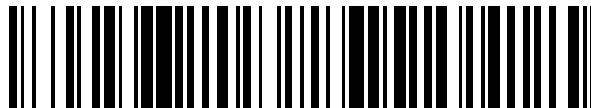


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 060**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2005 E 05763352 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1802970**

54 Título: **Detección del llenado incompleto de unos biosensores**

30 Prioridad:

17.06.2004 US 580407 P

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

19.04.2016

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard
Whippany, NJ 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, DANIEL V. y
BLASCHKE, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 567 060 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

Detección del llenado incompleto de unos biosensores

CAMPO DEL INVENTO

Este invento se dirige en términos generales al sector de los dispositivos médicos

5 ANTECEDENTES DEL INVENTO

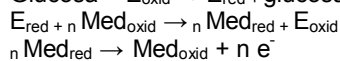
Más específicamente, este invento se refiere a los biosensores que se usan para medir la cantidad de ciertos analitos en fluidos corporales, particularmente a unas mediciones del nivel de glucosa en muestras de sangre entera. Se usan con frecuencia unos métodos ópticos para hacer dichas mediciones, pero el presente invento se refiere a unos mejoramientos en unos biosensores electroquímicos.

10 Aunque el método del invento que se va a describir aquí se puede emplear para la medición de otros analitos, incluyendo colesterol, urea, creatinina y creatina, tiene interés particular la medición del nivel de glucosa en sangre entera. El invento se refiere a un instrumento electroquímico en el que se aplica un potencial constante o variable a unos electrodos que están en contacto con una muestra de sangre y la corriente eléctrica resultante se mide a lo largo de un breve período de tiempo y luego se correlaciona con la cantidad de un analito en la muestra. Se hace referencia a dichos instrumentos como amperométricos, en contraste con unos instrumentos que miden la corriente eléctrica total producida a partir de una reacción de la muestra y se hace referencia a ellos como coulométricos. Los instrumentos amperométricos tienen la ventaja de que ellos llevan a cabo su medición de ensayo a lo largo de un período de tiempo breve en comparación con aquellos en los que se mide la corriente eléctrica total que se ha producido para oxidar a una muestra.

15 20 Los biosensores de glucosa del tipo amperométrico miden la corriente eléctrica que se ha producido cuando se aplica un potencial eléctrico fijo a través de un par de electrodos que están en contacto con una muestra de sangre. La corriente eléctrica medida comienza en un alto valor y luego va disminuyendo y se aproxima a un valor constante que está relacionado con la difusión de un compuesto mediador reducido en uno de los electrodos para su reoxidación. En un período de tiempo previamente determinado, la corriente eléctrica medida se usa para determinar el contenido de glucosa en la muestra.

25 Los electrodos se describen generalmente como el electrodo de trabajo (por ejemplo el electrodo en el que es oxidado el mediador) y el contraelectrodo. Se han descrito en la técnica muchos diseños para tales biosensores, por ejemplo en la patente de los EE.UU. publicada número 6.531.040. Los electrodos están en contacto con una capa sólida que contiene unos reactivos que oxidan a la glucosa existente en la muestra, tales como la glucosa oxidasa y unos mediadores que vuelven a oxidar a la enzima reducida. El mediador reducido propiamente dicho se vuelve a oxidar junto al electrodo de trabajo, tal como más arriba se ha descrito, produciendo de esta manera una corriente eléctrica medible que previamente había sido correlacionada con la cantidad de glucosa en la muestra que se estaba ensayando. Las reacciones se pueden describir mediante las siguientes etapas:

35 Glucosa + E_{oxid} → E_{red} + glucosa oxidada (gluconolactona)



en donde E_{oxid} y E_{red} son las formas oxidada y reducida del centro redox de la enzima y Med_{oxid} y Med_{red} son las formas oxidada y reducida del agente mediador.

40 Para medir los niveles de glucosa, la enzima puede ser una glucosa oxidasa y el mediador puede ser un ferricianuro. La medición de otros analitos empleará unas enzimas y unos mediadores idóneos. Por ejemplo, el colesterol se puede medir usando la colesterol esterasa y un ferricianuro, mientras que un alcohol puede ser medido usando una alcohol oxidasa y la fenilendiamina. Unas típicas combinaciones de una enzima, un mediador y un analito se enumeran en la Tabla 1.

45 **TABLA 1**

Analito	Enzima	Mediador
Glucosa	Glucosa oxidasa	Ferricianuro
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa	Ferricianuro
Colesterol	Colesterol oxidasa	Ferricianuro
Lactato	Lactato oxidasa	Ferricianuro
Ácido úrico	Uricasa	Ferricianuro
Alcohol	Alcohol oxidasa	Fenilendiamina

Los reactivos se suministran en unas cantidades mayores que las que se requieren con el fin de hacer que la glucosa en la muestra de sangre sea el constituyente limitador de la reacción. Es importante que la cantidad de sangre en el sensor sea sustancialmente la misma de un sensor a otro y que cada sensor sea llenado uniformemente. Sin embargo, se ha encontrado que un llenado insuficiente de biosensores es suficientemente frecuente como para plantear un importante problema en el aseguramiento de unas mediciones uniformes y exactas de la glucosa en sangre. Dicho con claridad, si una persona con una condición diabética debe de hacer frecuentes mediciones de su nivel de glucosa en sangre, es vital que esas mediciones sean exactas y confiables. Por lo tanto, es deseable que un instrumento amperométrico sea capaz de detectar cuándo un biosensor ha sido llenado insuficientemente y está proporcionando un resultado incorrecto, de manera tal que el resultado pueda ser desechado y el ensayo tenga que ser repetido, o que la corriente eléctrica medida pueda ser ajustada por otro algoritmo.

Otro problema, que se abordó en las patentes de los EE.UU n^{os} 5.620.579 y 5.653.863, se relaciona con la prematura reducción del agente mediador durante el período de tiempo de caducidad antes de que se use el biosensor. Si se aplica una muestra a dicho sensor, el agente mediador reducido se volverá a oxidar junto al electrodo de trabajo, haciendo que aparezca que estaba presente una cantidad adicional de glucosa en la muestra, dando de esta manera un alto valor incorrecto. Las personas a las que se otorgaron las patentes propusieron comenzar el ensayo de una muestra proporcionando un impulso de potencial eléctrico positivo inicial durante un breve período de tiempo con el fin de volver a oxidar cualquier cantidad de agente mediador que haya sido prematuramente reducida. A dicho impulso inicial se hizo referencia como un "período de tiempo de combustión". Las personas a las que se otorgaron las patentes propusieron además un método para corregir la desviación introducida por el agente mediador reducido en el sensor. El presente invento aborda los datos obtenidos en el período de tiempo de combustión como que ellos se refieren al llenado de biosensores.

En la patente de los EE.UU. n^o 6.531.040, se describió un biosensor amperométrico mejorado. En un aspecto, se pretendía que el biosensor proporcionase una señal que indicase que se había producido un llenado incompleto con la muestra. Esto se había de conseguir proporcionando un sub-elemento del contraelectrodo, situado corriente arriba del electrodo de trabajo, es decir que la muestra, cuando fluía dentro del sensor por acción capilar, alcanzaba primero al electrodo de trabajo y luego al contraelectrodo. Cuando se produjese una condición de llenado insuficiente, la corriente eléctrica sería mucho más débil que lo que normalmente se podría esperar y sería reconocida como que indicase que se había producido un llenado insuficiente. Se describió otro método que usaba unas mediciones de la corriente eléctrica durante los períodos de tiempo llamados de "lectura" y "combustión" para predecir que se había producido un llenado insuficiente.

El documento de solicitud de patente europea EP1422523 A1 describe unos métodos y unos sistemas para determinar si el volumen de una muestra biológica es adecuado para producir una medición exacta de la concentración de un analito electroquímico. El método divulgado está basado en el descubrimiento de que la capacitancia equivalente de una celda electroquímica es el factor más relevante para determinar con exactitud el volumen de una muestra, puesto que la capacitancia equivalente de una celda es linealmente proporcional a la magnitud del área de la superficie de los electrodos de la celda que están en contacto con la muestra (esto es, el área cubierta de la celda), y por lo tanto es linealmente proporcional al volumen de la muestra dentro de la celda, es decir, entre los electrodos. Los autores del invento han descubierto también que la resistencia eléctrica equivalente de la celda electroquímica es adicionalmente relevante para determinar con exactitud el volumen de una muestra, puesto que la resistencia eléctrica equivalente de una celda es inversamente proporcional al área cubierta de la celda y, por lo tanto, es inversamente proporcional al volumen de la muestra. Por lo tanto, una característica del presente invento es deducir dicha área cubierta de la celda y el correspondiente volumen de la muestra a partir de la capacitancia de celda equivalente o a partir tanto de la capacitancia de celda equivalente como de la resistencia de celda equivalente. Éste es un método alternativo al método que se divulga y reivindica en la presente solicitud de patente.

El documento de patente de los EE.UU. US6129823 divulga un sensor electroquímico de un volumen bajo. La reducción en el tamaño mínimo de una muestra se consigue por medio de un revestimiento dieléctrico que se ha impregnado dentro de unas regiones periféricas de una o más capas de malla hidrófila, reduciendo de esta manera el volumen inactivo de una muestra. Las capas de malla están situadas entre un soporte de electrodo y una capa de cubierta, cuya capa de cubierta incluye una abertura que está situada corriente arriba desde una disposición de electrodo.

Una descripción general de las representaciones gráficas de la corriente eléctrica en función del tiempo, que se han generado cuando se aplica un potencial constante entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo en un sensor amperométrico, puede ser útil para el lector.

En general, cuando se aplica un potencial entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y se introduce en el sensor una muestra líquida de sangre o una solución testigo, los reactivos secos son rehidratados por la muestra líquida y comienza a fluir una corriente eléctrica, aumentando típicamente hasta un valor de pico y disminuyendo luego a lo largo del "período de tiempo de combustión", que usualmente es de alrededor de diez segundos. Durante

este período de tiempo el agente mediador previamente reducido se vuelve a oxidar, tal como se ha debatido anteriormente, con el fin de reducir la desviación hacia unos valores falsamente elevados del contenido de glucosa. Si no está presente una cantidad completa de una muestra, se puede haber introducido un error adicional puesto que todos los reactivos pueden no estar disponibles para la reacción, o el electrodo de trabajo y el contraelectrodo pueden no estar en contacto completo con una muestra, reduciendo de esta manera la corriente eléctrica durante el período de tiempo de "combustión".

Después de que se haya completado el período de tiempo de combustión, se proporciona un período de tiempo de descanso con un potencial más bajo o sin ningún potencial, durante el cual tienen lugar unas reacciones de oxidación de la glucosa y el agente mediador es reducido. Entonces se aplica otra vez un potencial constante entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo y se mide la corriente eléctrica durante un breve período de tiempo, que típicamente es de alrededor de diez segundos. La corriente eléctrica es inicialmente alta, pero luego disminuye y se aproxima a un valor constante, que se usa para determinar el contenido de glucosa en la muestra. En los métodos de la solicitud de patente publicada y de la patente otorgada, a la que se ha hecho referencia más arriba, se toman los valores de la corriente eléctrica en ciertos momentos en los períodos de tiempo de combustión y de lectura y se usan para predecir un llenado insuficiente del sensor. Sin embargo, se han deseado unos métodos mejorados de predecir un llenado insuficiente.

Los autores del presente invento han encontrado un método mejorado de determinar el llenado insuficiente de unos sensores, que se va a describir más abajo.

SUMARIO DEL INVENTO

El invento incluye un método de acuerdo con la reivindicación independiente 1 para determinar si un biosensor electroquímico está incompletamente lleno. Se toma una serie de valores de la corriente eléctrica durante el período de tiempo que transcurre desde que se aplica por primera vez un potencial eléctrico entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo del biosensor (esto es, el período de tiempo de combustión). La pendiente de una línea, determinada por regresión lineal a lo largo de la serie de valores de la corriente eléctrica, se usa para determinar si un biosensor se ha llenado o no insuficientemente. El coeficiente de correlación de la serie de valores de la corriente eléctrica se usa para refinar aún más la determinación.

En una forma de realización, con el método del invento se obtienen por lo menos cinco valores de la corriente eléctrica durante el período de tiempo de "combustión" mientras que se está aplicando un potencial eléctrico a los electrodos (p.ej., durante alrededor de 10 segundos). De manera preferible, se seleccionan seis valores de la corriente eléctrica a partir de la segunda mitad del período de tiempo de combustión, que puede ser de desde cinco hasta diez segundos contando desde el momento en que el sensor se ha llenado con una muestra. Se calcula una regresión lineal con estos valores de la corriente eléctrica en función del tiempo.

Cuando se encuentra que es positiva la pendiente de la línea determinada por la regresión lineal, se informa de la existencia de una condición de llenado insuficiente. Alternativamente, si la pendiente es negativa pero el coeficiente de correlación es menor que un valor previamente determinado, que se ha desarrollado a partir de los ensayos acerca del efecto que tiene un llenado insuficiente sobre el rendimiento de un sensor, se informa también acerca de una condición de llenado insuficiente. El valor previamente determinado del coeficiente de correlación será de desde aproximadamente 0,80 hasta aproximadamente 0,95. En una forma de realización preferida, el coeficiente de correlación es de 0,95.

En una forma de realización, los métodos del invento se aplican a la medición amperométrica del contenido de glucosa de sangre entera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos:

La FIG. 1 es una vista despiezada de un biosensor.

La FIG. 2 es una vista ensamblada del biosensor de la FIG. 1.

La FIG. 3 es una típica representación gráfica del potencial aplicado a unos sensores amperométricos durante los períodos de tiempo de combustión y de lectura.

La FIG. 4 es una típica representación gráfica de la corriente eléctrica producida en unos sensores amperométricos durante los períodos de tiempo de combustión y de lectura.

La FIG. 5 es una representación gráfica de los períodos de tiempo de combustión y lectura para múltiples sensores que fueron llenados

La FIG. 6 es una representación gráfica de los períodos de tiempo de combustión y lectura para múltiples sensores que fueron llenados insuficientemente.

5 La FIG. 7 es un diagrama de bloques que ilustra el método del invento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA FORMA DE REALIZACIÓN ILUSTRADA

Descripción de las formas de realización preferidas

10 El invento será descrito seguidamente en su aplicación a la medición del contenido en glucosa de sangre entera que es un método de importancia comercial. Sin embargo, el método del invento tiene otras aplicaciones en las que se encuentran otros analitos, tales como colesterol, urea, creatinina y creatina, en fluidos biológicos, que incluyen orina, saliva y fluido intersticial, cuando es probable que se plantee el problema de un llenado insuficiente de los sensores electroquímicos.

Biosensores electroquímicos

15 El presente invento no está limitado a un diseño particular de un biosensor entre los muchos que han sido divulgados en la especialidad técnica. Un ejemplo de biosensores que se pueden usar se describe en la patente de los EE.UU. nº 6.531.040, que es ilustrada en las FIGS. 1 y 2.

20 El biosensor 10 se muestra en la FIG. 1 en una vista despiezada. Este comprende una base aislante 12 sobre la cual se han impreso en secuencia (típicamente por medio de unas técnicas de impresión por serigrafía), un patrón de conductor eléctrico 14, un patrón de electrodo (las porciones 16 y 18), un patrón de aislante (dieléctrico) 20 y una capa de reacción 22, y se completa mediante una capa de cubierta 28. El capilar 30, que se ha formado entre la capa de cubierta 28 y la capa de reactivo 22, proporciona una trayectoria de flujo para la muestra de ensayo del fluido. Se muestra en la FIG. 2 el biosensor en el que todos los elementos situados en la base se muestran en el mismo plano.

25 La función de capa de reacción 22 es efectuar una reacción química con glucosa, o con otro analito, en la muestra de ensayo de un fluido y producir una corriente eléctrica, que se mide y correlaciona con la cantidad del analito que está presente. La capa de reacción 22 contiene típicamente una enzima o varias enzimas, y un aceptor de electrones. La enzima reacciona con el analito para producir unos electrones, que son transportados hasta la superficie del electrodo de trabajo por un aceptor de electrones. Al aceptor de electrones se puede hacer referencia como un agente mediador, que es reducido como respuesta a la reacción que se produce entre el analito y la enzima. La enzima que está presente en la capa de reacción se puede combinar con un polímero hidrófilo, tal como un poli(óxido de etileno). Una enzima que se puede usar para que reaccione con la glucosa es la glucosa oxidasa y el agente mediador es una sal de ferricianuro.

35 Las dos porciones 16, 18 del patrón de electrodo proporcionan los respectivos electrodo de trabajo y contraelectrodo, que son necesarios para determinar electroquímicamente la concentración de un analito. Una característica del diseño mostrado es que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo están configurados de manera tal que la parte principal del contraelectrodo está situada corriente abajo (en términos de la dirección de circulación de un fluido a lo largo de la trayectoria de circulación) desde la porción expuesta del electrodo de trabajo 16a.

40 Sin embargo, un sub-elemento 18a del contraelectrodo está colocado corriente arriba desde el elemento superior 16a del electrodo de trabajo, de manera tal que cuando una cantidad de una muestra de un fluido de ensayo (p.ej. una muestra de sangre entera) que es inadecuada para cubrir completamente al electrodo de trabajo, entra en el espacio capilar, se forma una conexión eléctrica entre el sub-elemento 18a del contraelectrodo y la parte expuesta del electrodo de trabajo 16a debido a la conductividad de la muestra de sangre entera. Sin embargo, el área del contraelectrodo, que está disponible para estar en contacto con la muestra de sangre entera, es tan pequeña que solamente puede pasar una muy débil corriente eléctrica entre los electrodos y, por lo tanto, a través del detector de corriente eléctrica. Programando el detector de corriente eléctrica para dar una señal de error cuando la señal recibida está situada por debajo de un nivel previamente determinado, el dispositivo sensor informa al usuario de que ha entrado una insuficiente cantidad de sangre en la cavidad del sensor, y de que se debería llevar a cabo otro ensayo, o de que se debería añadir más cantidad de sangre. Aunque no son críticas las dimensiones particulares de los electrodos, el área del sub-elemento 18a del contraelectrodo es típicamente menor en aproximadamente un 10 % que la del electrodo de trabajo y, más específicamente, es menor en aproximadamente un 6 %. Este elemento debería ser hecho lo más pequeño que fuese posible.

Se consideraba también en la patente de los EE.UU. n.º 6.531.040 que la capa de reacción 22 podría ser retirada del contacto con el sub-elemento 18a del contraelectrodo, produciendo una pantalla que no imprime tinta con reactivos sobre el sub-elemento 18a del contraelectrodo. Esto privaría al sub-elemento de reactivos, no permitiendo de esta manera que éste funcione como un apropiado contraelectrodo, de manera que se consigue una condición de error cuando la muestra de fluido de ensayo no es capaz de estar en contacto con el volumen del contraelectrodo 18. Mientras que se pone de manifiesto que el sub-elemento 18a está conectado físicamente con, y por lo tanto forma parte de, el contraelectrodo 18, 18a puede ser desconectado físicamente con respecto del resto del contraelectrodo, con tal de que este tenga su propio conector y de que el sensor sea equipado con un tercer contacto para el detector.

El electrodo de trabajo y el contraelectrodo son impresos generalmente usando una tinta para electrodos, que generalmente tiene un espesor de aproximadamente 14 μm (0,00055") y contiene típicamente carbón activo electroquímicamente. Los componentes de la tinta conductora pueden ser una mezcla de carbono y plata, que se escoge para proporcionar una trayectoria con baja resistencia química entre los electrodos y el dispositivo medidor con el que estos están en conexión operativa a través de un contacto con el patrón conductivo de un extremo 26 en forma de cola de pez del sensor. El contraelectrodo se puede componer de una mezcla de plata y cloruro de plata, aunque se prefiere el carbono. Con el fin de aumentar la reproducibilidad de la lectura del medidor, el patrón dieléctrico aísla a los electrodos con respecto de la muestra de ensayo de fluido, excepto en una zona definida que está situada cerca del centro del patrón 24 de electrodo. Haciendo referencia a la FIG. 2, un área definida es importante en este tipo de determinaciones electroquímicas, puesto que la corriente eléctrica medida depende no solamente de la concentración del analito y del área de la capa de reacción 22, sino también de la zona del electrodo de trabajo 16a que está expuesta a la muestra de ensayo que contiene un analito.

Una típica capa dieléctrica 20 comprende un monómero, oligómero o polímero modificado con acrilato y curado con rayos UV, y tiene un espesor de aproximadamente 10 μm (0,0004"). La capa dieléctrica también puede ser curable por humedad o curable por calor. Una tapa o cubierta 28 es adaptada para acoplarse con la base para formar un espacio destinado a recibir a la muestra de ensayo de fluido en la que están situados el contraelectrodo y el electrodo de trabajo. La tapa 28 proporciona un espacio cóncavo 30 y es formada típicamente gofrando una lámina plana de material deformable. La tapa 28 es perforada para proporcionar una lumbrera 32 para la descarga de aire y es unida con la base 12 en una operación de cierre hermético. La tapa y la base pueden ser cerradas herméticamente en común mediante un proceso de soldadura por ultrasonidos, en el que la base 12 y la tapa 28 son en primer lugar alineadas y luego prensadas conjuntamente entre un miembro vibratorio de cierre hermético por calor, o cuerno, y una mandíbula estacionaria. El contacto es producido solamente con las regiones planas, no gofradas, de la tapa. Una energía ultrasónica procedente de un cristal u otro transductor es disipada en forma de calor en la junta polimérica que permite la unión de los materiales termoplásticos. La tapa y la base gofradas pueden también ser unidas usando un material adhesivo en la cara inferior de la tapa. El método para unir a la tapa y a la base se describe más completamente en el documento de patente de los EE.UU. n.º 5.798.031.

Unos materiales apropiados para la base aislante 12 incluyen un policarbonato, un poli(tereftalato de etileno), unos polímeros vinílicos y acrílicos que son dimensionalmente estables, y unas mezclas preparadas de polímeros tales como una constituida a base de un policarbonato y de un poli(tereftalato de etileno), y unas estructuras de hojas metalizadas (p.ej. un estratificado de nailon, aluminio y un poli(cloruro de vinilo)). La tapa se fabrica típicamente a partir de un material laminar polimérico deformable, tal como un policarbonato, o de una calidad gofrable de un poli(tereftalato de etileno), de un poli(tereftalato de etileno) modificado con un glicol, o una composición de hoja metálica (p.ej. una estructura de hoja de aluminio).

Otros sensores electroquímicos se pueden usar en el presente invento. Unos ejemplos de un sensor electroquímico que se puede usar para medir unas concentraciones de glucosa son los que se usan en los sistemas DEX® y ELITE® de Bayer HealthCare's Ascensia™. Más detalles acerca de dicho sensor electroquímico se pueden encontrar en las patentes de los EE.UU. n.ºs 5.120.420 y 5.320.732. Otros sensores electroquímicos pueden ser comprados de Matsushita Electric Industrial Company. Otro ejemplo más de un sensor electroquímico, que se puede usar en un sistema de vigilancia amperométrico, se divulga en la patente de los EE.UU. n.º 5.429.735.

Los sensores electroquímicos pueden ser colocados en un instrumento dispensador de sensores de glucosa en sangre, que está cargado con una pluralidad de sensores o elementos de ensayo. Un ejemplo de un paquete de sensores cargado en un instrumento dispensador de sensores, se divulga en la patente de los EE.UU. n.º 5.660.791.

Medición del nivel de glucosa en sangre entera

En un típico biosensor para medir el contenido en glucosa de sangre entera, un par de electrodos, a los que se hace referencia aquí como el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, se revisten con una única capa de un reactivo o bien mediante impresión concomitante o mediante deposición concomitante. La capa de reactivo incluirá típicamente algunos polímeros y los ingredientes reactivos, esto es, una enzima que oxida a la glucosa en la muestra de sangre y un agente mediador (esto es un compuesto redox que vuelve a oxidar a la enzima después de que ésta haya sido reducida por oxidación de la glucosa). El agente mediador reducido acarrea electrones desde la reacción enzimática de oxidación de glucosa hasta el electrodo de trabajo y es vuelto a oxidar junto a la superficie del electrodo. El

diferencial de voltaje aplicado entre los dos electrodos da como resultado que el agente mediador haga pasar electrones al electrodo de trabajo, los cree y una corriente eléctrica medible que es proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra. El biosensor puede comprender también múltiples capas de reactivos o puede comprender diferentes capas de reactivos únicos o múltiples en cada uno de los electrodos, el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

Tal como se ha descrito con anterioridad, los sensores amperométricos aplican un potencial eléctrico fijo a través de los electrodos, y la corriente eléctrica producida se mide durante un período de tiempo previamente determinado, que puede ser bastante corto, tal como por ejemplo de 5 a 10 segundos, para corregir la desviación que se puede presentar debido a una reducción prematura del agente mediador. Una típica representación gráfica del potencial en función del tiempo para el "período de tiempo de combustión" se presenta en la FIG. 3. La FIG. 4 muestra una típica representación gráfica de la corriente eléctrica en función del tiempo, que resulta. La corriente eléctrica sube hasta un valor de pico y luego disminuye mientras que la muestra está volviendo a hidratar la capa de reactivo, haciendo posible que se realicen las reacciones de oxidación y reducción. Después de este breve período de tiempo, el potencial aplicado se retira o por lo menos se reduce durante un período de tiempo de descanso, que hace posible que se realicen las reacciones. Entonces, el potencial se vuelve a aplicar y la corriente eléctrica se mide durante un período de tiempo de "lectura" previamente determinado (p.ej. de diez segundos). Puesto que está presente un mediador reducido, como resultado de la oxidación concomitante de la enzima, la corriente eléctrica producida inicialmente es alta, pero luego va disminuyendo asintóticamente y se aproxima a una condición de estado estable. La corriente eléctrica registrada al final del corto período de tiempo de "lectura", se usa para determinar el contenido en glucosa de la muestra de sangre, por medio de una correlación previamente obtenida entre la corriente eléctrica al final del período de tiempo de lectura y la glucosa contenida en unas muestras de ensayo que tienen unas concentraciones conocidas.

Los anteriores métodos empleaban generalmente unos flujos de corriente eléctrica en unos momentos previamente determinados en los períodos de tiempo de combustión y de lectura como indicativos del llenado del sensor, por ejemplo el factor de decadencia k , y la relación de Lectura a Combustión R/B, que se describen en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2002/0175075 A1. Sin embargo, los presentes autores del invento descubrieron que cuando el biosensor no es llenado completamente, los flujos de corriente eléctrica durante el período de tiempo de combustión exhibían en particular unos patrones muy irregulares, a diferencia de los que se muestran en la FIG. 4. Las FIGS. 5 y 6 ilustran los resultados que encontraron los autores del presente invento. Una serie de ensayos con unos sensores, que no habían sido llenados insuficientemente de una manera significativa se muestran representados gráficamente en común en la FIG. 5. Además de unos picos minoritarios durante la parte temprana del período de tiempo de combustión, puede verse el patrón típico de la FIG. 4. La FIG. 6 muestra unas similares representaciones gráficas de ensayos en los que el sensor fue llenado insuficientemente de una manera intencionada. El patrón típico de la FIG. 4 ha desaparecido y hay un desplazamiento del flujo máximo de corriente eléctrica hacia la última mitad del período de tiempo de combustión. Estos desplazamientos de los picos son atribuidos a un movimiento del líquido de las muestras dentro del sensor, proporcionando de esta manera un aumento en la concentración del agente mediador en la vecindad del electrodo de trabajo. Además de ello, estos desplazamientos de los picos resultan de un insuficiente cubrimiento del electrodo, que retarda la rehidratación de los reactivos y la generación de corriente eléctrica. Se infiere a partir de ello que no es probable que la selección de cualquier momento durante el período de tiempo de combustión como un indicador de un llenado insuficiente sea suficiente para proporcionar unos resultados confiables, incluso aunque la experiencia ha mostrado que se había conseguido algún éxito. En cualquier caso, unos medidores de glucosa comerciales no proporcionan una presentación visual de los flujos de corriente eléctrica y, por lo tanto, aunque es factible una observación de los flujos de corriente eléctrica durante el período de tiempo de combustión, no se considera que ella sea una manera práctica de indicar al usuario que se había producido un llenado insuficiente del sensor. Los autores del presente invento proponen un nuevo método que puede ser proporcionado en unos sensores comerciales de glucosa usando unos datos que se recogen durante el período de tiempo de combustión.

El nuevo método tiene las siguientes etapas:

1. Se recogen datos de corriente eléctrica en una serie de momentos previamente determinados durante la última parte del período de tiempo de combustión. Preferiblemente, los datos se recogerán a los 5, 6, 7, 8, 9, y 10 segundos después de haber comenzado el período de tiempo de combustión.

2. Se determina mediante unos métodos estadísticos el óptimo ajuste de una línea recta a lo largo de los datos obtenidos en la primera etapa, por regresión lineal. Se almacenan la pendiente de la línea y el coeficiente de correlación.

3. Si la pendiente de la línea determinada en la etapa 2 es positiva, ello indica que se ha realizado un llenado insuficiente del sensor y el usuario es informado de esto por el aparato medidor del nivel de glucosa. Si no es positiva la pendiente, entonces el coeficiente de correlación es tomado en consideración en la siguiente etapa, puesto que todavía puede ser posible un llenado insuficiente.

4. Si la pendiente de la línea procedente de la etapa 2 no es positiva, pero el coeficiente de correlación es menor que un valor previamente determinado, se informa al usuario de que es probable un llenado insuficiente y de que el proceso debería ser repetido con un nuevo sensor. El coeficiente de correlación puede ser determinado a partir de los resultados de los ensayos que se hacen para evaluar el efecto de un llenado insuficiente durante el período de tiempo de combustión y que pueden variar con el diseño del sensor. Se espera que el valor previamente determinado del coeficiente de correlación sea de desde aproximadamente 0,8 hasta aproximadamente 0,95. Preferiblemente, para medir el contenido de glucosa en sangre entera, el valor previamente determinado es de 0,95.

Si la pendiente de la línea procedente de la etapa 2 no es positiva y el coeficiente de correlación está en o por encima de su valor previamente determinado, preferiblemente en 0,95 o un valor más alto, el contenido de glucosa en la muestra se calcula a partir de la corriente eléctrica registrada al final de la etapa de lectura. Si se está por debajo del valor previamente determinado del coeficiente de correlación, el resultado es rechazado.

Una ventaja del presente invento reside en la exactitud mejorada con la que se puede determinar un llenado insuficiente del sensor. Además, el nuevo método implica recoger solamente unos relativamente pocos puntos de datos, lo cual se encuentra dentro de la capacidad de los aparatos medidores de glucosa por medio de corrientes eléctricas puesto que este no requiere un programa computacional más sofisticado, no requiere un aumento sustancial en la memoria del microprocesador y no disminuye significativamente la vida útil de una batería. En unos ensayos efectuados por los autores del invento, que se describirán seguidamente de una manera más completa, que comparan el método de las patentes de los EE.UU. n.ºs 5.620.579 y 5.653.863 con el nuevo método, se encontró que el nuevo método proporcionaba unos resultados mejorados. En 1373 sensores que se sabía que habían sido llenados insuficientemente, el nuevo método predijo un 80 % de los llenados insuficientes. En contraste con ello, el método anterior identificó correctamente sólo un 47 % de los llenados insuficientes. Además de ello, puesto que el contenido de glucosa en las muestras de sangre era conocido en estos ensayos, se encontró que un número importante de los sensores proporcionaba unas lecturas del nivel de glucosa que eran demasiado altas por lo menos en un 15 %. De éstas el nuevo método rechazaba un 95 %, mientras que el método anterior rechazaba solamente un 60 %.

El método del invento es ilustrado en el diagrama de bloques de la FIG. 7. El método será descrito en términos generales y luego cuando haya sido aplicado a una serie de ensayos llevados a cabo por los autores del invento.

Comenzando en el lado izquierdo superior del diagrama, la primera etapa consiste en aplicar un potencial eléctrico, típicamente alrededor de 400 milivoltios, entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo del biosensor. El líquido de muestra es introducido luego en el biosensor para comenzar el período de tiempo de combustión, en el que la capa de reactivo es acondicionada para mejorar la exactitud de los resultados. Este período de tiempo de combustión puede ser de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 segundos, se usan típicamente alrededor de diez segundos en los sensores de glucosa. Se registra la corriente eléctrica desarrollada junto con el período de tiempo para cada valor de la corriente eléctrica. Como se recordará a partir de la FIG. 6, cuando un sensor ha sido llenado insuficientemente, los datos de la corriente eléctrica pueden exhibir un patrón errático del período de tiempo de combustión. En el presente invento, se prefiere que unos datos procedentes de la última mitad del período de tiempo de combustión se seleccionen como indicativos de un llenado insuficiente del sensor. Por lo tanto, se prefiere particularmente tomar por lo menos 5 puntos de datos durante la segunda mitad del período de tiempo de combustión, especialmente por lo menos 6 puntos de datos. Como se comprenderá al examinar la FIG. 5, cuando un biosensor no ha sido llenado insuficientemente, se podría esperar que una línea trazada a través de la segunda mitad de los datos del período de tiempo de combustión (de corriente eléctrica en función del tiempo) tendría una pendiente negativa, mientras que no era probable que fuese negativa una línea trazada a través de la segunda mitad del período de tiempo de combustión en la FIG. 6, sino que esta podría tener una pendiente positiva. Por lo tanto, se consideraría que cualquier línea que tuviera una pendiente positiva indicaría un sensor que había sido llenado insuficientemente y que cualquier línea que no mostrase una pendiente claramente negativa podría indicar también una condición de llenado insuficiente. Puesto que se considera que es importante rechazar un sensor que se ha llenado insuficientemente, los criterios usados en el invento reducen al mínimo la posibilidad de que un sensor llenado insuficientemente no sea rechazado.

Los datos seleccionados de la corriente eléctrica en función del tiempo son sometidos a una regresión lineal para establecer una línea recta óptimamente ajustada a los datos. La pendiente de esa línea se usa como la base principal para rechazar a unos sensores por haber sido llenados insuficientemente. Esto quiere decir que, cuando la línea tiene una pendiente positiva, se informa de que el sensor ha sido llenado insuficientemente. Para refinar aún más los criterios, se calcula también el coeficiente de correlación de los puntos de datos. Si la pendiente de la línea determinada no es positiva, pero tampoco claramente negativa, y el coeficiente de correlación está situado por encima de un valor previamente determinado (p.ej., 0,95 o más alto), se considera que el sensor ha sido adecuadamente llenado y se informa en este sentido. Si el coeficiente de correlación está por debajo de un valor previamente determinado (p.ej. en 0,95) se considera que el cálculo de la pendiente es dudoso. Se informa de que el sensor ha sido llenado insuficientemente, aunque se reconoce que alguna fracción de los sensores podrá ser rechazada innecesariamente.

Después del período de tiempo de combustión, el instrumento usado para ensayar una muestra hará una pausa durante un período de tiempo de descanso en el que el potencial eléctrico se ha retirado o por lo menos se ha reducido mucho, con el fin de que las reacciones se realicen en la capa de reactivos. Dichos períodos de tiempo son típicamente de desde 0 hasta aproximadamente 10 segundos. A continuación del período de tiempo de descanso, se vuelve a aplicar el potencial eléctrico y se registran la corriente eléctrica y el tiempo. La corriente eléctrica inicial es alta, pero a lo largo del período de tiempo de lectura la corriente eléctrica disminuye según se va aproximando a un estado estable. Después de que haya finalizado el período de tiempo de lectura, típicamente desde alrededor de 2 hasta alrededor de 10 segundos, el valor final de la corriente eléctrica se usa para predecir la concentración del analito, tal como glucosa, en miligramos para cada decilitro de sangre. Se desarrollaron con esta finalidad unas previas correlaciones de la corriente eléctrica para unos sensores particulares. La concentración de glucosa puede ser aceptada como correcta si no se informa por uso de los métodos del invento de que el sensor ha sido llenado insuficientemente. Se espera normalmente que un llenado insuficiente proporcione un valor del nivel de glucosa que sea demasiado alto o demasiado bajo, y que un paciente diabético no confíe en él. No obstante, pueden ser satisfactorios unos valores de los niveles de glucosa que no sean altos o bajos en más de un 15 % hasta un 20 % si los ensayos se llevan a cabo frecuentemente. Por lo tanto, se pretende que los criterios del invento rechacen también como llenados insuficientemente a aquellos sensores que tengan unos perfiles de corriente eléctrica que se asemejan a la FIG. 6 y que se pueda esperar que se informen unos valores de los niveles de glucosa que sean altos en más de un 15 %. En una muestra aleatoria, no se conocería el contenido real de glucosa pero en una serie de ensayos llevados a cabo por lo autores del invento se mostró que el método del invento rechazaba la totalidad excepto un 5 % de las muestras que habían informado sobre unas concentraciones de glucosa que eran un 15 % más altas que la concentración conocida.

Ejemplo

En los ensayos a los que se ha hecho referencia anteriormente, un grupo de 1373 sensores fue llenado insuficientemente de una manera intencionada con unas muestras de sangre que contenían unas cantidades conocidas de glucosa. Por lo tanto, colocando los sensores en un aparato medidor del nivel de glucosa DEX (de Bayer Corporation) y tomando datos durante la última parte del período de tiempo de combustión y registrando el contenido de glucosa que había sido leído por el medidor, se determinó la efectividad del método del invento. Se siguió el protocolo de la FIG. 7 para cada uno de los 1373 sensores. Puesto que se sabía que todos los sensores habían sido llenados insuficientemente, un resultado perfecto hubiera sido encontrar que la totalidad de los 1373 sensores habían sido llenados insuficientemente y se había rechazado la lectura del nivel de glucosa. En estos ensayos, un 80 %, o sea 1098, de los sensores se identificaron correctamente como que habían sido llenados insuficientemente. Una varianza de $\pm 15\%$ desde el valor correcto es aceptable en el contexto de una vigilancia continua de los niveles de glucosa y en patrones industriales. Usando este patrón se encontró que de los 1098 sensores rechazados por haber sido llenados insuficientemente, 445 de ellos daban todavía unas lecturas de los niveles de glucosa que estaban situadas dentro del 15 % del valor correcto. Estos sensores requerirían un ensayo repetido aunque los resultados fuesen aceptables. De modo importante, aproximadamente la mitad de los sensores dieron una lectura del nivel de glucosa que estaba por encima del valor correcto en más de un 15 %. Un 95 % de éstos se rechazó por el protocolo del invento. Tomando 687 como el número de resultados erróneos (esto es, $> 15\%$ por encima del valor correcto), 653 fueron rechazados, lo que constituye un resultado muy bueno. Por lo tanto, solamente 34 de los sensores entre 1373 hubieran sido pasados por alto por el protocolo del invento. Se puede también sacar la conclusión de que 241 no habían sido rechazados sino que estaban dentro del patrón de carácter erróneo, es decir $\pm 15\%$, y dieron resultados aceptables.

La serie de ensayos que se acaban de describir mostró que el protocolo del invento podría rechazar un 95 % de los sensores que habían dado incorrectamente unos valores de los niveles de glucosa más altos que lo que hubiera sido aceptable por la norma seleccionada. Es esta capacidad de rechazar a unos sensores que den resultados erróneos la que es importante para el usuario. Como se ha mencionado más arriba, los métodos anteriores eran capaces solamente de rechazar alrededor de un 60 % de los sensores que tuviesen resultados erróneos, permitiendo de esta manera que se considerase que proporcionaban resultados exactos un número mucho mayor de sensores.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un llenado incompleto con una muestra de líquido en un biosensor electroquímico (10) que tiene un electrodo de trabajo y un contraelectrodo (16,18), comprendiendo el método las acciones de:
- 5 (a) aplicar un potencial eléctrico constante entre dicho electrodo de trabajo y el contraelectrodo (16, 18) durante un período de tiempo previamente determinado;
- (b) medir la corriente eléctrica que pasa entre dicho electrodo de trabajo y el contraelectrodo (16, 18);
- 10 (c) recoger los valores de la corriente eléctrica medidos en la acción (b) en unos momentos previamente determinados durante dicho período de tiempo previamente determinado de la acción (a);
- (d) determinar por un método estadístico la pendiente de una línea definida por los valores de la corriente eléctrica que se han recogido en la acción (c); y
- (e) informar de que el biosensor (10) ha sido incompletamente llenado si es positiva la pendiente de la línea que se ha determinado en la acción (d).
2. El método de la reivindicación 1 en el que dicho método estadístico es el de regresión lineal.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, que comprende además las acciones de:
- (f) determinar el coeficiente de correlación de los valores recogidos en la acción (c);
- (g) informar de que el biosensor (10) ha sido llenado incompletamente si es negativa la pendiente de la línea que se ha determinado en la acción (d), pero en donde el coeficiente de correlación que se ha determinado en la acción (f) es menor que un valor previamente determinado.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho valor previamente determinado es de desde aproximadamente 0,80 hasta aproximadamente 0,95.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho valor previamente determinado es de aproximadamente 0,95.
6. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos valores recogidos se obtienen durante la segunda mitad de dicho período de tiempo previamente determinado de la acción (a).
- 25 7. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos valores recogidos en la acción (c) se presentan en un número de por lo menos 5.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dichos valores recogidos están en un número de por lo menos 6.
9. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho período de tiempo previamente determinado de la acción (a) es de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 segundos.
- 30 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho período de tiempo previamente determinado de la acción (a) es de 10 segundos.
11. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho biosensor (10) ayuda a medir la concentración de glucosa en sangre entera.

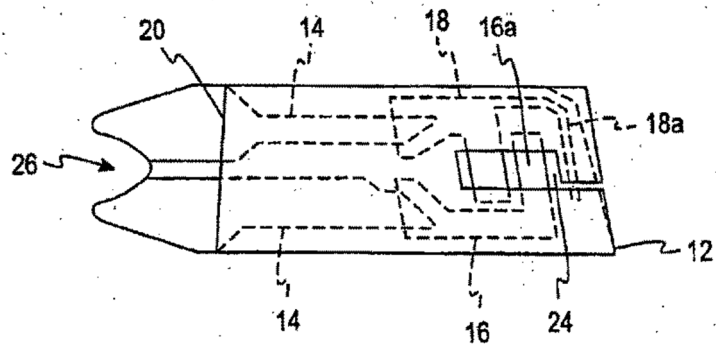
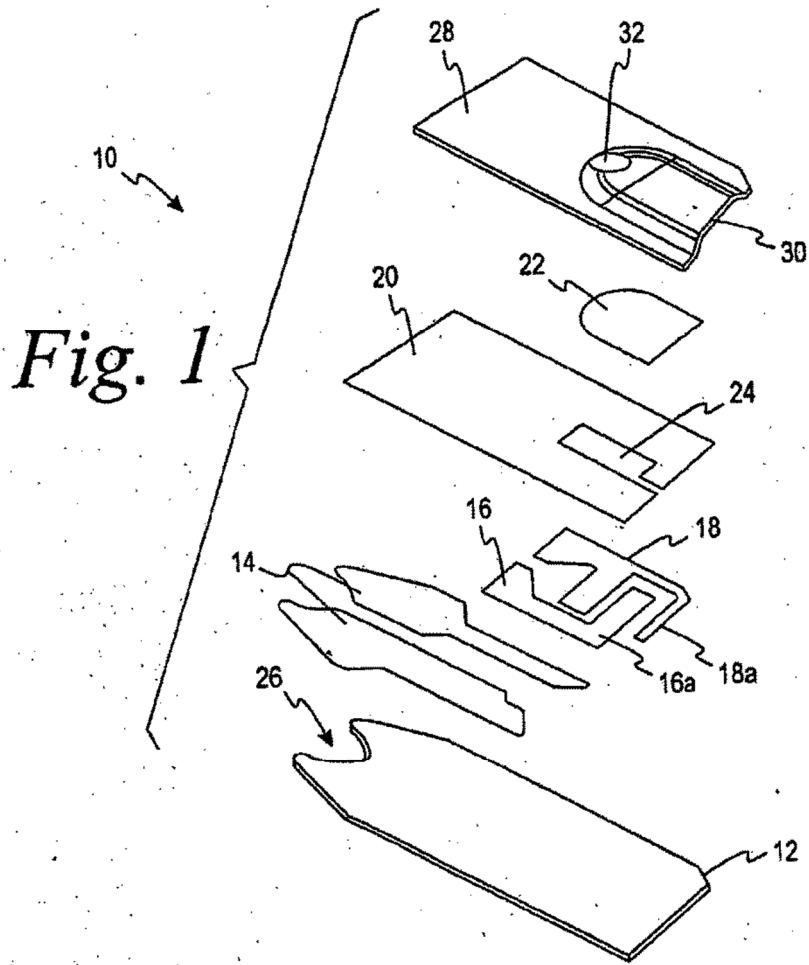


Fig. 2

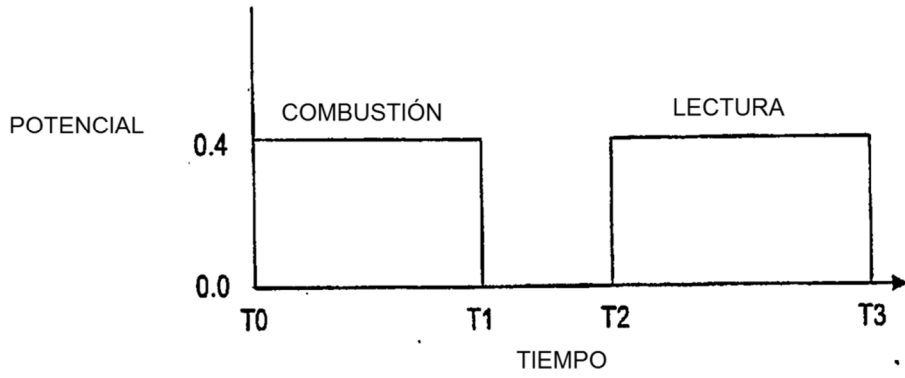


Fig. 3

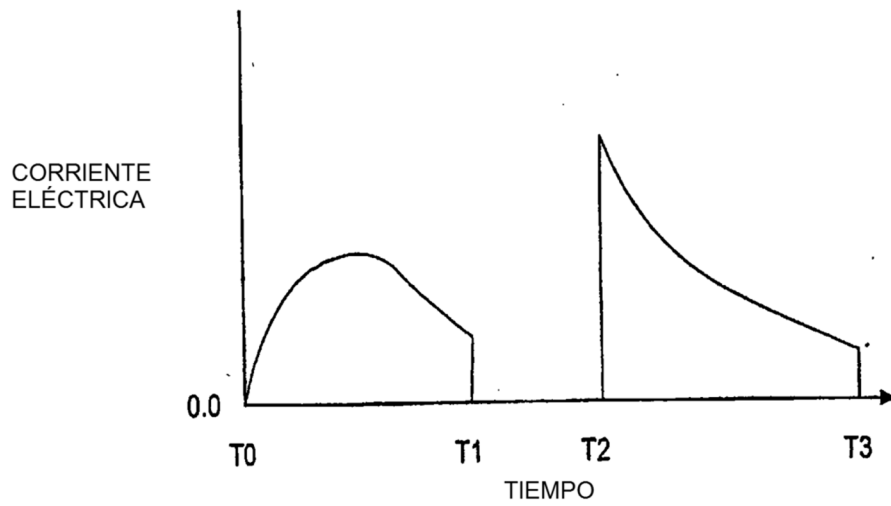


Fig. 4

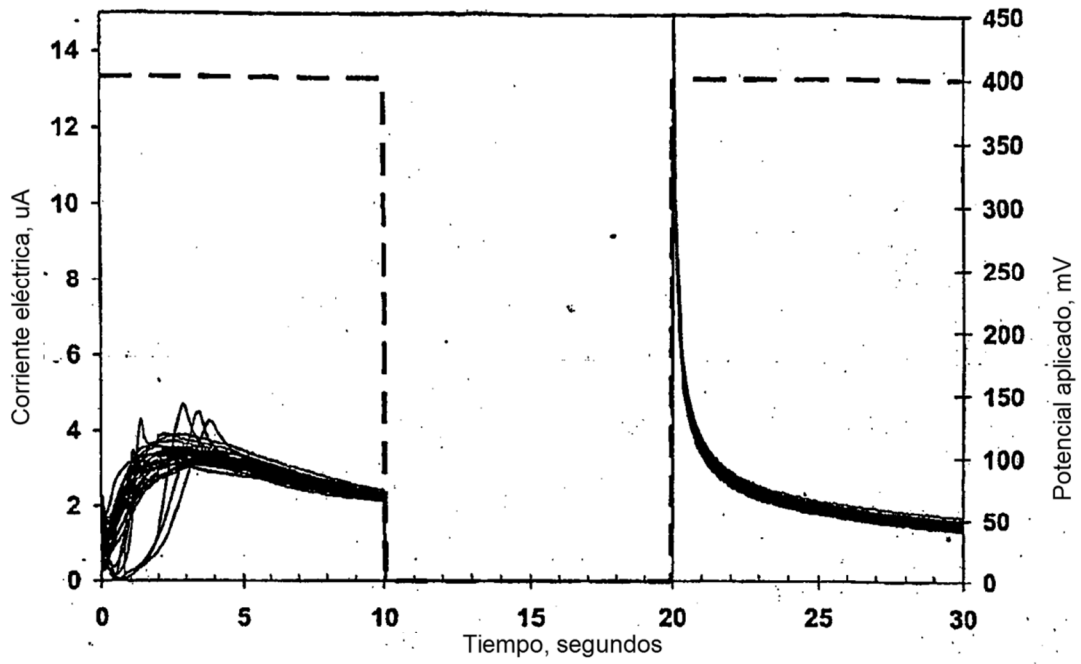


Fig. 5

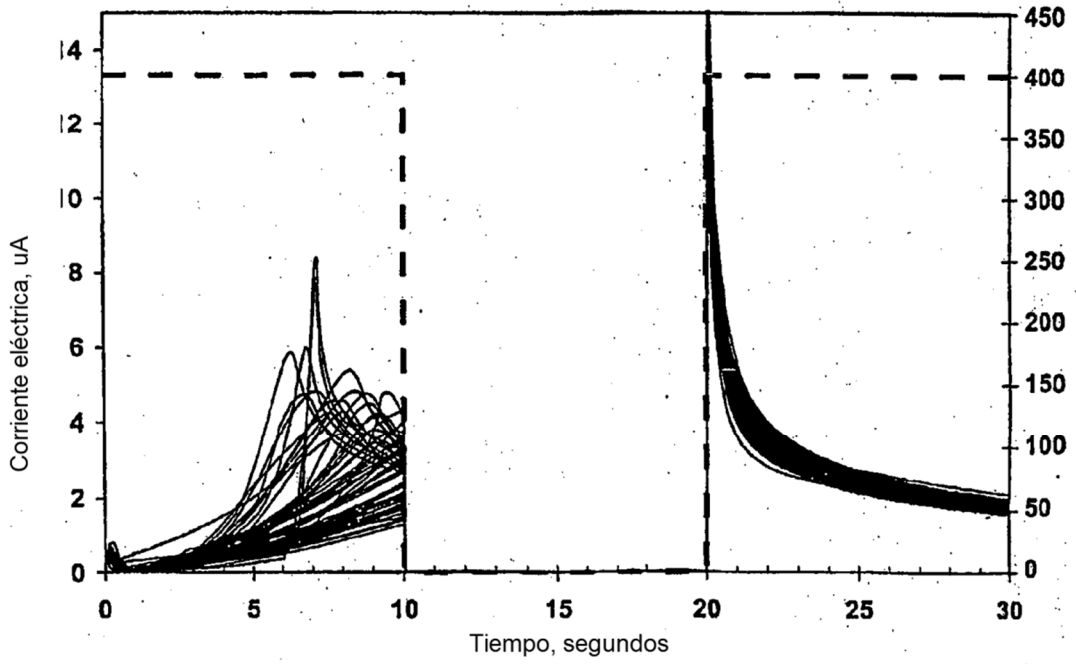


Fig. 6

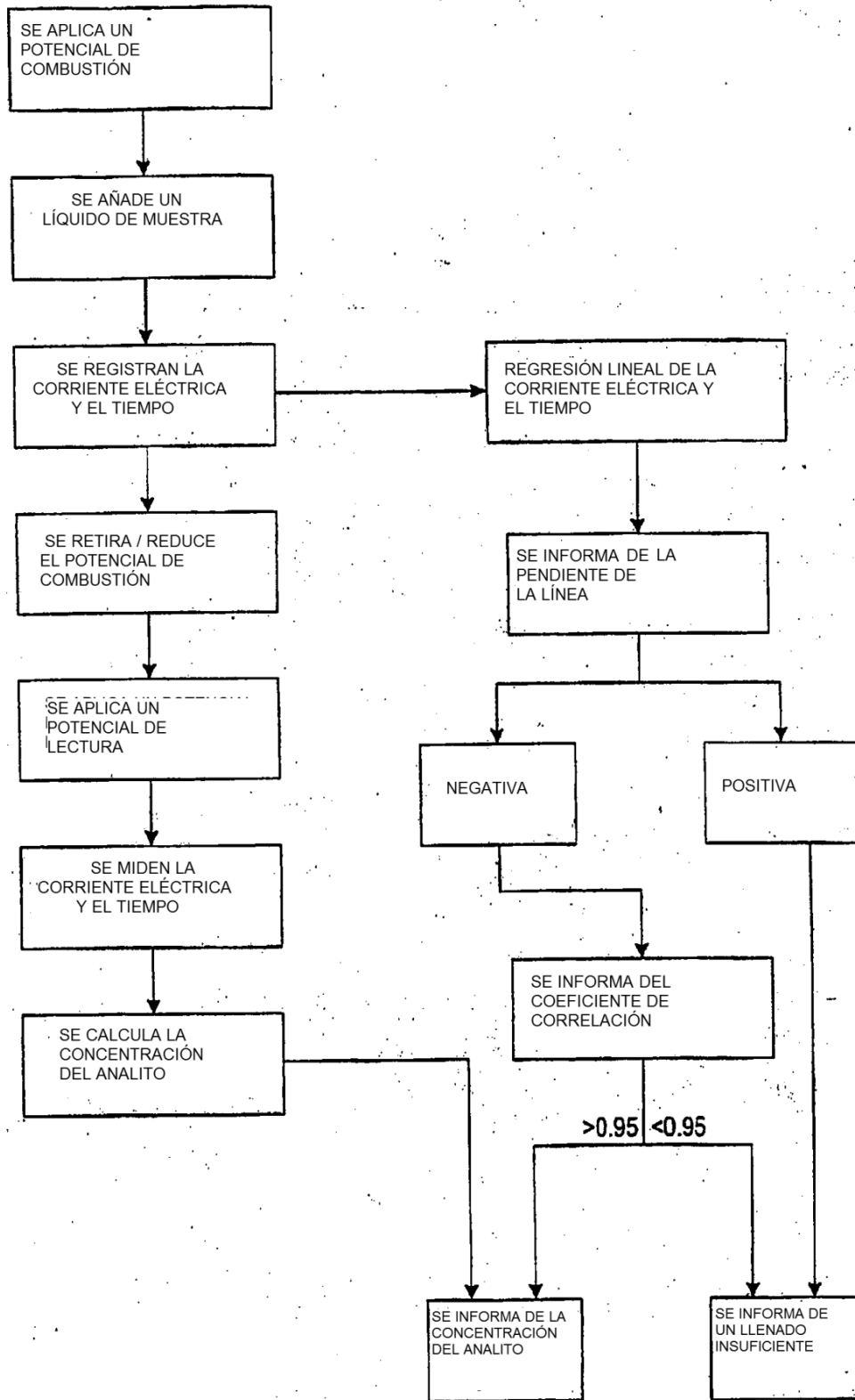


Fig. 7