K_M[M]_i}{1 + K_G[G]_i + K_M[M]_i} \quad (20)$$

Para las mediciones de la intensidad

$$i = I - I_0 \quad (21)$$

$$\Delta I = I_i - I_0 \quad (22)$$

$$i = \frac{[HG]}{[H]_i} \Delta I_G + \frac{[HM]}{[H]_i} \Delta I_M \quad (23)$$

Si se sustituyen (19) y (20) en (23), se obtiene

$$i = \left[ \frac{K_G[G]_i}{1 + K_G[G]_i + K_M[M]_i} \right] \Delta I_G + \left[ \frac{K_M[M]_i}{1 + K_G[G]_i + K_M[M]_i} \right] \Delta I_M \quad (24)$$

Si se sustituyen (21) y (22) en (24) y la reorganización conduce a

$$I = \frac{I_0 + I_{\infty G} K_G [G]_i + I_{\infty M} K_M [M]_i}{1 + K_G [G]_i + K_M [M]_i} \quad (25)$$

Suponiendo que  $I_{\infty G} = I_{\infty M}$ , se produce una mayor simplificación de (25) a (26), lo que permite el cálculo de la intensidad de la emisión de un fluoróforo cuando hay dos analitos presentes (en este caso, glucosa y manitol). La reorganización de (26) conduce a (27) y a (28), lo que permite determinar la concentración de un primer analito si se conocen la concentración del segundo analito y la respuesta fluorescente de un sensor:

$$I = \frac{I_0 + I_{\infty} [K_G [G]_i + K_M [M]_i]}{1 + K_G [G]_i + K_M [M]_i} \quad (26)$$

$$[M]_i = \frac{I - I_0 + (I - I_{\infty}) K_G [G]_i}{K_M (I_{\infty} - I)} \quad (28)$$

$$[G]_i = \frac{I - I_0 + (I - I_{\infty}) K_M [M]_i}{K_G (I_{\infty} - I)} \quad (27)$$

### Calibración del sensor que contiene hidrogel 3 frente a D-manitol y D-glucosa

Se usó hidrogel 3 para demostrar que un sensor puede calibrarse frente a D-manitol y D-glucosa. Los resultados de estas calibraciones se muestran a continuación, en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Constantes de calibración para el hidrogel 3 frente a D-glucosa y D-manitol.

[Glc] / mM	I	[Man] / mM	I
0,00	0,9776	0,00	0,9601
17,48	1,9571	11,64	1,6330

(continuación)

[Glc] / mM	I		[Man] / mM	I
34,23	2,3871		21,85	2,0025
$K_G =$	0,0346		$K_M =$	0,0274
$I_0 =$	0,9776		$I_0 =$	0,9601
$I_\infty =$	3,5782		$I_\infty =$	3,7463
$Mod_{5mM}\%$	28,2		$Mod_{5mM}\%$	25,9

Se puede observar a partir de  $K_G$  y  $K_M$  que el receptor de ácido diborónico del hidrogel 3 es más selectivo hacia la D-glucosa que hacia el D-manitol.  $I_0$  es igual para ambos analitos, y las diferencias observadas en la medición de  $I_\infty$  probablemente se deban a errores de calibración.

5

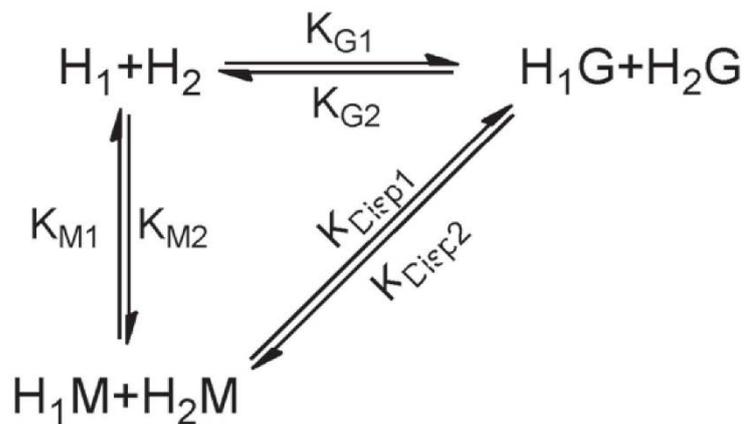
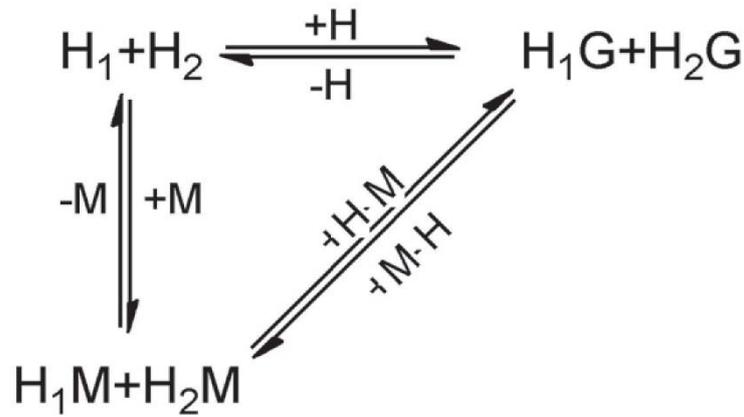
**Ejemplo 2**

Este ejemplo muestra que se puede usar un sensor de glucosa que tiene incorporados dos receptores que tienen diferentes constantes de asociación relativas para la glucosa y el manitol para corregir la presencia de interferente de manitol, y por lo tanto, obtener mediciones precisas de la concentración de glucosa, en una muestra que contenga tanto glucosa como manitol.

10

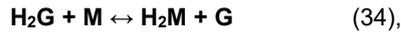
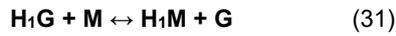
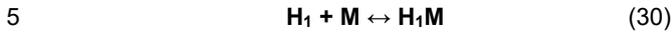
**Ecuaciones generales para la unión competitiva de dos analitos usando dos receptores**

15 Los siguientes equilibrios están presentes cuando dos hospedadores, "H<sub>1</sub>" y "H<sub>2</sub>", pueden unirse a los analitos D-glucosa, "G", y D-manitol, "M".



20

Los equilibrios presentes son:



15 lo que conduce a seis constantes de asociación:

$$K_{G1} = \frac{[H_1G]}{[H_1][G]} \quad (35)$$

$$K_{M1} = \frac{[H_1M]}{[H_1][M]} \quad (36)$$

$$K_{Disp} = \frac{[H_1M][G]}{[H_1G][M]} = \frac{K_{M1}}{K_{G1}} \quad (37)$$

20  $K_{G2} = \frac{[H_2G]}{[H_2][G]} \quad (38)$

$$K_{M2} = \frac{[H_2M]}{[H_2][M]} \quad (39)$$

$$K_{Disp} = \frac{[H_2M][G]}{[H_2G][M]} = \frac{K_{M2}}{K_{G2}} \quad (40)$$

A partir del balance de masas, también se sabe que:

25  $[G] = [G]_i - [H_1G] - [H_2G] \quad (41)$

$$[M] = [M]_i - [H_1M] - [H_2M] \quad (42)$$

30  $[H]_1 = [H]_{1i} - [H_1G] - [H_1M] \quad (43)$

$$[H]_2 = [H]_{2i} - [H_2G] - [H_2M] \quad (44)$$

siendo  $[X]$  = concentración de equilibrio y  $[X]_i$  = concentración inicial.

35 Si se sustituyen (41) y (43) en (35), se obtiene

$$K_{G1} = \frac{[H_1G]}{[[G]_i - [H_1G] - [H_2G]][[H]_{1i} - [H_1G] - [H_1M]]} \quad (45)$$

40

La reorganización de (45) conduce a

$$[H_1G]^2 + \left[ [H_1M] + [H_2G] - [G]_i - [H_1]_i - \frac{1}{K_{G1}} \right] [H_1G] + \left[ [H_1]_i - [H_1M] \right] [G]_i - [H_2G] = 0 \quad (46)$$

5 Suponiendo que  $K_G[H]_i \ll 1$  significa que el término al cuadrado es despreciable y, por lo tanto, que

$$[H_1G] = \frac{[H_1]_i - [H_1M] \quad [G]_i - [H_2G]}{[G]_i + [H_1]_i - [H_1M] - [H_2G] + \frac{1}{K_{G1}}} \quad (47)$$

10 Dado que se supone que las concentraciones de los hospedadores son extremadamente pequeñas, también se puede aproximar esto eliminando los términos  $[H_2G]$  y  $[H_1M]$  en comparación con  $[G]_i$  y  $1/K_{G1}$

$$[H_1G] = \frac{[G]_i [H_1]_i - [H_1G]}{[G]_i + \frac{1}{K_{G1}}} \quad (48),$$

que se puede volver a escribir como

15

$$\frac{[H_1G]}{[H_1]_i} = \frac{\left[ 1 - \frac{[H_1M]}{[H_1]_i} \right] K_{G1} [G]_i}{1 + K_{G1} [G]_i} \quad (49)$$

Si se sustituyen (42) y (43) en (36) y se llevan a cabo algunas manipulaciones, se pueden obtener

$$\frac{[H_1M]}{[H_1]_i} = \frac{\left[ 1 - \frac{[H_1G]}{[H_1]_i} \right] K_{M1} [M]_i}{1 + K_{M1} [M]_i} \quad (50)$$

20

(49) y (50) se pueden resolver para  $[H_1G]$  y  $[H_1M]$  escribiéndose en forma de matriz

$$\begin{bmatrix} 1 + K_{G1} [G]_i & K_{G1} [G]_i \\ K_{M1} [M]_i & 1 + K_{M1} [M]_i \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [H_1G] \\ [H_1M] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{G1} [G]_i \\ K_{M1} [M]_i \end{bmatrix} \quad (51),$$

25 e invirtiendo la matriz

$$\begin{bmatrix} [H_1G] \\ [H_1]_i \\ [H_1M] \\ [H_1]_i \end{bmatrix} = \frac{1}{\Delta} \begin{bmatrix} 1 + K_{M1}[M]_i & -K_{G1}[G]_i \\ -K_{M1}[M]_i & 1 + K_{G1}[G]_i \end{bmatrix} \begin{bmatrix} K_{G1}[G]_i \\ K_{M1}[M]_i \end{bmatrix} \quad (52),$$

siendo el determinante

$$\Delta = 1 + K_{G1}[G]_i + K_{M1}[M]_i \quad (53)$$

Por lo tanto,

$$\frac{[H_1G]}{[H_1]_i} = \frac{K_{G1}[G]_i}{1 + K_{G1}[G]_i + K_{M1}[M]_i} \quad (54)$$

$$\frac{[H_1M]}{[H_1]_i} = \frac{K_{M1}[M]_i}{1 + K_{G1}[G]_i + K_{M1}[M]_i} \quad (55)$$

para el segundo hospedador, y usando el mismo método y las mismas aproximaciones, se obtiene

$$\frac{[H_2G]}{[H_2]_i} = \frac{K_{G2}[G]_i}{1 + K_{G2}[G]_i + K_{M2}[M]_i} \quad (56)$$

$$\frac{[H_2M]}{[H_2]_i} = \frac{K_{M2}[M]_i}{1 + K_{G2}[G]_i + K_{M2}[M]_i} \quad (57)$$

Las intensidades de luz para los dos fluoróforos pueden estar dadas por

$$\dot{\epsilon}_1 = \frac{[H_1G]}{[H_1]_i} \Delta I_{G1} + \frac{[H_1M]}{[H_1]_i} \Delta I_{M1} \quad (58)$$

$$\dot{\epsilon}_2 = \frac{[H_2G]}{[H_2]_i} \Delta I_{G2} + \frac{[H_2M]}{[H_2]_i} \Delta I_{M2} \quad (59)$$

(54) y (55) se pueden sustituir luego en (58), dando

$$\dot{\epsilon}_1 = \frac{K_{G1}[G]_i \Delta I_{G1} + K_{M1}[M]_i \Delta I_{M1}}{1 + K_{G1}[G]_i + K_{M1}[M]_i} \quad (60)$$

La expansión y la reorganización dan

$$\dot{\epsilon}_1 = (\Delta I_{G1} - \dot{\epsilon}_1) K_{G1}[G]_i + (\Delta I_{M1} - \dot{\epsilon}_1) K_{M1}[M]_i \quad (61)$$

De forma similar, al sustituir (56) y (57) en (59)

$$i_2 = (\Delta I_{G2} - i_2)K_{G2}[G]_i + (\Delta I_{M2} - i_2)K_{M2}[M]_i \quad (62)$$

5 Escribir (61) y (62) en forma matricial e invertir proporciona

$$\begin{bmatrix} [G]_i \\ [M]_i \end{bmatrix} = \frac{1}{\Delta} \begin{bmatrix} (\Delta I_{M2} - i_2)K_{M2} & -(\Delta I_{M1} - i_1)K_{M1} \\ -(\Delta I_{G2} - i_2)K_{G2} & (\Delta I_{G1} - i_1)K_{G1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} i_1 \\ i_2 \end{bmatrix} \quad (63),$$

siendo el determinante

$$10 \quad \Delta = (\Delta I_{G1} - i_1)K_{G1}(\Delta I_{M2} - i_2)K_{M2} - (\Delta I_{G2} - i_2)K_{G2}(\Delta I_{M1} - i_1)K_{M1} \quad (64)$$

Por lo tanto,

$$[G]_i = \frac{(\Delta I_{M2} - i_2)K_{M2}i_1 - (\Delta I_{M1} - i_1)K_{M1}i_2}{(\Delta I_{G1} - i_1)K_{G1}(\Delta I_{M2} - i_2)K_{M2} - (\Delta I_{G2} - i_2)K_{G2}(\Delta I_{M1} - i_1)K_{M1}} \quad (65)$$

15

Sustituyendo (21) y (22) en (65) se obtiene

$$[G]_i = \frac{K_{M2}(I_{\infty M2} - I_2)(I_1 - I_{01}) - K_{M1}(I_{\infty M1} - I_1)(I_2 - I_{02})}{K_{G1}K_{M2}(I_{\infty G1} - I_1)(I_{\infty M2} - I_2) - K_{G2}K_{M1}(I_{\infty G2} - I_2)(I_{\infty M1} - I_1)} \quad (66),$$

20

y de manera similar

$$[M]_i = \frac{K_{G1}(I_{\infty G1} - I_1)(I_2 - I_{02}) - K_{G2}(I_{\infty G2} - I_2)(I_1 - I_{01})}{K_{G1}K_{M2}(I_{\infty G1} - I_1)(I_{\infty M2} - I_2) - K_{G2}K_{M1}(I_{\infty G2} - I_2)(I_{\infty M1} - I_1)} \quad (67).$$

### Resultados obtenidos en un sensor que contiene hidrogel 4 frente a D-manitol y D-glucosa

25

Se inmovilizaron dos sensores de ácido borónico separados dentro del hidrogel 4. Uno de estos fue un ácido diborónico que tenía constantes de asociación similares tanto para la D-glucosa como para el D-manitol. El segundo fue un ácido monoborónico que fue más selectivo hacia el D-manitol. La Figura 7 muestra los espectros fluorescentes del hidrogel 4 cuando se excitó a longitudes de onda seleccionadas con concentraciones crecientes de D-glucosa o D-manitol. Es posible calcular las constantes de asociación para cada uno de estos sensores de forma independiente, y estos resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.

30

**Tabla 2.** Constantes de asociación para el hidrogel 4 con la D-glucosa y el D-manitol cuando se excita a dos longitudes de onda diferentes.

	D-Glucosa		D-Manitol	
	$\lambda_{ex} = 350$ $\lambda_{em} = 380$	$\lambda_{ex} = 405$ $\lambda_{em} = 487$	$\lambda_{ex} = 350$ $\lambda_{em} = 380$	$\lambda_{ex} = 405$ $\lambda_{em} = 487$
$I_0$	1,000	1,000	1,000	1,000
$I_{\infty}$	3,915	2,725	4,077	4,699
$K / mM^{-1}$	0,005	0,020	0,063	0,009

35

La selectividad de los dos receptores de ácido borónico hacia la D-glucosa y el D-manitol son diferentes entre sí. Por lo tanto, los algoritmos (66) y (67) se pueden usar para determinar las concentraciones de ambos analitos en una solución que contenga glucosa y manitol y, por lo tanto, para corregir la presencia de interferente de manitol cuando se busca obtener una medición precisa de la concentración de glucosa.

40

## REIVINDICACIONES

1. Un sensor de glucosa para cuantificar la cantidad de glucosa de una muestra que puede comprender además un interferente, comprendiendo el sensor:
- 5 una región de detección que comprende:
- un primer sistema indicador que comprende un primer receptor para unirse a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor, en el que dicho primer receptor tiene una constante de asociación  $K_{G1}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M1}$  con dicho interferente, y
- 10 un segundo sistema indicador que comprende un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, en el que dicho segundo receptor tiene una constante de asociación  $K_{G2}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M2}$  con dicho interferente, y en el que  $K_{G2}/K_{M2}$  es diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ , y
- 15 una matriz polimérica;
- y
- una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección, en el que:
- 20 dicho primer receptor y dicho segundo receptor son receptores de ácido borónico, o comprenden uno o más grupos de fórmula  $H_3AsO_3$ ,  $H_2AsO_3^-$ ,  $H_6TeO_6$ ,  $H_5TeO_6^-$ ,  $Ge(OH)_6$  o  $GeO(OH)_3$ , o sus derivados; y el primer receptor y el primer fluoróforo y el segundo receptor y el segundo fluoróforo están unidos a la matriz polimérica de modo que la matriz polimérica porta simultáneamente el primer receptor y el primer fluoróforo junto con el segundo receptor y el segundo fluoróforo.
- 25 2. Un sensor de glucosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho primer fluoróforo y dicho segundo fluoróforo tienen longitudes de onda de emisión máxima que difieren en al menos 5 nm.
3. Un sensor de glucosa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que  $[K_{G2}/K_{M2}]/[K_{G1}/K_{M1}]$  es superior a 2 o inferior a 0,5.
- 30 4. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho primer receptor y dicho segundo receptor son receptores de ácido borónico, y preferentemente, en el que dicho primer receptor contiene dos grupos de ácido borónico y dicho segundo receptor contiene un grupo de ácido borónico.
- 35 5. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho interferente se selecciona entre: (a) un interferente que comprende un grupo cis-diol; y (b) una amina; y, preferentemente, en el que el interferente que comprende un grupo cis-diol se selecciona entre un alcohol de azúcar y un sacárido.
- 40 6. Un sensor de glucosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el interferente se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, galactitol, inositol, fructosa, galactosa, arabinosa, glutamina y catecolaminas, preferentemente, manitol.
- 45 7. Un método para cuantificar la cantidad de glucosa en una muestra que puede comprender además un interferente, comprendiendo el método:
- proporcionar luz incidente a la región de detección de un sensor de glucosa expuesto a la muestra, en el que el sensor de glucosa comprende una región de detección que comprende al menos un primer sistema indicador que comprende un primer receptor para la unión a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor, un
- 50 segundo sistema indicador que comprende un segundo receptor para la unión a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, y una matriz polimérica, en el que el primer receptor y el primer fluoróforo y el segundo receptor y el segundo fluoróforo están unidos a la matriz polimérica de modo que la matriz polimérica porta simultáneamente el primer receptor y el primer fluoróforo junto con el segundo receptor y el segundo fluoróforo, y una guía de onda óptica para dirigir la luz en la región de detección;
- 55 - obtener una primera medición de la cantidad de glucosa mediante un primer método de medición que comprende detectar la emisión de dicho primer fluoróforo;
- obtener una segunda medición de la cantidad de glucosa mediante un segundo método de medición que comprende detectar la emisión de dicho segundo fluoróforo, en el que el segundo método de medición difiere en su sensibilidad hacia la cantidad de dicho interferente en la muestra con respecto al primer método de medición; y
- 60 - comparar dicha primera medición y dicha segunda medición y, de ese modo, determinar si cualquier dicho interferente está presente en la muestra; en el que dicho interferente es una sustancia que es capaz de interferir en la unión de la glucosa a dicho primer receptor.
- 65 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho primer receptor tiene una constante de asociación  $K_{G1}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M1}$  con dicho interferente, y dicho segundo receptor tiene una constante de asociación  $K_{G2}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M2}$  con dicho interferente, y en el que

$K_{G2}/K_{M2}$  es diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ ; y en el que el método comprende además corregir la presencia de cualquier dicho interferente en la muestra.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:

- 5 (a) dicha primera medición y dicha segunda medición se obtienen en una única etapa de detección de la emisión; y/o  
 (b) dicho primer fluoróforo y dicho segundo fluoróforo tienen longitudes de onda de emisión máxima que difieren en al menos 5 nm.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que  $[K_{G2}/K_{M2}]/[K_{G1}/K_{M1}]$  es superior a 2 o inferior a 0,5.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho primer receptor y dicho segundo receptor son receptores de ácido borónico, y preferentemente, en el que dicho primer receptor contiene dos grupos de ácido borónico y dicho segundo receptor contiene un grupo de ácido borónico.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el interferente se selecciona entre: (a) un interferente que comprende un grupo cis-diol, preferentemente, un alcohol de azúcar o un sacárido; y (b) una amina; preferentemente, en el que el interferente se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, galactitol, inositol, fructosa, galactosa, arabinosa, glutamina y catecolaminas; más preferentemente, en el que el interferente es manitol.

13. Un sensor de glucosa para cuantificar la cantidad de glucosa de una muestra que puede comprender además un interferente, comprendiendo el sensor:

una región de detección que comprende:

un primer sistema indicador que comprende un primer receptor que comprende dos grupos de ácido borónico para unirse a la glucosa y un primer fluoróforo asociado con el primer receptor,  
 un segundo sistema indicador que comprende un segundo receptor que comprende un grupo de ácido borónico para unirse a la glucosa y un segundo fluoróforo asociado con el segundo receptor, y una matriz polimérica; y

una guía de onda óptica para dirigir la luz sobre la región de detección,

en el que el primer receptor y el primer fluoróforo y el segundo receptor y el segundo fluoróforo están unidos a la matriz polimérica de modo que la matriz polimérica porta simultáneamente el primer receptor y el primer fluoróforo junto con el segundo receptor y el segundo fluoróforo.

14. Un sensor de glucosa de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el interferente es un sacárido distinto de la glucosa y:

- (a) dicho sacárido comprende un grupo cis-diol; o  
 (b) dicho sacárido se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, galactitol, inositol, fructosa, galactosa y arabinosa; o  
 (c) dicho sacárido es manitol; o  
 (d) el primer receptor tiene una constante de asociación  $K_{G1}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M1}$  con dicho interferente y el segundo receptor tiene una constante de asociación  $K_{G2}$  con la glucosa y una constante de asociación  $K_{M2}$  con dicho interferente, y en el que  $K_{G2}/K_{M2}$  es diferente de  $K_{G1}/K_{M1}$ .

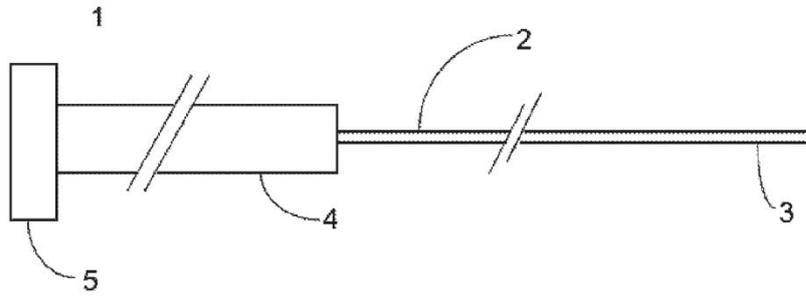


Figura 1

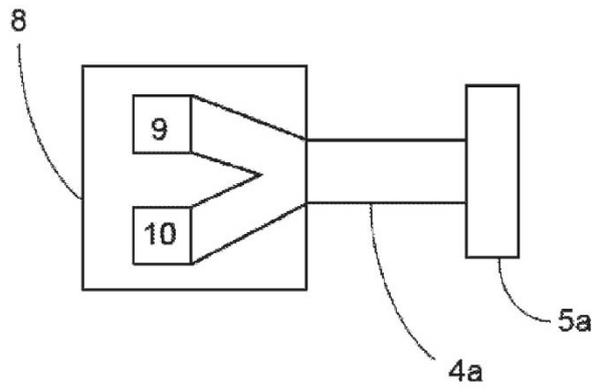


Figura 1a

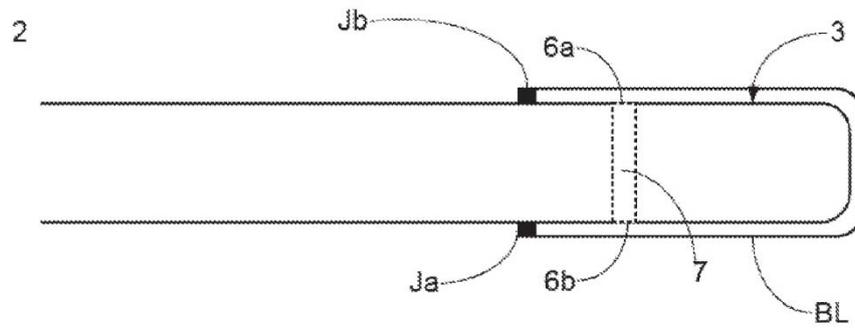


Figura 2

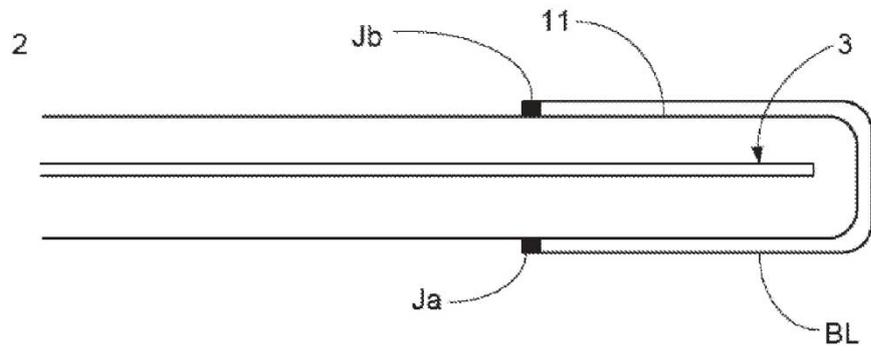


Figura 3

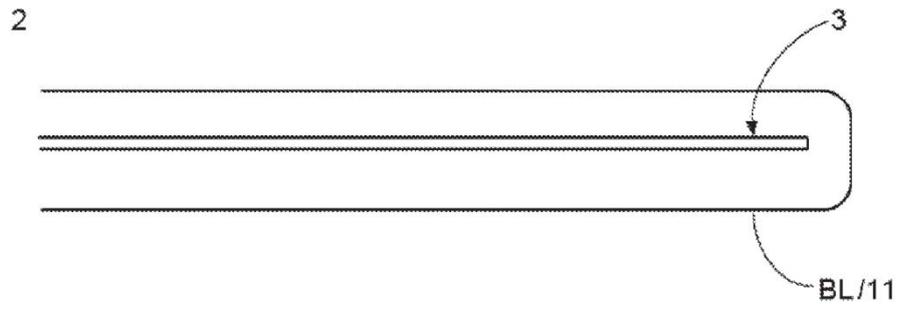


Figura 3a

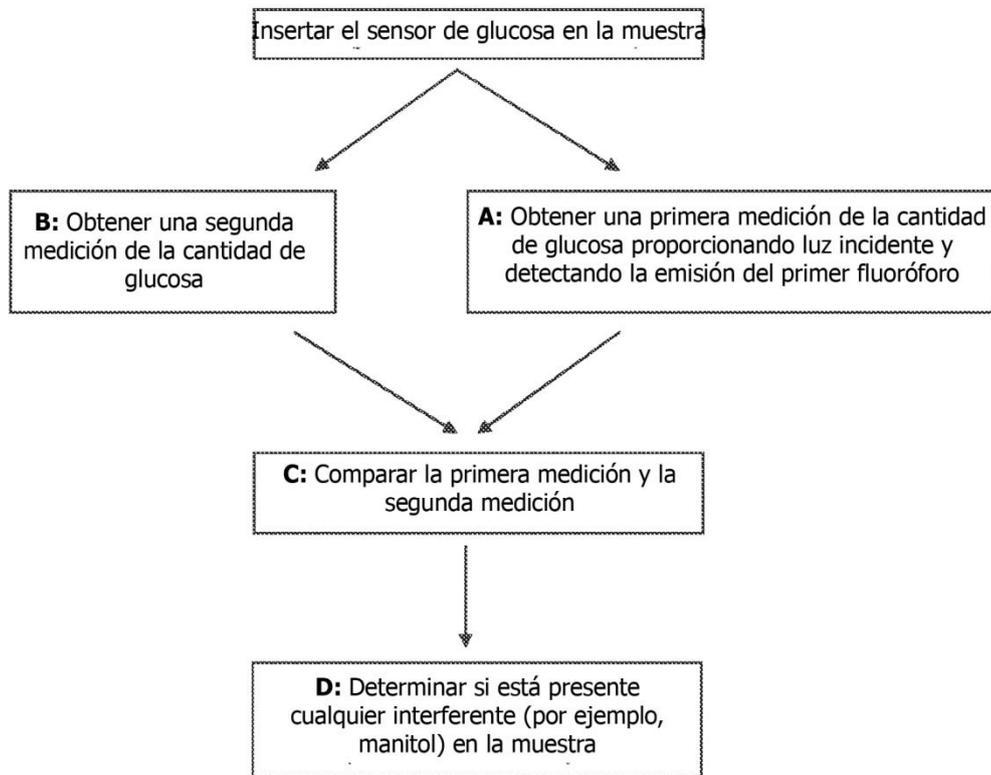


Figura 4

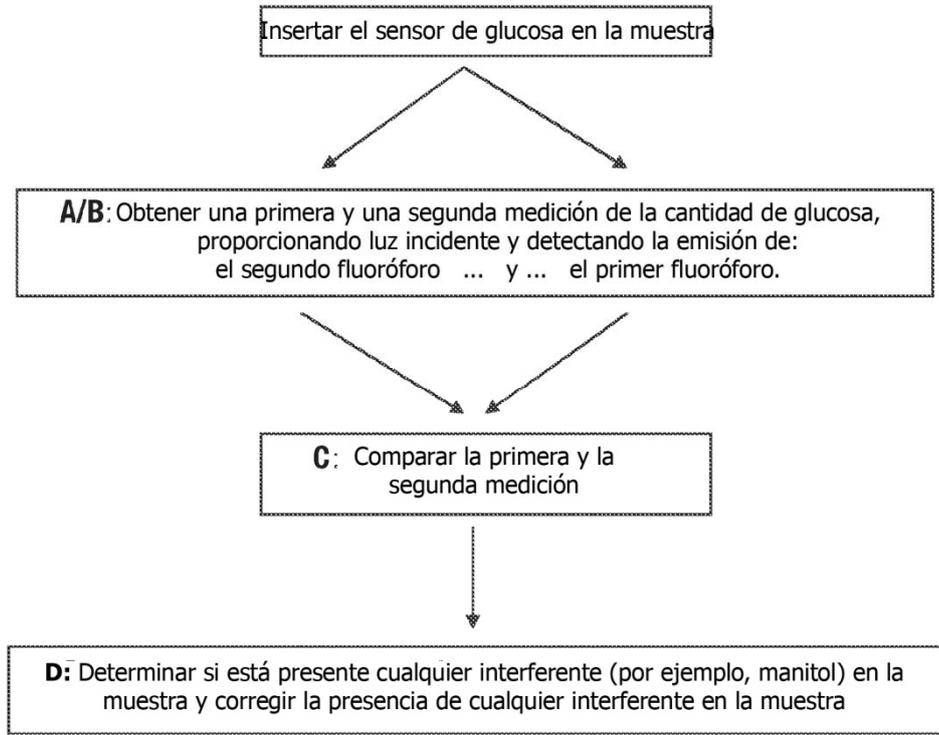


Figura 5

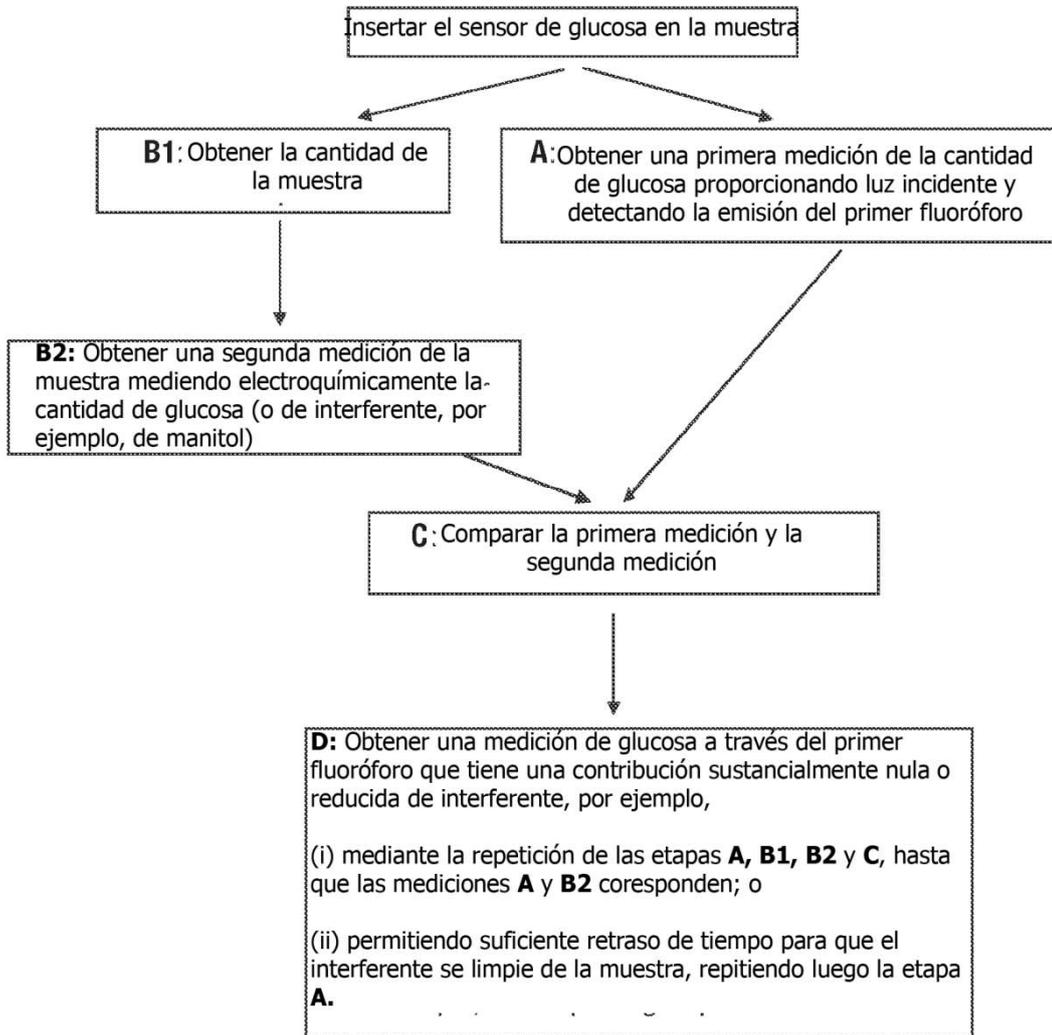


Figura 6

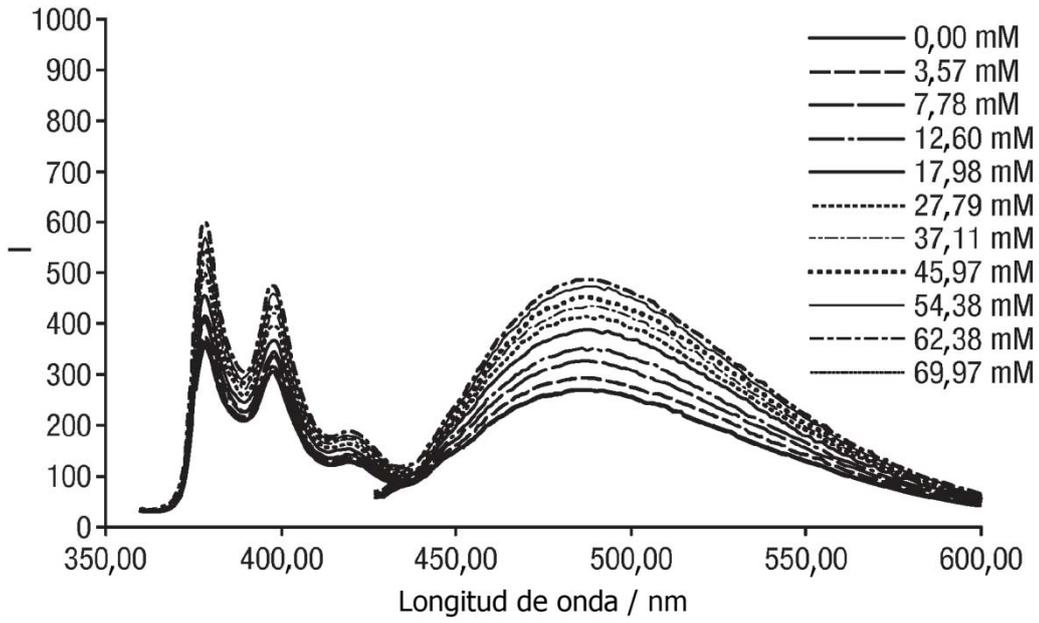


Figura 7a

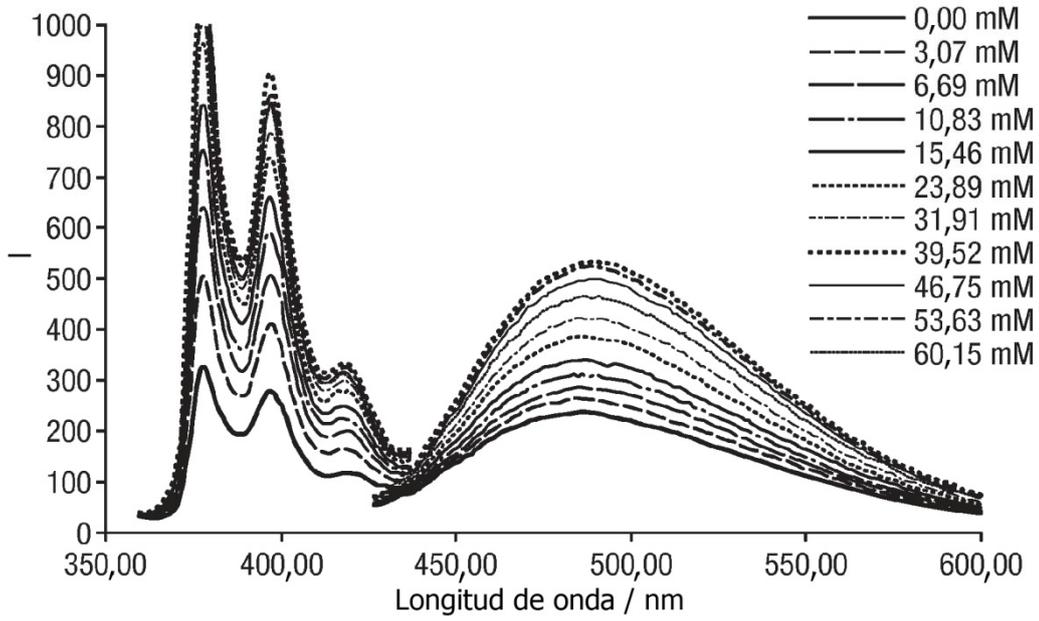


Figura 7b

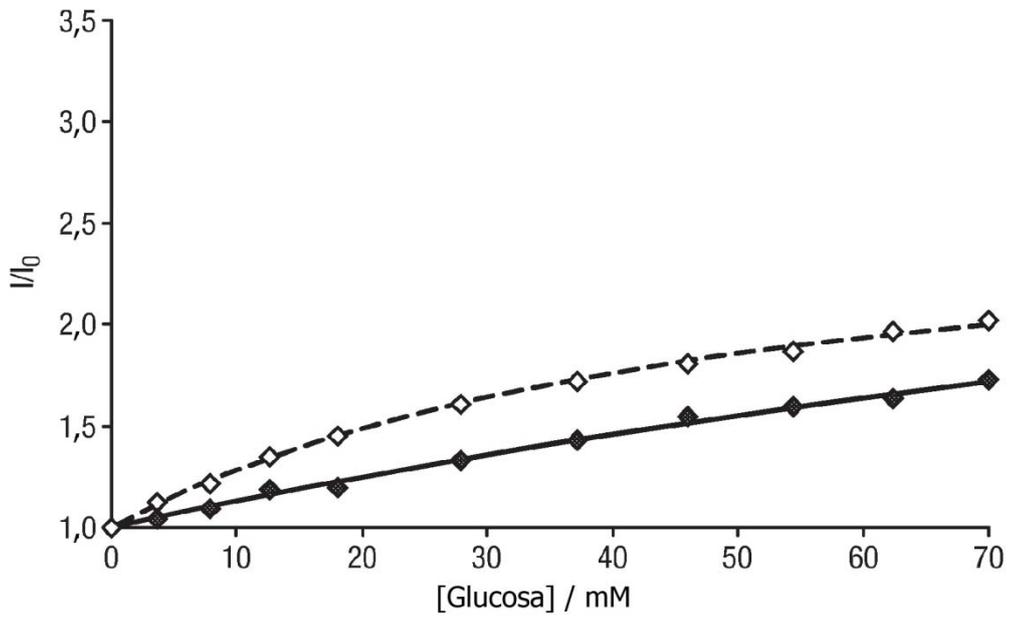


Figura 7c

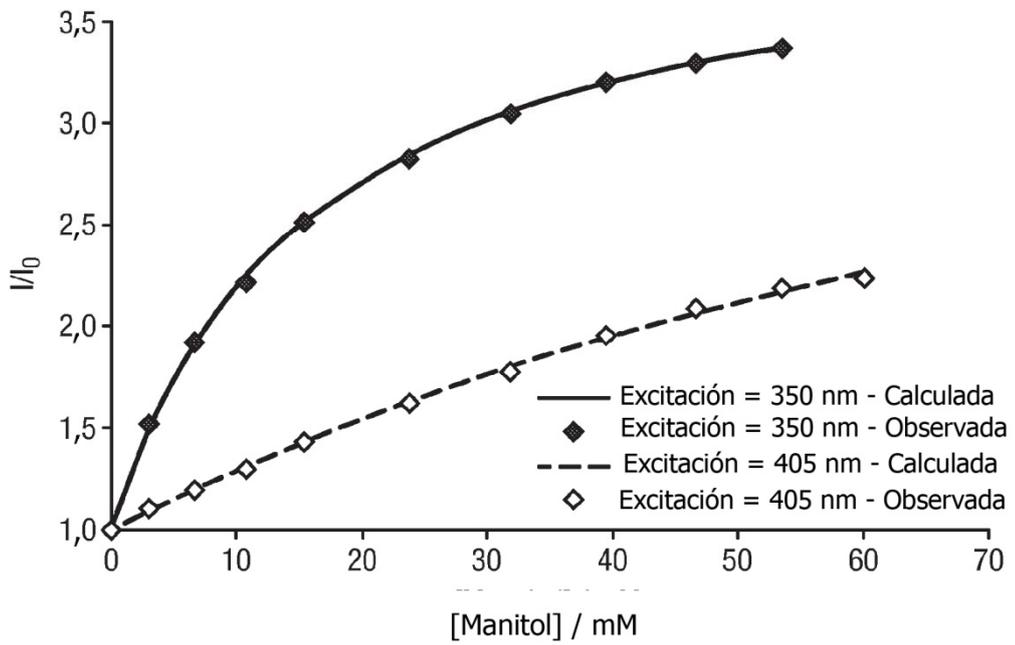


Figura 7d