

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 574**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2008 PCT/US2008/086162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2009 WO09076402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2008 E 08860421 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2235526**

54 Título: **Composiciones reactivas de partículas porosas, dispositivos y métodos para biosensores**

30 Prioridad:

**10.12.2007 US 12739 P**

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

**20.04.2018**

73 Titular/es:

**ASCENSIA DIABETES CARE HOLDINGS AG  
(100.0%)**

**Peter-Merian Strasse 90  
4052 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**ZHU, BORU**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 664 574 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

Composiciones reactivas de partículas porosas, dispositivos y métodos para biosensores

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/012.739 titulada "Porous Particle Reagent Compositions, Devices, and Methods for Biosensors" presentada el 10 de diciembre de 2007.

10 **Antecedentes**

Los biosensores proporcionan un análisis de un fluido biológico, tal como sangre completa, suero, plasma, orina, saliva, fluido intersticial o intracelular. Normalmente, los biosensores tienen un dispositivo de medición que analiza una muestra que reside en una tira de detección. La muestra está habitualmente en forma líquida y además de ser un fluido biológico, puede ser el derivado de un fluido biológico, tal como un extracto, una dilución, un filtrado o un precipitado reconstituido. El análisis realizado por el biosensor determina la presencia y/o concentración de uno o más analitos, tales como alcohol, glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, ácidos grasos libres, triglicéridos, proteínas, cetonas, fenilalanina o enzimas, en el fluido biológico. El análisis puede ser útil en el diagnóstico y el tratamiento de anomalías fisiológicas. Por ejemplo, un individuo diabético puede usar un biosensor para determinar el nivel de glucosa en sangre completa para ajustes en la dieta y/o medicación.

Los biosensores pueden estar diseñados para analizar uno o más analitos y pueden usar diferentes volúmenes de muestra. Algunos biosensores pueden analizar una única gota de sangre completa, tal como a partir de 0,25-15 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de volumen. Los biosensores pueden implementarse usando dispositivos de medición de mesa, portátiles y similares. Los dispositivos de medición portátiles pueden ser manuales y permitir la identificación y/o cuantificación de uno o más analitos en una muestra. Los ejemplos de dispositivos de medición portátiles incluyen los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer HealthCare en Tarrytown, Nueva York, aunque los ejemplos de dispositivos de medición de mesa incluyen la Electrochemical Workstation disponible de CH Instruments en Austin, Texas. Los biosensores que proporcionan tiempos de análisis más cortos, aunque suministran la exactitud y/o precisión deseadas, proporcionan un beneficio sustancial al usuario.

En los biosensores electroquímicos, la concentración de analito se determina a partir de una señal eléctrica generada mediante una reacción de oxidación/reducción o redox del analito o una especie que responde al analito cuando se aplica una señal de entrada a la muestra. La señal de entrada puede aplicarse como un único pulso o en múltiples pulsos, secuencias o ciclos. Una oxidorreductasa, tal como una enzima o especie similar, puede añadirse a la muestra para potenciar la transferencia de electrones desde una primera especie a una segunda especie durante la reacción redox. La enzima o especie similar puede reaccionar con un único analito, proporcionando así especificidad a una parte de la señal de salida generada.

Los biosensores electroquímicos incluyen habitualmente un dispositivo de medición que tiene contactos eléctricos que se conectan con conductores eléctricos en la tira de detección. En cualquier caso, la tira de detección puede estar adaptada para su uso fuera, dentro o parcialmente dentro de un organismo vivo. Cuando se usa fuera de un organismo vivo, se introduce una muestra del fluido biológico en un depósito de muestra en la tira de detección. La tira de detección puede situarse en el dispositivo de medición antes de, después de o durante la introducción de la muestra para su análisis. Cuando está dentro o parcialmente dentro de un organismo vivo, la tira de detección puede sumergirse de manera continua en la muestra o la muestra puede introducirse de manera intermitente en la tira. La tira de detección puede incluir un depósito que aísla parcialmente un volumen de la muestra o puede estar abierta hacia la muestra. De manera similar, la muestra puede fluir de manera continua a través de la tira o puede interrumpirse para su análisis.

Para los biosensores electroquímicos, los conductores pueden estar hechos de materiales conductores, tales como metales sólidos, pastas metálicas, carbono conductor, pastas de carbono conductor, polímeros conductores y similares. Los conductores eléctricos se conectan normalmente con electrodos de trabajo, contraelectrodos, electrodos de referencia y/u otros, que se extienden al interior de un depósito de muestra. Uno o más conductores eléctricos pueden extenderse también al interior del depósito de muestra para proporcionar una funcionalidad no proporcionada por los electrodos.

La tira de detección puede estar formada disponiendo o imprimiendo electrodos sobre un sustrato aislante usando múltiples técnicas, tales como las descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 6.531.040; 5.798.031; y 5.120.420. Los electrodos pueden formarse disponiendo una o más composiciones reactivas sobre uno o más de los conductores. Más de uno de los conductores puede estar recubierto con la misma composición reactiva, tal como cuando los electrodos de trabajo y contraelectrodos están recubiertos con la misma composición. Pueden disponerse diferentes composiciones reactivas sobre los conductores. Por tanto, la composición reactiva del electrodo de trabajo puede contener la enzima, el mediador y un aglutinante, mientras que la composición reactiva del contraelectrodo contiene un mediador, que puede ser el mismo o diferente del mediador del electrodo de trabajo, y un aglutinante.

La composición reactiva puede incluir un agente ionizante para facilitar la oxidación o reducción del analito, tal como una oxidorreductasa, así como cualquier mediador u otra sustancia que ayude en la transferencia de electrones entre el analito y el electrodo de trabajo. Además de aglutinar los reactivos entre sí, el aglutinante puede ayudar en la filtración de glóbulos rojos, impidiendo que recubran la superficie conductora, y la estabilización de la oxidorreductasa, por ejemplo.

Pueden usarse múltiples técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica para disponer la composición reactiva sobre la tira de detección. La composición reactiva puede disponerse sobre los conductores y entonces secarse. Cuando se introduce la muestra en la tira de detección, la composición reactiva empieza a rehidratarse. Cuanto más rápido se rehidrate la composición reactiva, más rápidamente puede obtenerse una señal de salida a partir de la concentración del analito en la muestra. Cuanto antes se obtenga una señal de salida a partir de la tira de detección, a partir de la que puede determinarse de manera exacta la concentración del analito, antes puede completarse el análisis. Por tanto, biosensores que incluyen composiciones reactivas que proporcionan tiempos de análisis más cortos, al tiempo que suministran la exactitud y/o precisión deseadas, pueden proporcionar un beneficio sustancial al usuario.

Algunos documentos de la técnica anterior dan a conocer el uso de estructuras mesoporosas o macroporosas en un sensor de detección, tal como WO 2006/132294 A1 y US 2007/0135698 A1.

## Sumario

Se da a conocer una composición reactiva para una tira de detección de biosensor que proporciona una rápida rehidratación tras el secado. La composición incluye partículas porosas y está formada preferiblemente como suspensión coloidal. La composición secada puede proporcionar una salida analíticamente útil de la tira de detección en un periodo de tiempo más corto que el observado a partir de las composiciones secadas usando partículas sólidas. La señal de salida de las composiciones de partículas porosas puede correlacionarse con la concentración de analito de una muestra en el plazo de aproximadamente tres segundos, preferiblemente en el plazo de aproximadamente dos segundos o menos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición reactiva para determinar la concentración de un analito en una muestra según la reivindicación 1. En las reivindicaciones dependientes se describen realizaciones adicionales.

Además, la presente invención proporciona también una tira de detección de biosensor según la reivindicación 9.

Por otro lado, aunque no se reivindica, se describe una tira de detección de biosensor para determinar la concentración de un analito en una muestra, que incluye una base de detección cubierta al menos parcialmente por una tapa; al menos un depósito formado por la base de detección, en la que el al menos un depósito encierra al menos dos conductores dispuestos sobre la base; al menos una composición reactiva sobre al menos uno de los conductores para formar un electrodo de trabajo, incluyendo la al menos una composición reactiva de aproximadamente 0,1 unidades activas a aproximadamente 10 unidades activas de al menos un sistema enzimático por microlitro de la al menos una composición reactiva; aproximadamente del 0,5% a aproximadamente el 10% (p/p) de al menos un mediador; y al menos un material polimérico, en la que el depósito y la al menos una composición reactiva proporcionan un rendimiento cinético máximo de una reacción redox de un analito con la al menos una composición reactiva en el plazo de menos de aproximadamente tres segundos de la introducción de una muestra en la tira de detección, y en la que el rendimiento cinético máximo se determina con una secuencia de pulsos amperométricos habilitada que tiene al menos cinco ciclos de servicio, y en la que cada excitación de los ciclos de servicio tiene 0,4 segundos de duración, cada relajación de los ciclos de servicio tiene un segundo de duración, las relajaciones se proporcionan mediante un circuito abierto, se miden al menos tres valores de corriente de salida durante cada excitación, las excitaciones tienen un potencial sustancialmente constante de 250 mV y la temperatura de la muestra es de 23°C.

Aunque no se reivindica, se da a conocer un sistema de biosensor para determinar la concentración de un analito en una muestra, que incluye un medio de soporte para soportar al menos dos conductores; un medio de reacción para realizar de manera selectiva una reacción redox en un analito, en la que el medio de reacción incluye al menos un material polimérico; un medio de medición para medir una tasa de redox del analito, en el que el medio de medición incluye al menos dos conductores; y en el que el medio de medición mide una tasa de la reacción redox a un rendimiento cinético máximo en el plazo de menos de aproximadamente tres segundos desde la introducción de una muestra en el medio de reacción, y en el que el rendimiento cinético máximo se determina con una secuencia de pulsos amperométricos habilitada que tiene al menos cinco ciclos de servicio, y en el que cada excitación de los ciclos de servicio tiene 0,4 segundos de duración, cada relajación de los ciclos de servicio tiene un segundo de duración, las relajaciones se proporcionan mediante un circuito abierto, se miden al menos tres valores de corriente de salida durante cada excitación, las excitaciones tienen un potencial sustancialmente constante de 250 mV y la temperatura de la muestra es de 23°C.

Aunque no se reivindica, se describe un método de determinación de la concentración de un analito en una muestra, que incluye introducir una muestra acuosa que incluye al menos un analito en una composición reactiva, incluyendo la composición reactiva partículas porosas que tienen un diámetro promedio de desde 0,05 micrómetros hasta 10 micrómetros y un volumen de huecos de al menos el 20% (v/v), y al menos un material polimérico; rehidratar la  
 5 composición reactiva con la muestra acuosa; aplicar una señal de entrada a la muestra acuosa; medir al menos un valor de corriente de señal de salida dentro de aproximadamente 0,4 hasta a aproximadamente 5 segundos desde la introducción de la muestra acuosa en la composición reactiva; y determinar la concentración del al menos un analito en la muestra acuosa a partir del al menos un valor de corriente de señal de salida.

10 Otros sistemas, métodos, características y ventajas de la invención serán, o resultarán, evidentes para un experto en la técnica tras el examen de las siguientes figuras y descripción detallada. Se pretende que todos de tales sistemas, métodos, características y ventajas adicionales estén incluidos en esta descripción, estén dentro del alcance de la invención y estén protegidos por las reivindicaciones que siguen.

### 15 **Breve descripción de los dibujos**

La invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, poniéndose énfasis en su lugar en ilustrar los principios de la invención.

20 La Figura 1A es una representación en perspectiva de una tira de detección ensamblada.

La Figura 1B es una representación de vista desde arriba de una tira de detección, con la tapa retirada.

25 La Figura 2 es una representación de vista de extremo de la tira de detección de la Figura 1B.

La Figura 3 muestra la señal de salida de una tira de biosensor que usa una composición reactiva que incluye partículas de arcilla sólidas.

30 La Figura 4 muestra la señal de salida de una tira de biosensor que usa una composición reactiva que incluye partículas de sílice porosas.

La Figura 5 es un gráfico de dosis-respuesta que muestra la respuesta a la dosis sustancialmente lineal proporcionada por la composición reactiva de partículas porosas en el plazo de aproximadamente dos segundos desde la introducción de la muestra de sangre en la tira.

35 La Figura 6 representa un método analítico electroquímico para determinar la presencia y/o concentración de un analito en una muestra que entra en contacto con una composición reactiva de partículas porosas.

40 La Figura 7 representa una representación esquemática de un biosensor que determina una concentración de analito en una muestra de un fluido biológico usando una señal de entrada amperométrica habilitada.

### **Descripción detallada**

45 Se da a conocer una composición reactiva para una tira de detección de biosensor que proporciona una rehidratación rápida tras el secado. La composición incluye partículas porosas y está formada preferiblemente como suspensión coloidal. Las partículas porosas tienen un diámetro promedio de desde 0,05 hasta 10 micrómetros, un volumen de huecos de al menos el 20% (v/v) y están hechas preferiblemente de sílice. La composición reactiva secada que incluye las partículas porosas puede proporcionar una salida analíticamente útil a partir de la tira de detección en un periodo de tiempo más corto que el observado a partir de composiciones reactivas secadas que usan partículas sólidas.  
 50 La composición reactiva que incluye las partículas porosas también puede permitir que la reacción redox entre los reactivos y el analito alcance un rendimiento cinético máximo en un periodo de tiempo más corto que el observado a partir de composiciones reactivas secadas que usan partículas sólidas.

55 La señal de salida de las composiciones reactivas que incluyen partículas porosas puede correlacionarse con la concentración de analito de una muestra en el plazo de aproximadamente dos segundos. Esto es una mejora sustancial con respecto a las tiras de detección convencionales que usan arcillas y otras partículas sólidas en la composición reactiva, que pueden requerir más de cuatro segundos para proporcionar una señal de salida para su correlación con la concentración de analito de la muestra.

60 Las Figuras 1A y 1B representan una tira de detección 100. La Figura 1A es una representación en perspectiva de la tira de detección ensamblada 100 que incluye una base de detección 110, cubierta al menos parcialmente por una tapa 120 que incluye una ventilación 130, un área de cobertura de muestra 140 y una abertura de extremo de salida 150. Un depósito parcialmente encerrado 160 está formado entre la base 110 y la tapa 120. También pueden usarse otros diseños de tira de detección.  
 65

Una muestra líquida para su análisis puede transferirse al depósito 160 introduciendo el líquido en la abertura 150. El líquido llena el depósito 160, al tiempo que se expulsa el aire contenido previamente a través de la ventilación 130. El depósito 160 puede contener una composición de retención (no mostrada) que ayuda a retener la muestra líquida en el depósito. Los ejemplos de composiciones de retención incluyen polímeros hinchables en agua, tales como carboximetilcelulosa y polietilenglicol; y matrices poliméricas porosas, tales como dextrano y poliacrilamida.

La Figura 1B representa una vista desde arriba de la tira de detección 100, con la tapa 120 retirada. Los conductores 170 y 180 pueden discurrir bajo una capa dieléctrica 190 desde una interfaz de dispositivo de medición 155 hasta un electrodo de trabajo 175 y un contraelectrodo 185, respectivamente. El electrodo de trabajo 175 y el contraelectrodo 185 pueden estar sustancialmente en el mismo plano, tal como se representa en la figura, o en diferentes planos (no mostrados). El electrodo de trabajo 175 y el contraelectrodo 185 pueden estar separados de una parte superior de la tapa 120 por al menos 100  $\mu\text{m}$ . La capa dieléctrica 190 puede cubrir parcialmente los electrodos 175, 185 y puede estar hecha de cualquier material dieléctrico adecuado, tal como un polímero aislante.

El contraelectrodo 185 puede soportar la actividad electroquímica en el electrodo de trabajo 175 de la tira de detección 100. El potencial para soportar la actividad electroquímica en el electrodo de trabajo 175 puede proporcionarse al sistema de detección formando el contraelectrodo 185 a partir de un material inerte, tal como carbono, e incluyendo una especie redox soluble, tal como un mediador de ferricianuro, dentro del depósito 160. El potencial en el contraelectrodo 185 puede ser un potencial de referencia alcanzado formando el contraelectrodo 185 a partir de un par redox, tal como Ag/AgCl, para proporcionar un electrodo de referencia-contraelectrodo combinado. Alternativamente, la tira de detección 100 puede estar dotada de un tercer conductor y electrodo (no mostrado) para proporcionar un potencial de referencia al sistema de detección.

La Figura 2 representa un diagrama de vista de extremo de la tira de detección de la Figura 1B que muestra la estructura de capas del electrodo de trabajo 175 y el contraelectrodo 185. Los conductores 170 y 180 pueden estar dispuestos directamente sobre la base 110. Opcionalmente pueden estar dispuestas capas conductoras superficiales 270 y 280 sobre los conductores 170 y 180, respectivamente. Las capas conductoras superficiales 270, 280 pueden estar hechas de los mismos o de diferentes materiales que los conductores 170, 180.

El material o materiales usados para formar los conductores 170, 180 y las capas conductoras superficiales 270, 280 pueden incluir cualquier conductor eléctrico. Los conductores eléctricos preferibles son no ionizantes, de modo que el material no experimenta una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis de la muestra. Los conductores 170, 180 incluyen preferiblemente una capa delgada de una pasta metálica o un metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre o tungsteno. Las capas conductoras superficiales 270, 280 incluyen preferiblemente carbono, oro, platino, paladio o combinaciones de los mismos. Si una capa conductora superficial no está presente en un conductor, el conductor está hecho preferiblemente de un material no ionizante.

El material conductor superficial puede depositarse sobre los conductores 170, 180 mediante cualquier medio convencional compatible con el funcionamiento de la tira de detección, incluyendo deposición en lámina, deposición química en fase de vapor, deposición en suspensión espesa y similares. En el caso de la deposición en suspensión espesa, la mezcla puede aplicarse como una tinta a los conductores 170, 180, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.798.031, por ejemplo.

Las capas reactivas 275 y 285 pueden estar dispuestas cerca de y/o sobre los conductores 170 y 180, respectivamente. El término "sobre" se define como "por encima de" y se refiere a la orientación descrita. Por ejemplo, si un primer elemento se deposita sobre al menos una parte de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está "sobre" el segundo. En otro ejemplo, si un primer elemento está presente por encima de al menos una parte de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está "sobre" el segundo. El uso del término "sobre" no excluye la presencia de sustancias entre los elementos superior e inferior que se describen. Por ejemplo, un primer elemento puede tener un recubrimiento por encima de su superficie superior, pero un segundo elemento sobre al menos una parte del primer elemento y su recubrimiento superior puede describirse como "sobre" el primer elemento. Por tanto, el uso del término "sobre" puede significar o no que los dos elementos relacionados estén en contacto físico.

Las capas reactivas 275 y 285 están formadas a partir de al menos una composición reactiva que incluye reactivos y un aglutinante. El aglutinante incluye partículas porosas sustancialmente insolubles en agua y al menos un material polimérico que es sustancialmente soluble en agua. Las partículas porosas proporcionan una estructura física adicional al material polimérico. El aglutinante puede formar un gel o material similar al gel cuando se hidrata mediante la muestra. Una capa opcional 290 puede estar dispuesta sobre el conductor 170 y/o el conductor superficial 270. La capa opcional 290 puede carecer de uno o más constituyentes de la capa reactiva 275.

Las capas reactivas 275 y 285 pueden incluir los mismos o diferentes reactivos. Cuando se incluyen los mismos reactivos, las capas reactivas 275 y 285 pueden ser la misma capa. Cuando se incluyen diferentes reactivos, los reactivos presentes en la primera fase 275 pueden seleccionarse para su uso con el electrodo de trabajo 175, mientras que los reactivos presentes en la segunda capa 285 pueden seleccionarse para su uso con el contraelectrodo 185. Por ejemplo, los reactivos en la capa 285 pueden incluir un mediador para facilitar el flujo libre

de electrones entre la muestra y el conductor 180. De manera similar, los reactivos en la capa 275 pueden incluir un sistema enzimático y opcionalmente un mediador para facilitar la reacción del analito.

5 El sistema enzimático incluido en la capa reactiva 275 puede ser específico para el analito y puede facilitar la reacción del analito, al tiempo que potencia la especificidad del sistema de detección con respecto al analito, especialmente en muestras biológicas complejas. El sistema enzimático puede incluir uno o más de enzima, cofactor y/u otro resto que participa en una reacción redox con el analito. Por ejemplo, una alcohol oxidasa puede usarse para proporcionar una tira de detección que es sensible a la presencia de alcohol en una muestra. Un sistema de este tipo puede ser útil en la medición de concentraciones de alcohol en sangre. En otro ejemplo, puede usarse  
10 glucosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa para proporcionar una tira de detección que es sensible a la presencia de glucosa en una muestra. Este sistema puede ser útil en la medición de concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo en pacientes de los que se conoce o se sospecha que tienen diabetes.

15 Las capas reactivas 275, 285 pueden depositarse mediante cualquier medio conveniente, tales como impresión, deposición líquida o deposición por chorro de tinta. Factores, tales como la viscosidad del material que está aplicándose así como la combinación de tamaño de malla y emulsión, pueden afectar al grosor resultante de las capas reactivas 275, 285. Cuando se prefieren capas reactivas más delgadas, pueden usarse métodos de deposición distintos de la impresión, tal como micropipeteo, aplicación por chorro de tinta o deposición pin. Estos métodos de deposición proporcionan generalmente a las capas reactivas secas un grosor micrométrico o  
20 submicrométrico, tal como 1 -10  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, los métodos de deposición pin pueden proporcionar grosores de capa reactiva promedio de 1  $\mu\text{m}$ . El grosor de la capa reactiva que resulta de deposición pin, por ejemplo, puede controlarse mediante la cantidad de material polimérico y de partículas porosas incluidas en la composición reactiva, proporcionando contenidos en aglutinante mayores capas reactivas más gruesas.

25 Tras la deposición sobre la tira de detección, la composición reactiva puede secarse para formar las capas reactivas 275, 285. Durante el secado, se cree que las partículas porosas mantienen espacio entre los constituyentes de la suspensión y reducen la tendencia de la composición para crear una estructura empaquetada estrechamente, por tanto, formando una estructura similar es las características físicas a una esponja. Con la rehidratación, el agua y el analito, tal como glucosa, pueden entrar rápidamente en los poros para rehidratar la composición. Se cree que los  
30 poros de las partículas proporcionan que el agua acceda a las regiones interiores de la composición secada más rápidamente que cuando se usa un material no poroso. Por tanto, la estructura física y los constituyentes en la composición reactiva secada afectan a la velocidad a la que una muestra acuosa puede rehidratar la una o más capas reactivas de la tira de detección.

35 Además de proporcionar trayectorias a través de la composición reactiva secada, los poros también pueden aumentar sustancialmente el área superficial de uno o más de los constituyentes reactivos con los que entra inicialmente en contacto la muestra. Por ejemplo, el mediador se expondría más rápidamente a la muestra adsorbiendo el mediador por todos los poros de las partículas en vez de secando el mediador en el exterior de partículas sólidas.

40 Se cree que o bien las trayectorias a través y/o la exposición de área superficial aumentada de los reactivos de la composición reactiva secada que incluye partículas porosas pueden aumentar la velocidad a la que los reactivos de la composición reactiva se rehidratan para proporcionar una señal de salida para correlacionarse con la concentración de analito de la muestra. Además, las partículas porosas pueden prolongar la vida útil de  
45 almacenamiento de las tiras de detección reduciendo la separación de algunos de los constituyentes de composición reactiva. Se cree que esta reducción en la separación de constituyentes estabiliza mejor el sistema enzimático activo, reduciendo así la desnaturalización.

50 Puede proporcionarse una composición reactiva preferida combinando las partículas porosas sustancialmente insolubles, un material polimérico, un tampón, un tensioactivo, un mediador y un sistema enzimático. También pueden proporcionarse composiciones reactivas preferidas que excluyen uno o ambos del mediador y el sistema enzimático. Entonces puede añadirse agua para formar una suspensión coloidal que tiene la estabilidad deseada. La composición reactiva puede incluir menos constituyentes o constituyentes adicionales.

55 La composición reactiva incluye preferiblemente desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 30% (p/p) de una suspensión de aproximadamente al 20 a aproximadamente al 50% (p/p) de las partículas porosas en agua. Más preferiblemente, la composición incluye desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 15% de una suspensión de aproximadamente al 20 a una aproximadamente al 35% (p/p) de las partículas porosas en agua. En la actualidad, una composición reactiva especialmente preferida incluye desde aproximadamente el 4 hasta  
60 aproximadamente el 8% de una suspensión de aproximadamente al 23 a una aproximadamente al 28% (p/p) de las partículas porosas en agua. Preferiblemente, se mantiene una razón de aproximadamente 1:10 (p/p) entre la suspensión de partículas porosas y el material polimérico. Pueden usarse otras razones para proporcionar diferentes viscosidades a la composición reactiva. Se cree que el cambio en la morfología del coloide proporcionado por las razones variables de partículas porosas con respecto al material polimérico puede atribuirse a los efectos de unión  
65 del hidrógeno.

Las partículas porosas preferibles para su inclusión en la composición reactiva incluyen partículas porosas que tienen diámetros de partícula promedio preferiblemente de desde 0,05 hasta 10 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), más preferiblemente desde 0,1 hasta 5  $\mu\text{m}$ . En la actualidad, diámetros promedio especialmente preferidos para las partículas porosas son de desde 0,1 hasta 0,5  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, una mezcla de partículas porosas que tienen diámetros promedio de desde 0,1 hasta 1  $\mu\text{m}$ , con un diámetro promedio de 0,3  $\mu\text{m}$  para la mezcla, se preferiría especialmente en la actualidad. Las partículas porosas están hechas de uno o más materiales. Los diámetros de partícula pueden determinarse usando dispersión por láser, tal como con un instrumento LA930 disponible de Horiba Instruments, Inc., Irvine, CA.

Preferiblemente, las partículas porosas para su inclusión en la composición reactiva tienen volúmenes de huecos de al menos el 20% (v/v) y más preferiblemente, al menos el 40% (v/v). En la actualidad, las partículas especialmente preferidas tienen volúmenes de huecos de al menos el 65% (v/v). El volumen de huecos de una partícula o partículas porosas puede determinarse determinando el volumen retenido dentro de los poros de la partícula en relación con el volumen de la partícula, tal como puede determinarse mediante adsorción de gas (por ejemplo porosimetría con nitrógeno BJH) o porosimetría con mercurio.

Las partículas pueden tener un volumen de poros promedio de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1 mililitro por gramo (ml/g), más preferiblemente desde aproximadamente 0,65 hasta aproximadamente 0,85 ml/g. Preferiblemente, al menos aproximadamente 0,5 centímetros cúbicos por gramo (cc/g), más preferiblemente al menos aproximadamente 0,7 cc/g o 0,9 cc/g, del volumen de poro es de poros que tienen un tamaño de poro de 600 angstroms (Å) o menos. Estos volúmenes de poro derivados de la viscosidad pueden determinarse tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.841.609, por ejemplo. En la actualidad, las partículas porosas especialmente preferidas tienen al menos el 80% del volumen de poro de poros que tienen tamaños de poro de menos de 300 Å. Las partículas porosas pueden tener un área superficial promedio de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 metros<sup>2</sup> por gramo (m<sup>2</sup>/g), más preferiblemente desde aproximadamente 140 hasta aproximadamente 180 m<sup>2</sup>/g. En la actualidad, se prefieren especialmente las partículas porosas que tienen un área superficial promedio de desde aproximadamente 155 hasta aproximadamente 175 m<sup>2</sup>/g, tal como las suspensiones espesas porosas de sílice SYLOJET 733A (aniónica) o 733C (catiónica) de Grace Davison, Columbia, MD.

Aunque el material a partir del que están hechas las partículas porosas puede ser cualquier material compatible con la deposición y el análisis que sea sustancialmente insoluble en disoluciones acuosas, en el presente documento se prefieren partículas hechas de componentes inorgánicos, tales como sílice y zeolita. En el presente documento se prefiere más la sílice. Se prefieren los materiales que permiten a las partículas porosas soportar una carga en medios acuosos. El material puede proporcionar una carga negativa, tal como sílice, o una carga positiva, tal como una zeolita. También puede modificarse la sílice para proporcionar una carga positiva, tal como potenciales zeta de al menos +20 mV o más preferiblemente al menos +40 mV. Preferiblemente, el diámetro promedio y el material a partir del que están hechas las partículas porosas proporcionan la formación de un coloide cuando se suspenden las partículas en agua. Además de componentes inorgánicos, también pueden usarse materiales orgánicos, cerámicos y otros materiales que sean sustancialmente insolubles en agua.

A diferencia de los otros componentes de la composición reactiva, tal como polímeros sustancialmente solubles en agua, tampones, tensioactivos, mediadores solubles en agua y el sistema enzimático, las partículas porosas son sustancialmente insolubles en agua. Las disoluciones, a diferencia de las suspensiones coloidales, carecen de una interfaz identificable entre las moléculas solubilizadas y el disolvente. En disoluciones, las moléculas solubilizadas están en contacto directo con el disolvente, mientras que en suspensiones coloidales, es la superficie de las partículas la que está en contacto directo con el líquido portador. Por tanto, el líquido portador no solubiliza las partículas porosas que constituyen un coloide; en su lugar, el líquido portador "porta" las partículas. Al portar las partículas, se obtiene como resultado una suspensión.

Las interfaces entre las partículas porosas suspendidas, y el líquido portador o mezcla de líquidos portadores en las que residen, desempeñan un papel dominante a la hora de determinar el comportamiento y las capacidades de la suspensión coloidal que forma la composición reactiva. Se considera que las suspensiones coloidales son estables si las partículas que forman el coloide están separadas o desfloculadas, por ejemplo, no están agregadas ni floculadas. En general, el término estabilidad en relación con suspensiones coloidales se refiere a la resistencia de la suspensión al cambio en el tiempo.

Se cree que fuerzas de atracción de largo alcance, tales como fuerzas de van der Waals, tiran de las partículas juntándolas. Cuando se tira de las partículas coloidales juntándolas, la suspensión coloidal se desestabiliza. Esta desestabilización se denomina a menudo agregación o floculación y puede dar como resultado la precipitación de las partículas agregadas desde la suspensión coloidal. Alternativamente, se cree que interacciones coulombicas, estéricas y otras repulsivas repelen las partículas coloidales entre sí. Si las partículas no pueden agregarse entre sí, se aumenta la estabilidad de la suspensión coloidal y puede reducirse la floculación. Una suspensión coloidal está estabilizada frente a la floculación cuando al menos el 90% (p/p) de las partículas pueden observarse como individuales, en vez de agregadas en grupos de dos o más. Esta determinación se hace diluyendo la suspensión hasta 1 parte por millón de partículas, poniendo la suspensión diluida sobre un portaobjetos, y observando mediante microscopía óptica.

Preferiblemente, la composición reactiva está formada como una suspensión coloidal con cantidades variables de las partículas porosas en agua. Más preferiblemente, la composición reactiva está formada como una suspensión coloidal estabilizada frente a la floculación. La cantidad preferida de partículas que debe añadirse para formar una suspensión coloidal para proporcionar la viscosidad deseada para la composición reactiva depende de la naturaleza de las partículas, la polaridad del líquido portador, y la carga portada por las partículas al pH de la composición reactiva. Además de la cantidad de adición de partículas y las cantidades y la naturaleza de los otros constituyentes de composición reactiva, el material o materiales a partir de los que se forman las partículas también pueden cambiarse para producir menos o más estabilización a cantidades volumétricas similares, dependiendo del líquido portador.

La composición reactiva incluye preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 10% (p/p) de un material polimérico, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,8 hasta aproximadamente el 3% (p/p). En la actualidad, una composición reactiva especialmente preferida incluye desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 1,5% (p/p) del material polimérico. Materiales poliméricos sustancialmente solubles en agua adecuados para su uso como aglutinante pueden incluir poli(óxido de etileno) (PEO), carboximetilcelulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), etilhidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, tales como polilisina, poli(sulfonato de estireno), gelatina, ácido acrílico, ácido metacrílico, sales de anhídrido maleico de los mismos, derivados de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los materiales poliméricos incluyen monómeros, prepolímeros y otros materiales que forman o presentan unidades de repetición. Pueden usarse otros materiales poliméricos.

Entre estos materiales poliméricos, se prefieren PEO, PVA, CMC y HEC, prefiriéndose más PVA en la actualidad. Para el PVA, se prefieren pesos moleculares promedio en peso (PM) de desde aproximadamente 8.000 hasta aproximadamente 1.000.000, prefiriéndose más PM de desde aproximadamente 15.000 hasta aproximadamente 250.000. En la actualidad, se prefiere especialmente el PVA que tiene un PM de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 50.000.

La composición reactiva incluye preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 1% (p/p) de un tensioactivo, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 0,5% (p/p). En la actualidad, se prefiere especialmente desde aproximadamente el 0,03 hasta aproximadamente el 0,2% (p/p) de un tensioactivo. El tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo que ayude en la formación de una suspensión coloidal de la viscosidad y la estabilidad deseadas y que sea compatible con el método de deposición y el análisis. En la actualidad, se prefieren tensioactivos a base de sacáridos, tales como N-octanoil-N-metil-D-glucamina (vendida como MEGA 8 y disponible de DOJINDO, Gaithersburg, MD). Este tensioactivo incluye aproximadamente ocho unidades de oxietileno por molécula, por ejemplo. Otros tensioactivos preferidos son los tensioactivos neutros a base de etoxilato, tales como los tensioactivos de tetrametildecinodiol de PEG-30 (SURFYNOL 485, por ejemplo, disponible de Air Products, Allentown, PA). Se prefieren los tensioactivos que aumentan la tasa de llenado de la muestra de la tira de detección y/o ayudan a estabilizar el sistema enzimático.

La composición reactiva incluye preferiblemente un tampón para mantener el pH de la suspensión coloidal desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 7,5, más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7. El pH preferido y el tampón o tampones para la composición reactiva pueden elegirse para mantener la actividad de la enzima. En el presente documento se prefieren los tampones a base de citrato, pero pueden usarse otros. La concentración de tampón introducido en la composición reactiva puede oscilar entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 milimolar (mM). Pueden usarse disoluciones de tampón que tienen otras concentraciones.

La composición reactiva puede incluir un mediador sustancialmente soluble en agua de uno o dos electrones. Los mediadores pueden separarse en dos grupos basándose en su actividad electroquímica. Los mediadores de transferencia de un electrón son restos químicos capaces de captar un electrón adicional durante las condiciones de la reacción electroquímica, mientras que los mediadores de transferencia de dos electrones son restos químicos capaces de captar dos electrones adicionales durante las condiciones de la reacción. Cuando se usa un mediador de transferencia de un electrón, tal como ferricianuro, se prefiere desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 10% (p/p), prefiriéndose más desde aproximadamente el 1,5 hasta aproximadamente el 2,5% (p/p). Los ejemplos de mediadores de transferencia de un electrón incluyen compuestos, tales como 1,1'-dimetilferroceno, ferrocianuro y ferricianuro, y hexaamina de rutenio(III) y rutenio(II).

Aunque pueden usarse otros mediadores, pueden preferirse mediadores de transferencia de dos electrones por su capacidad para transferir aproximadamente el doble de electrones desde el sistema enzimático al electrodo de trabajo para la misma cantidad molar de mediador en relación con los mediadores de transferencia de un electrón. Por tanto, en comparación con los mediadores de transferencia de un electrón, pueden usarse cantidades menores de mediadores de transferencia de dos electrones en la composición reactiva.

Los ejemplos de mediadores de transferencia de dos electrones incluyen las quinonas e hidroquinonas orgánicas, tales como fenatrolinquinona; derivados de fenotiazina y fenoxazina; 3-(fenilamino)-3H-fenoxazinas; fenotiazinas; y



7-hidroxi-9,9-dimetil-9H-acridin-2-ona y sus derivados. Los mediadores de transferencia de dos electrones preferidos incluyen 3-fenilimino-3H-fenotiazinas (PIPT) y 3-fenilimino-3H-fenoxazinas (PIPO). Mediadores de dos electrones más preferidos incluyen el ácido carboxílico o sal, tal como sales de amonio, de derivados de fenotiazina. En la actualidad, los mediadores de dos electrones especialmente preferidos incluyen ácido (E)-2-(3H-fenotiazina-3-ilidenamino)benzeno-1,4-disulfónico, ácido (E)-5-(3H-fenotiazina-3-ilidenamino)isoftálico, (E)-3-(3H-fenotiazina-3-ilidenamino)-5-carboxibenzoato de amonio y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de mediadores de dos electrones adicionales incluyen las moléculas orgánicas electroactivas descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 5.393.615; 5.498.542; y 5.520.786.

10 La composición reactiva también puede incluir un sistema enzimático sustancialmente soluble en agua que tiene un intervalo de actividad unitaria especificado por el fabricante de desde aproximadamente 0,1 unidades activas por microlitro ( $\mu\text{l}$ ) de la composición reactiva hasta aproximadamente 10 unidades activas por  $\mu\text{l}$  de la composición reactiva, más preferiblemente desde aproximadamente 1 unidad activa por  $\mu\text{l}$  de la composición reactiva hasta aproximadamente 2 unidades activas por  $\mu\text{l}$  de la composición reactiva. Como el peso sólido de la enzima requerido para proporcionar una actividad unitaria específica puede variar sustancialmente por lote de formulación y fabricante, la actividad unitaria proporcionada por el fabricante para un peso específico de la composición de enzima seca se usa preferiblemente para determinar la cantidad de adición.

20 Las enzimas preferibles para su uso en el sistema enzimático de la composición reactiva incluyen alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa,  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Los sistemas enzimáticos preferibles son independientes del oxígeno, por tanto sustancialmente no se oxidan por el oxígeno.

25 Una familia de enzimas independientes del oxígeno de este tipo es la glucosa deshidrogenasa (GDH). Usando diferentes coenzimas o cofactores, la GDH puede mediar de una manera diferente mediante diferentes mediadores. Dependiendo de su asociación con GDH, un cofactor, tal como flavín adenina dinucleótido (FAD), puede retenerse estrechamente por la enzima hospedadora, tal como en el caso de FAD-GDH; o un cofactor, tal como pirroloquinolinquinona (PQQ), puede unirse covalentemente a la enzima hospedadora, tal como con PQQ-GDH. El cofactor en cada uno de estos sistemas enzimáticos puede o bien retenerse permanentemente por la enzima hospedadora o bien la coenzima y la apoenzima puede reconstituirse antes de añadir el sistema enzimático a la composición reactiva. La coenzima también puede añadirse independientemente al resto de enzima hospedadora en la composición reactiva para ayudar a la función catalítica de la enzima hospedadora, tal como en los casos de nicotinamida adenin dinucleótido  $\text{NAD/NADH}^+$  o nicotinamida adenin dinucleótido fosfato  $\text{NADP/NADPH}^+$ .

40 Las composiciones reactivas convencionales para tiras de detección de biosensor han usado múltiples tipos de partículas sólidas insolubles en agua para ajustar la reología o viscosidad de las composiciones. Las composiciones reactivas convencionales han usado partículas de sílice sólidas que tienen sus superficies modificadas para proporcionar características tanto hidrófobas como hidrófilas, tales como las descritas en la patente estadounidense n.º 5.951.836. Las partículas sólidas que tienen interiores hidrófilos y exteriores hidrófobos modificados se rompen para exponer los interiores hidrófilos. Estas partículas sólidas, ya sean intactas o rotas, contrastan directamente con las partículas porosas descritas previamente, que incluyen poros que proporcionan un volumen interior a las partículas y no requieren modificación con potenciadores de la hidrofobicidad.

45 A diferencia de las partículas sólidas, las partículas porosas permiten que los constituyentes solubles en agua pequeños de la composición reactiva entren en la estructura de poro, al tiempo que se excluyen constituyentes solubles en agua más grandes, tales como la enzima y el material polimérico. Por tanto, durante la formación de la suspensión de composición reactiva, el mediador solubilizado en agua puede entrar en los poros. Cuando se secan, se cree que el mediador, el tampón y el tensioactivo permanecen en los poros de las partículas, mientras que el material o materiales poliméricos más grandes y el sistema enzimático residen de manera externa con respecto a los poros de las partículas.

50 La enzima y el material o materiales poliméricos tienen normalmente dimensiones por encima del intervalo de 5 nanómetros (nm), mientras que las moléculas de glucosa y de ferricianuro tienen normalmente dimensiones en el intervalo por debajo de 1 nm. Por tanto, tamaños de poro preferibles para las partículas porosas son menores de aproximadamente 5 nm. Pueden usarse otros tamaños de poro, basándose en el requerido para excluir al menos parcialmente el material o materiales poliméricos y la enzima, al tiempo que se permite que entren el mediador y el analito.

60 La Figura 3 muestra las señales de salida de tiras de detección de biosensor que incluyen muestras de sangre que tienen concentraciones de glucosa de o bien 100 o bien 400 mg/dl. El aglutinante usado para las composiciones reactivas de las tiras de detección incluía partículas de arcilla sólidas. La arcilla era una organoarcilla de bentonita de tetraalquilamonio, tal como está disponible de BENTONE EW de NL Chemicals, Bruselas, Bélgica. La entrada de señales a la tira de detección mediante el dispositivo de medición era una secuencia de pulsos amperométricos habilitada que incluía cinco excitaciones pulsadas separadas por cuatro relajaciones, tal como se describe en la

publicación de patente estadounidense 2008/0173552. Las excitaciones tenían una duración de aproximadamente 1 segundo y las relajaciones tenían una duración de aproximadamente 0,5 segundos. Se registraron ocho valores de corriente de salida durante cada excitación.

5 Para correlacionar los valores de corriente de salida de la señal de entrada con la concentración de analito de la muestra, el valor de corriente inicial a partir de la excitación es preferiblemente mayor que los que siguen en el decaimiento. Las señales de salida de las tiras de detección de la Figura 3 no mostraron un valor de corriente alto inicial que disminuye después hasta aproximadamente tres segundos después de haber introducido la muestra de sangre en la tira. Por tanto, las primeras corrientes de salida que tienen un valor de corriente inicial alto seguido por  
10 valores de corriente decrecientes se observaron en corrientes de salida 310 para la muestra de 400 mg/dl y en corrientes de salida 315 para la muestra de 100 mg/dl.

Para correlacionar los valores de corriente de salida de la señal de entrada con la concentración de analito de la muestra, diferentes concentraciones de analito de muestra también muestran preferiblemente una diferencia sustancialmente constante entre valores de corriente de señal de salida. Por tanto, la diferencia de corriente entre las muestras de glucosa 100 y 400 mg/dl de la Figura 3 preferiblemente debe ser sustancialmente la misma, siendo los valores de corriente de 400 mg/dl mayores. Sin embargo, las señales de salida de las tiras de detección de la Figura 3 no mostraron una diferencia sustancialmente constante entre los valores de corriente para las muestras de sangre de concentración de glucosa 100 y 400 mg/dl hasta que han pasado entre seis y siete segundos. Esto se observó cuando los valores de corriente iniciales de la muestra de 400 mg/dl (320, 330 y 340) se compararon con los valores de corriente iniciales de la muestra de 100 mg/dl (325, 335 y 345). A partir de la Figura 3, la diferencia de corriente entre los valores de corriente 330 y 335 era mayor que la diferencia de corriente observada entre los valores de corriente 320 y 325, estableciendo que la correlación de estos valores de corriente de salida con la concentración de analito de la muestra daría como resultado imprecisiones. No fue hasta que pasaron entre seis y  
25 siete segundos tras la introducción de la muestra en la tira de detección que se observó una diferencia sustancialmente constante entre los valores de corriente de señal de salida 340 y 345.

Preferiblemente, el valor o valores de corriente de salida correlacionados con la concentración de analito de la muestra se toman también de datos de corriente que incluyen una disminución que reflejan el rendimiento cinético máximo de la tira de detección. La cinética de la reacción redox subyacente a las corrientes de salida se ve afectada por múltiples factores. Estos factores pueden incluir la velocidad a la que la composición reactiva se rehidrata, la velocidad a la que el sistema enzimático reacciona con el analito, la velocidad a la que el sistema enzimático transfiere electrones al mediador y la velocidad a la que el mediador transfiere electrones al electrodo. De estos y otros factores cinéticos que afectan a las corrientes de salida, se cree que la velocidad a la que la composición reactiva se rehidrata tiene la mayor influencia.  
30

El rendimiento cinético máximo de la tira de detección puede alcanzarse durante una excitación de una secuencia de pulsos amperométricos habilitada cuando el valor de corriente inicial de una excitación que tiene valores de corriente decrecientes es el mayor valor de corriente inicial obtenido para las múltiples excitaciones. Preferiblemente, el rendimiento cinético máximo de una tira de detección se alcanza cuando el último valor de corriente en el tiempo obtenido para una excitación que tiene valores de corriente decrecientes es el mayor último valor de corriente en el tiempo obtenido para las múltiples excitaciones. Más preferiblemente, el rendimiento cinético máximo de una tira de detección se alcanza durante en el periodo de tiempo desde cuando el valor de corriente inicial de una excitación que tiene valores de corriente decrecientes es el mayor valor de corriente inicial obtenido para las múltiples excitaciones hasta cuando un último valor de corriente en el tiempo obtenido para la misma excitación es el mayor último valor de corriente en el tiempo obtenido para las múltiples excitaciones.  
45

La secuencia de pulsos amperométricos habilitada usada para determinar el rendimiento cinético máximo de una tira de detección incluye al menos cinco ciclos de servicio, en los que las excitaciones tienen una duración de 0,4 segundos y las relajaciones tienen una duración de un segundo, incluyen un flujo de corriente a través de la muestra y se proporcionan mediante un circuito abierto. Al menos tres valores de corriente de salida se miden durante cada excitación. La entrada de potencial en la tira de detección se mantiene sustancialmente constante, a 250 mV y la temperatura de la muestra está a 23°C.  
50

En la Figura 3, para una tira de detección que usa una composición reactiva de partículas de arcilla sólida, y que incluye una muestra de glucosa 100 mg/dl, las corrientes de salida alcanzaron un rendimiento cinético máximo durante el decaimiento de la excitación incluyendo las corrientes de salida 315, entre 3 y 4 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección. Esto se estableció ya que ambos valores de corriente, el mayor inicial y el mayor último en el tiempo, obtenidos a partir de una excitación que tiene valores de corriente decrecientes estaban presentes en las corrientes de salida 315.  
60

Sin embargo, para la tira de detección en la Figura 3 que incluye 400 mg/dl de glucosa, el mayor último valor de corriente en el tiempo obtenido de una excitación que tiene valores de corriente decrecientes era el valor de corriente 321 en las corrientes de salida 310, mientras que el mayor valor de corriente inicial era el valor de corriente 330 del siguiente decaimiento de excitación. Por tanto, para la muestra de mayor concentración de glucosa 400 mg/dl de la Figura 3, no se alcanzó el rendimiento cinético máximo hasta que habían pasado entre  
65

- aproximadamente cuatro y aproximadamente cinco segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección. Cuando el mayor valor de corriente inicial de una excitación que tiene valores de corriente decrecientes no era el valor de corriente 320, sino el valor de corriente observado posteriormente 330, la reacción no había alcanzado el rendimiento cinético máximo hasta que había pasado algo de tiempo tras tres segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección. De manera similar, como el último valor de corriente en el tiempo 322 no era el mayor observado a partir de una excitación que tiene valores de corriente decrecientes, la reacción había pasado el punto de rendimiento cinético máximo poco después de que habían pasado cinco segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección.
- 10 A diferencia de las señales de salida de las formulaciones de arcilla sólidas de la Figura 3, la Figura 4 muestra las señales de salida obtenidas de tiras de detección de biosensor que usan una composición reactiva que incluye partículas de sílice porosas, tal como se describe con respecto al ejemplo 1, a continuación. La entrada de señales en la tira de detección por el dispositivo de medición era una secuencia de pulsos amperométricos habilitada que incluye ocho excitaciones separadas por siete relajaciones, tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2008/0173552. Las excitaciones de segunda a octava tenían una duración de aproximadamente 0,4 segundos, y las relajaciones de segunda a séptima tenían una duración de aproximadamente 1 segundo. Se registraron tres valores de corriente de salida durante las excitaciones de segunda a octava.
- 20 Una diferencia sustancialmente constante entre las muestras de sangre de concentración de glucosa 100 y 300 mg/dl que incluían el 60% de hematocrito (v/v) se observó en el plazo de dos segundos para valores de corriente de salida 410 (300 mg/dl) y 415 (100 mg/dl), permitiendo determinar la concentración de glucosa de la muestra en el plazo de aproximadamente tres segundos o menos. Además, los valores de corriente iniciales registrados aproximadamente 125 milisegundos (ms) tras introducir la muestra en la tira de detección se separaron, siendo el valor de corriente inicial de 300 mg/dl de concentración superior 420 mayor que el valor de corriente inicial de 100 mg/dl 425. Los valores de corriente de excitación también disminuyeron desde la primera excitación, eliminando de manera eficaz los primeros dos segundos del análisis de la Figura 3, tiempo durante el que los valores de corriente de salida de las primeras dos excitaciones estaban aumentando. Por tanto, las señales de salida de las composiciones reactivas de partículas porosas de la Figura 4 proporcionaron valores de corriente útiles para la correlación con la concentración de glucosa de la muestra de sangre tras haber pasado aproximadamente dos segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección.
- 30 Los resultados obtenidos de la composición reactiva que incluye partículas porosas de la Figura 4 también contrastaron con los resultados obtenidos de la composición reactiva que incluye las partículas sólidas de la Figura 3, en los que durante el primer segundo de la señal de salida en la Figura 3, los valores de corriente de salida de 100 y 400 mg/dl eran prácticamente idénticos. Este resultado sugería que la reacción redox entre el analito de glucosa, el sistema enzimático y el mediador de la composición reactiva que incluye las partículas sólidas de la Figura 3 no había empezado en ningún grado sustancial hasta que habían pasado aproximadamente dos segundos tras la introducción de la muestra en la tira de detección. Se cree que este rendimiento aumentado de la composición reactiva de partículas porosas es atribuible a una disponibilidad aumentada de los reactivos para la muestra proporcionada por las partículas porosas.
- 40 Con respecto al rendimiento cinético máximo de tiras de detección que incluyen la composición reactiva de partículas porosas, los valores de corriente de salida de la Figura 4 establecieron que el rendimiento cinético máximo se obtuvo para ambas muestras de glucosa 100 y 300 mg/dl en el plazo de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 2,2 segundos tras haber introducido la muestra en la tira de detección. Esto se estableció porque los valores de corriente 430 incluían el mayor valor de corriente inicial y el último mayor valor de corriente para la muestra de 300 mg/dl, y los valores de corriente 440 incluían el mayor valor de corriente inicial y el mayor último valor de corriente para la muestra de 100 mg/dl.
- 50 A diferencia de la composición reactiva de partículas de arcilla sólida de la Figura 3, la composición reactiva de partículas porosas de la Figura 4 proporcionó un rendimiento cinético máximo en el plazo de sustancialmente el mismo periodo de tiempo de aproximadamente 2 a aproximadamente 2,2 segundos desde la introducción de la muestra para las muestras de glucosa tanto 100 como 300 mg/dl. Por tanto, la composición reactiva de partículas porosas proporcionó un rendimiento cinético máximo de la tira de detección en menos de aproximadamente tres segundos desde la introducción de la muestra, y preferiblemente en el plazo de menos de aproximadamente 2,5 segundos desde la introducción de la muestra. Más preferiblemente, se observó un rendimiento cinético máximo en el plazo de desde aproximadamente dos hasta aproximadamente 2,5 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección. Un beneficio adicional de la composición reactiva de partículas porosas es que el tiempo en el que se observa el rendimiento cinético máximo de la reacción no depende sustancialmente de la concentración de analito de la muestra, como era el caso para las composiciones reactivas de partículas de arcilla sólidas observadas en la Figura 3.
- 60 La Figura 5 es un gráfico de dosis-respuesta que muestra la respuesta a la dosis sustancialmente lineal proporcionada por la composición reactiva de partículas porosas en el plazo de aproximadamente dos segundos desde la introducción de una muestra de sangre en una tira de detección. Las muestras de sangre se prepararon extrayendo sangre de dos hombres y dos mujeres que tenían el mismo tipo de sangre en tubos heparinizados de

sodio incubados previamente a aproximadamente 23-25°C durante aproximadamente 24±2 horas. Tras la incubación, se combinó la sangre y se ajustó el nivel de hematocrito a aproximadamente el 41-43%. Entonces se dividió la sangre en seis alícuotas y se usó una disolución madre de glucosa al 20% para crear una concentración de glucosa diferente en cada alícuota.

5 Cada una de las seis alícuotas se introdujo en diez tiras de detección y los valores de corriente de salida para cada alícuota de las diez tiras de detección se promediaron y se representaron gráficamente frente a la concentración de glucosa de referencia determinada para cada alícuota en la Figura 5. Se obtuvieron valores de concentración de referencia con un instrumento de referencia, tal como el YSI 2300 STAT PLUS™ disponible de YSI Inc., Yellow Springs, Ohio. Las tiras de detección usaron una composición reactiva que incluía partículas de sílice porosas, tal como se describe con respecto al ejemplo 1, a continuación. La entrada de señales en las tiras de detección mediante el dispositivo de medición era una secuencia de pulsos amperométricos habilitada, tal como se describió previamente con respecto a la Figura 4. Las corrientes de salida seleccionadas para el promediado fueron las primeras registradas durante las excitaciones a aproximadamente 2,125, 3,5 y 5 segundos. Como se ve en los valores de  $R^2$  para cada línea, la linealidad de los valores de concentración de glucosa obtenidos de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 550 mg/dl de glucosa a los 2,125 segundos era sustancialmente equivalente, a una  $R^2$  de 0,999, a la linealidad de los valores de concentración de glucosa determinados a los 3 y 5 segundos para diferentes concentraciones de glucosa.

20 Por tanto, las tiras de detección que usan una composición reactiva que incluye partículas de sílice porosas proporcionaron valores de corriente para su correlación con la concentración de analito de las muestras en el plazo de aproximadamente 2,2 segundos o menos desde la introducción de la muestra en la tira de detección. Los periodos de tiempo preferibles para obtener valores de corriente de salida para su correlación con la concentración de analito de la muestra son menos de aproximadamente 5 segundos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 3 segundos, desde la introducción de la muestra en la tira de detección. En la actualidad, se obtienen preferiblemente valores de corriente de salida para su correlación con la concentración de analito de la muestra en el plazo de desde aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 5 segundos, más preferiblemente en el plazo de aproximadamente 1,7 a aproximadamente 2,7 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección. Preferiblemente, para el análisis de glucosa en sangre completa, los valores de concentración determinados desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 550 mg/dl de glucosa tienen un valor de correlación  $R^2$  de al menos 0,85, más preferiblemente, al menos 0,90.

La Figura 6 representa un método analítico electroquímico 600 para determinar la presencia y/o concentración de un analito en una muestra que entra en contacto con una composición reactiva que incluye partículas porosas. En 610, la muestra se introduce en el biosensor que incluye la composición reactiva de partículas porosas. En 620, una parte del analito en la muestra experimenta una reacción redox. En 630, se transfieren opcionalmente electrones desde el analito hasta un mediador. En 640, una especie medible se excita electroquímicamente con una señal de entrada. En 650, se genera y se mide una señal de salida. En 660, se permite que la muestra se relaje, y en 170, se introduce al menos un pulso de excitación adicional. En 680, la presencia y/o concentración de la muestra se determina a partir de la señal de salida, y en 690, la concentración puede presentarse visualmente, almacenarse o similar.

En 610, la muestra se introduce en la parte de detección del biosensor, tal como una tira de detección. La tira de detección incluye al menos un electrodo de trabajo y al menos un contraelectrodo. Los electrodos pueden incluir una o más capas reactivas, con al menos una capa reactiva formada a partir de una composición reactiva que incluye partículas porosas. La misma composición reactiva puede usarse en el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, o pueden usarse diferentes composiciones reactivas para facilitar el funcionamiento de los electrodos. Por ejemplo, la composición reactiva en el electrodo de trabajo puede facilitar la reacción del analito, por ejemplo sistema enzimático y mediador, mientras que la composición reactiva en el contraelectrodo puede facilitar el flujo libre de electrones entre la muestra y la superficie del electrodo, por ejemplo una especie reducible.

En 620, una parte del analito presente en la muestra se oxida o se reduce química o bioquímicamente, tal como mediante una oxidorreductasa. Esto se produce a medida que la muestra hidrata los reactivos en la composición reactiva de partículas porosas. Tras la oxidación o reducción, opcionalmente pueden transferirse electrones entre el analito y un mediador en 630. Por tanto, se forma una especie medible ionizada, tal como a partir del analito o un mediador.

En 640, una especie medible, que puede ser el analito cargado de 620 o el mediador cargado de 630, se excita (se oxida o se reduce) electroquímicamente con una señal de entrada. Las señales de entrada pueden ser señales eléctricas, tales como corriente o potencial, que están pulsadas o se activan y desactivan a una secuencia fija. La señal de entrada es una secuencia de pulsos de excitación separados por relajaciones. Durante un pulso amperométrico, el potencial eléctrico aplicado durante la excitación se aplica preferiblemente a un voltaje y una polaridad sustancialmente constantes durante toda su duración. Esto contrasta directamente con algunas excitaciones convencionales en las que el voltaje se cambia o "pasa" por múltiples potenciales de voltaje y/o polaridades durante el registro de datos.

Las señales de entrada pueden tener uno o más intervalos de pulso. Un intervalo de pulso es la suma de un pulso y la relajación que constituyen un ciclo de servicio. Cada pulso tiene una amplitud y una anchura. La amplitud indica la intensidad del potencial, la corriente o similar de la señal eléctrica. La amplitud puede variar o ser sustancialmente constante, tal como durante la amperometría, durante el pulso. La anchura de pulso es la duración de tiempo del pulso. Las anchuras de pulso en una señal de entrada pueden variar o ser sustancialmente las mismas. Cada relajación tiene una anchura de relajación, que es la duración de tiempo de la relajación. Las anchuras de relajación en una señal de entrada pueden variar o ser sustancialmente las mismas.

Ajustando la anchura de la excitación y la relajación de los ciclos de servicio, señales de entrada habilitadas pueden aumentar la exactitud y/o precisión del análisis. Las señales de entrada preferibles incluyen al menos 2, 3, 4 u 8 ciclos de servicio aplicados durante menos de 2, 3 o 5 segundos. Más preferiblemente, al menos 2 ciclos de servicio se aplican en el plazo de 3 segundos. Preferiblemente, la anchura de cada pulso de excitación se selecciona independientemente de entre 0,1 y 2 segundos y más preferiblemente de entre 0,2 y 1 segundo. En la actualidad, las anchuras de pulso de señal de entrada especialmente preferidas se seleccionan independientemente de entre 0,3 y 0,8 segundos. Los intervalos de pulso preferibles están en el intervalo de menos de 3, 2,5 o 1,5 segundos. En la actualidad, se prefieren especialmente señales de entrada que tienen anchuras de pulso de 0,3 a 0,5 segundos e intervalos de pulso de desde 0,7 hasta 2 segundos. La señal de entrada puede tener otras anchuras e intervalos de pulso.

En 650, el biosensor genera una señal de salida en respuesta a la especie medible y la señal de entrada. La señal de salida, tal como uno o más valores de corriente, puede medirse de manera continua o intermitente y puede registrarse como una función del tiempo. Las señales de salida adecuadas pueden incluir aquellas que alcanzan un estado estacionario y aquellas que son transitorias. Los valores de corriente de estado estacionario se observan cuando el cambio de corriente con respecto al tiempo es sustancialmente constante, tal como dentro del  $\pm 10$  o del  $\pm 5\%$ . Los valores de corriente transitorios disminuyen con respecto al tiempo.

En 660, la muestra experimenta relajación. El dispositivo de medición puede abrir el circuito a través de la tira de detección, permitiendo así la relajación. Durante la relajación 660, la corriente presente durante la excitación 640 se reduce sustancialmente al menos en la mitad, preferiblemente en un orden de magnitud, y más preferiblemente hasta cero. Preferiblemente, se proporciona un estado de corriente cero mediante un circuito abierto u otro método conocido por los expertos habituales en la técnica para proporcionar un flujo de corriente de sustancialmente cero. Preferiblemente, la señal de salida no se registra durante la relajación 660.

En 670, el biosensor continúa aplicando pulsos desde la señal de entrada al electrodo de trabajo y al contraelectrodo durante el periodo de tiempo deseado. El ciclo de servicio que incluye la excitación 640 y la relajación 660 puede repetirse o puede aplicarse un ciclo de servicio que tiene diferentes anchuras y/o intervalos de pulso.

En 680, el biosensor analiza un valor de corriente de señal de salida correlacionando uno o más valores de corriente con la concentración de analito de la muestra. Preferiblemente, el valor de corriente de salida que está correlacionado con la concentración de analito de la muestra se registra a partir de una excitación en la que el valor de corriente inicial es mayor que los que siguen en el decaimiento y en el plazo de menos de aproximadamente 3 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección en 610. Más preferiblemente, el valor de corriente de salida que está correlacionado con la concentración de analito de la muestra se obtiene en el plazo de menos de aproximadamente 3 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección en 610 y es el primero valor de corriente registrado a partir de una excitación en la que los valores de corriente que siguen al primer valor de corriente disminuyen. Incluso más preferiblemente, el valor de corriente de salida que está correlacionado con la concentración de analito de la muestra se obtiene en el plazo de menos de aproximadamente 3 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección en 610, es el primer valor de corriente registrado a partir de una excitación en la que los valores de corriente que siguen al primer valor de corriente disminuyen, y se obtiene durante el rendimiento cinético máximo de la tira de detección. También pueden analizarse la corriente adicional, el tiempo y/u otros valores. En 690, el valor de concentración de analito puede presentarse visualmente, almacenarse para consulta futura y/o usarse para cálculos adicionales.

La Figura 7 representa una representación esquemática de un biosensor 700 que determina una concentración de analito en una muestra de un fluido biológico usando una señal de entrada amperométrica habilitada. El biosensor 700 incluye un dispositivo de medición 702 y una tira de detección 704, que pueden implementarse en cualquier instrumento analítico, incluyendo un dispositivo de mesa, un dispositivo portátil o manual, o similar. El biosensor 700 puede utilizarse para determinar concentraciones de analito, incluyendo aquellas de glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina y similares. Aunque se muestra una configuración particular, el biosensor 700 puede tener otras configuraciones, incluyendo aquellas con componentes adicionales.

La tira de detección 704 tiene una base 706 que forma un depósito 708 y un canal 710 con una abertura 712. El depósito 708 y el canal 710 pueden cubrirse mediante una tapa con una ventilación. El depósito 708 define un volumen parcialmente encerrado. El depósito 708 puede contener una composición que ayuda a retener una muestra líquida tal como polímeros hinchables en agua o matrices poliméricas porosas. Los reactivos pueden depositarse en el depósito 708 y/o el canal 710. La composición reactiva usada para formar el electrodo de trabajo

704 incluye partículas porosas y puede incluir uno o más de sistema enzimático, mediador y especies similares. El contraelectrodo 705 puede formarse usando la misma composición reactiva o una diferente, preferiblemente una que carece de un sistema enzimático. La tira de detección 704 también puede tener una interfaz de muestra 714 dispuesta adyacente al depósito 708. La interfaz de muestra 714 puede rodear parcial o completamente el depósito 708. La tira de detección 704 puede tener otras configuraciones.

La interfaz de muestra 714 tiene conductores 709 conectados al electrodo de trabajo 704 y al contraelectrodo 705. Los electrodos pueden estar sustancialmente en el mismo plano o en más de un plano. Los electrodos 704, 705 pueden estar dispuestos sobre una superficie de la base 706 que forma el depósito 708. Los electrodos 704, 705 pueden extenderse o adentrarse en el depósito 708. Una capa dieléctrica puede cubrir parcialmente los conductores 709 y/o los electrodos 704, 705. La interfaz de muestra 714 puede tener otros electrodos y conductores.

El dispositivo de medición 702 incluye un conjunto de circuitos eléctricos 716 conectado a una interfaz de sensor 718 y un dispositivo de visualización 720. El conjunto de circuitos eléctricos 716 incluye un procesador 722 conectado a un generador de señales 724, un sensor de temperatura opcional 726 y un medio de almacenamiento 728.

El generador de señales 724 proporciona una señal de entrada eléctrica a la interfaz de sensor 718 en respuesta al procesador 722. La señal de entrada eléctrica puede transmitirse por la interfaz de sensor 718 a la interfaz de muestra 714 para aplicar la señal de entrada eléctrica a la muestra del fluido biológico. La señal de entrada eléctrica puede ser un potencial o una corriente y puede aplicarse en múltiples pulsos, secuencias o ciclos. El generador de señales 724 también puede registrar una señal de salida a partir de la interfaz de sensor como un generador-registrador.

El sensor de temperatura opcional 726 determina la temperatura de la muestra en el depósito de la tira de detección 704. La temperatura de la muestra puede medirse, calcularse a partir de la señal de salida, o asumirse que es igual o similar a una medición de la temperatura ambiental o la temperatura de un dispositivo que implementa el sistema de biosensor. La temperatura puede medirse usando un termistor, termómetro u otro dispositivo de detección de temperatura. Pueden usarse otras técnicas para determinar la temperatura de la muestra.

El medio de almacenamiento 728 puede ser un memoria magnética, óptica o semiconductor, otro dispositivo de almacenamiento o similar. El medio de almacenamiento 728 puede ser un dispositivo de memoria fijo, un dispositivo de memoria retirable, tal como una tarjeta de memoria, al que se accede de manera remota, o similar.

El procesador 722 implementa el análisis de analito y el tratamiento de datos usando un código de software legible por ordenador y datos almacenados en el medio de almacenamiento 728. El procesador 722 puede iniciar el análisis de analito en respuesta a la presencia de la tira de detección 704 en la interfaz de sensor 718, la aplicación de una muestra a la tira de detección 704, en respuesta a una entrada de usuario, o similar. El procesador 722 dirige el generador de señales 724 para proporcionar la señal de entrada eléctrica a la interfaz de sensor 718. El procesador 722 puede recibir la temperatura de la muestra desde el sensor de temperatura opcional 726. El procesador 722 recibe la señal de salida desde la interfaz de sensor 718. La señal de salida se genera en respuesta a la reacción redox del analito en el depósito 708.

El procesador 722 mide preferiblemente la señal de salida para obtener un valor de corriente a partir de una excitación en la que el valor de corriente inicial es mayor que aquellas que siguen en el decaimiento y en el plazo de menos de aproximadamente 3 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección 704. Más preferiblemente, el procesador 722 mide la señal de salida para obtener un valor de corriente en el plazo de menos de aproximadamente 3 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección en 704 y obtiene el primer valor de corriente registrado a partir de una excitación en la que los valores de corriente que siguen al primer valor de corriente de manera continua disminuyen. Incluso más preferiblemente, el procesador 722 mide la señal de salida para obtener un valor de corriente en el plazo de menos de aproximadamente 3 segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección en 704, para obtener el primer valor de corriente registrado a partir de una excitación en la que los valores de corriente que siguen al primer valor de corriente disminuyen de manera continua, y para obtener un valor de corriente durante el rendimiento cinético máximo de la tira de detección.

El uno o más valores de corriente obtenidos se correlacionan con la concentración de analito de la muestra usando una o más ecuaciones de correlación en el procesador 722. Los resultados del análisis de analito pueden emitirse al dispositivo de visualización 720 y pueden almacenarse en el medio de almacenamiento 728. Preferiblemente, los resultados del análisis de analito se emiten al dispositivo de visualización 720 en el plazo de como máximo cinco segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección, más preferiblemente los resultados se emiten al dispositivo de visualización 720 en el plazo de como máximo tres segundos desde la introducción de la muestra en la tira de detección.

Las ecuaciones de correlación que relacionan concentraciones de analito y valores de corriente de salida pueden representarse gráficamente, matemáticamente, una combinación de las mismas, o similares. Las ecuaciones de correlación pueden representarse mediante una tabla de números de programa (PNA), otra tabla de consulta o similar que se almacena en el medio de almacenamiento 728. Pueden proporcionarse instrucciones relativas a la

implementación del análisis de analito mediante el código de software legible por ordenador almacenado en el medio de almacenamiento 728. El código puede ser código objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad descrita en el presente documento. Los datos del análisis de analito pueden someterse a uno o más tratamientos de datos, incluyendo la determinación de tasas de decaimiento, constantes K, razones y similares en el procesador 722.

La interfaz de sensor 718 tiene contactos que se conectan o se comunican eléctricamente con los conductores 709 en la interfaz de muestra 714 de la tira de detección 704. La interfaz de sensor 718 transmite la señal de entrada eléctrica desde el generador de señales 724 a través de los contactos a los conductores 709 en la interfaz de muestra 714. La interfaz de sensor 718 también transmite la señal de salida desde la muestra a través de los contactos al procesador 722 y/o generador de señales 724.

El dispositivo de visualización 720 puede ser analógico o digital. El dispositivo de visualización puede ser un LCD adaptado para presentar visualmente una lectura numérica.

En uso, una muestra para su análisis se transfiere al depósito 708 introduciendo la muestra en la abertura 712. La muestra fluye a través del canal 710, llenando el depósito 708 al tiempo que expulsa el aire contenido previamente. La muestra reacciona químicamente con los reactivos depositados en el canal 710 y/o el depósito 708. Preferiblemente, la muestra es un fluido, más preferiblemente, un líquido.

La tira de detección 702 se dispone adyacente al dispositivo de medición 702. Adyacente incluye posiciones en las que la interfaz de muestra 714 está en comunicación eléctrica con la interfaz de sensor 718. La comunicación eléctrica incluye la transferencia por cable o inalámbrica de señales de entrada y/o de salida entre contactos en la interfaz de sensor 718 y los conductores 709 en la interfaz de muestra 714.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar una o más realizaciones preferidas de la invención. Pueden hacerse numerosas variaciones a los siguientes ejemplos que se encuentran dentro del alcance de la invención.

**Ejemplos**

Los constituyentes combinados para formar las siguientes composiciones reactivas se obtuvieron de múltiples fuentes. En general, PVA, ácido cítrico, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ferrocianuro de potasio y el tensioactivo MEGA 8 se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. El tensioactivo Surfynol 485 se obtuvo de Air Products, Allentown, PA. Los sistemas enzimáticos se obtuvieron de Amano Enzymes, Nagoya, Japón. La suspensión espesa de sílice de partículas porosas se obtuvo de Grace Davison, East Chicago, EN.

Ejemplo 1: Composición reactiva I

Se preparó una composición reactiva combinando los constituyentes de la tabla I, a continuación, en 38,67 g de agua. La suspensión de partículas porosas incluía aproximadamente el 25,3% de partículas porosas, tenía un pH de 7,5, un diámetro promedio de las partículas en la mezcla de aproximadamente 4 µm (D99,9 de Horiba LA-910), un volumen de poros promedio por partícula de aproximadamente 0,74 ml/g (adsorción de N<sub>2</sub>) y un área superficial promedio por partícula de aproximadamente 163 m<sup>2</sup>/g (adsorción de N<sub>2</sub>). Para los ejemplos 2-9, la suspensión espesa incluía aproximadamente el 29,9% de partículas porosas, tenía un pH de 4, un diámetro promedio de las partículas en la mezcla de aproximadamente 1,20 µm (D99,9 de Horiba LA-910) y un volumen de poros promedio por partícula de aproximadamente 0,70 ml/g (adsorción de N<sub>2</sub>).

Tabla I

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000, ~87% hidrolizado)	0,6
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (25% p/p en agua)	6
Tampón citrato 100 mM, pH = 5	50
MEGA 8 (10% p/p en agua)	2
Ferrocianuro de potasio	1,98
Sistema enzimático FAD-GDH (actividad unitaria de aproximadamente 1,5 unidades/µl de la composición reactiva)	0,75 (peso sólido obtenido del fabricante)

## ES 2 664 574 T3

### Ejemplo 2: Composición reactiva II

Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla II, a continuación, en 26,92 g de agua.

Tabla II

5

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000, ~87% hidrolizado)	0,5
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,2
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	6
Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

### Ejemplo 3: Composición reactiva III

Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla III, a continuación, en 29,18 g de agua.

10

Tabla III

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000, ~87% hidrolizado)	0,1
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Poliácido acrílico sódico (PM = 7.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	2
Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

### Ejemplo 4: Composición reactiva IV

Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla IV, a continuación, en 27,42 g de agua.

20

Tabla IV

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000)	0,05
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	1
Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

### Ejemplo 5: Composición reactiva V

Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla V, a continuación, en 27,37 g de agua.

25

Tabla V

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000)	0,1
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	1



Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

Ejemplo 6: Composición reactiva VI

5 Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla VI, a continuación, en 26,37 g de agua.

Tabla VI

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000)	0,1
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	2
Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

10 Ejemplo 7: Composición reactiva VII

Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla VII, a continuación, en 27,28 g de agua.

Tabla VII

15

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000)	0,15
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	2
Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

Ejemplo 8: Composición reactiva VIII

20 Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla VIII, a continuación, en 26,28 g de agua.

Tabla VIII

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000)	0,15
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	3
Ácido cítrico	0,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

25

Ejemplo 9: Composición reactiva IX

Se preparó una composición reactiva que carecía del sistema enzimático combinando los constituyentes de la tabla IX, a continuación, en 29,13 g de agua.

30

Tabla IX

Constituyente de composición reactiva	Peso en gramos
Poli(alcohol vinílico) (PM = 30.000-50.000)	0,15
Hidroxietilencelulosa (PM = 300.000)	0,15
Poliácido acrílico sódico (PM = 7.000)	0,15
Suspensión espesa de partículas de sílice porosas (30% p/p en agua)	2
Ácido cítrico	0,14
$K_2HPO_4$	0,26
SURFYNOL 485	0,01
Ferrocianuro de potasio	0,96

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Una composición reactiva, para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:
- 5 del 1% al 30% (p/p) de una suspensión a del 20% al 50% (p/p) de partículas porosas, teniendo las partículas un diámetro promedio de desde 0,05 micrómetros hasta 10 micrómetros y un volumen de huecos de al menos el 20% (v/v);
- 10 del 0,1% al 10% (p/p) de al menos un material polimérico; y
- de 0,1 a 10 unidades activas de al menos un sistema enzimático por microlitro de la composición reactiva.
- 2.- La composición según la reivindicación 1, que comprende además desde el 0,5% hasta el 10% (p/p) de al menos un mediador de transferencia de electrones.
- 15 3.- La composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende además desde el 0,01% hasta el 1% (p/p) de al menos un tensioactivo.
- 4.- La composición según las reivindicaciones 1 a 3, en la que las partículas porosas tienen un volumen de poros promedio de desde 0,5 hasta 1 mililitro por gramo.
- 20 5.- La composición según las reivindicaciones 1 a 4, en la que las partículas porosas tiene un área superficial promedio de desde 100 hasta 200 metros<sup>2</sup> por gramo.
- 25 6.- La composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que las partículas porosas están formadas a partir de sílice y tienen una carga superficial aniónica en agua.
- 7.- La composición según las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición tiene un pH de desde 4,5 hasta 7,5.
- 30 8.- La composición según las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además al menos un líquido portador, en la que la composición es una suspensión coloidal.
- 9.- Una tira de detección de biosensor (100), para determinar la concentración de un analito en una muestra, comprendiendo la tira de detección: una base de detección (110) cubierta al menos parcialmente por una tapa (120);
- 35 al menos un depósito (160) formado por la base de detección, en la que el al menos un depósito encierra al menos dos conductores (170, 180) dispuestos sobre la base; y una capa reactiva (275) sobre al menos uno de los conductores para formar un electrodo de trabajo (175), en la que la capa reactiva está formada a partir de al menos una composición reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 40

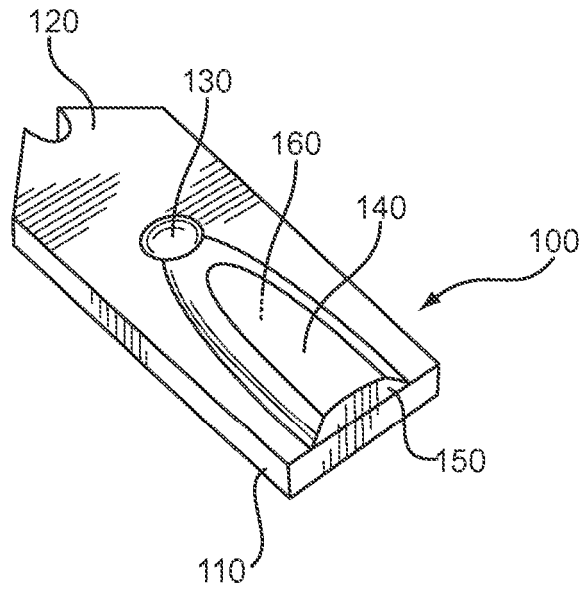


Fig. 1A

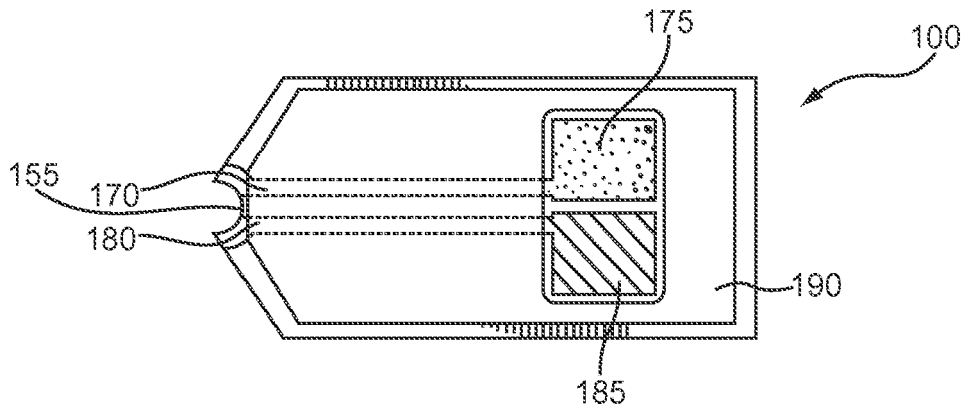


Fig. 1B

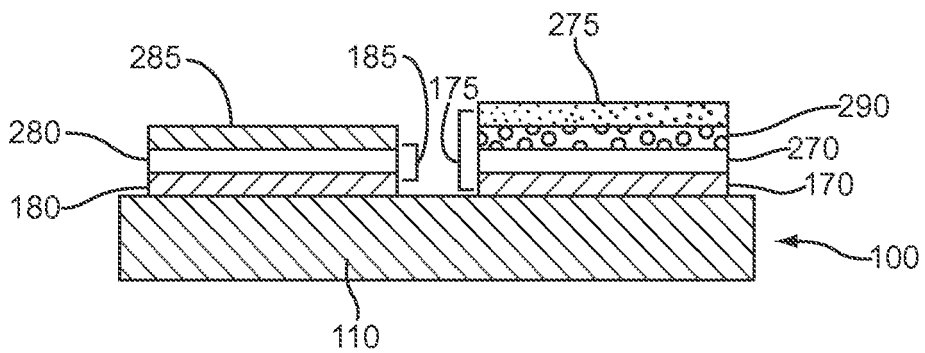


Fig. 2

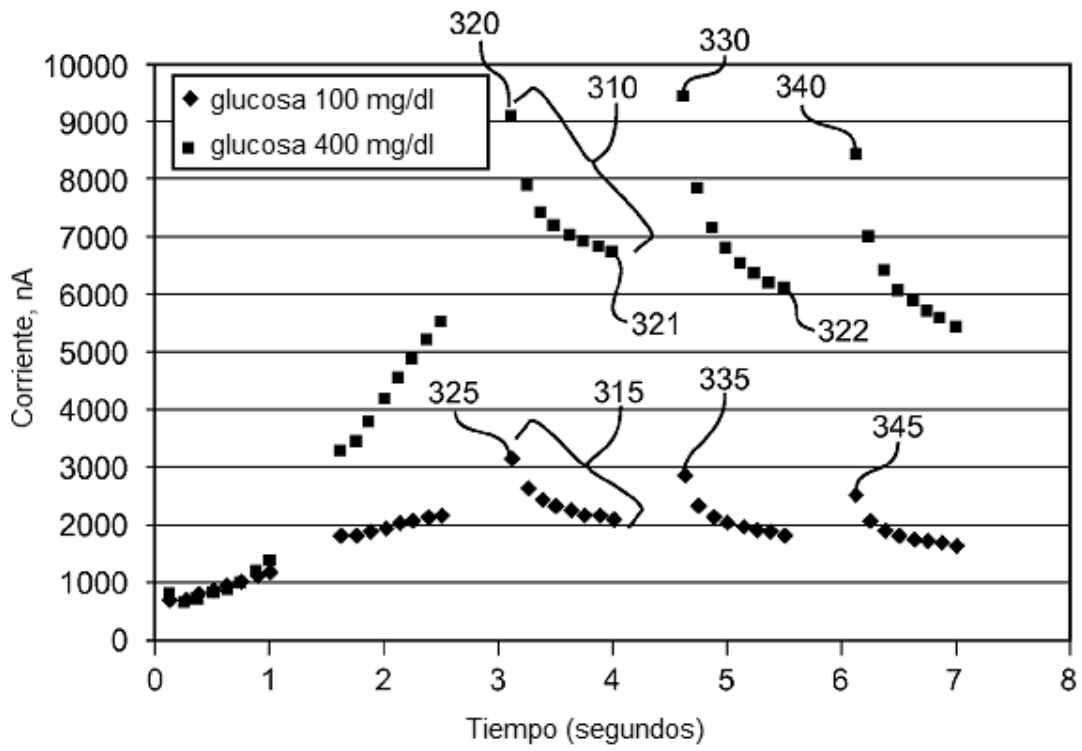


Fig.3

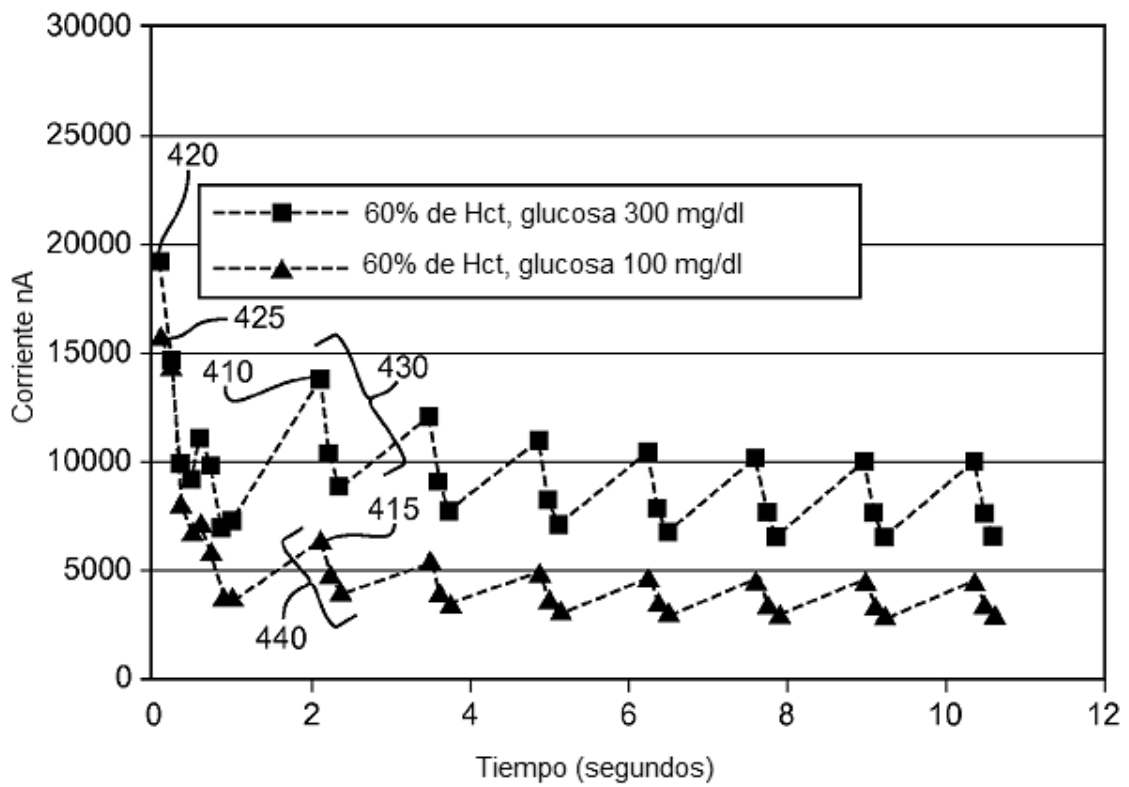


Fig.4

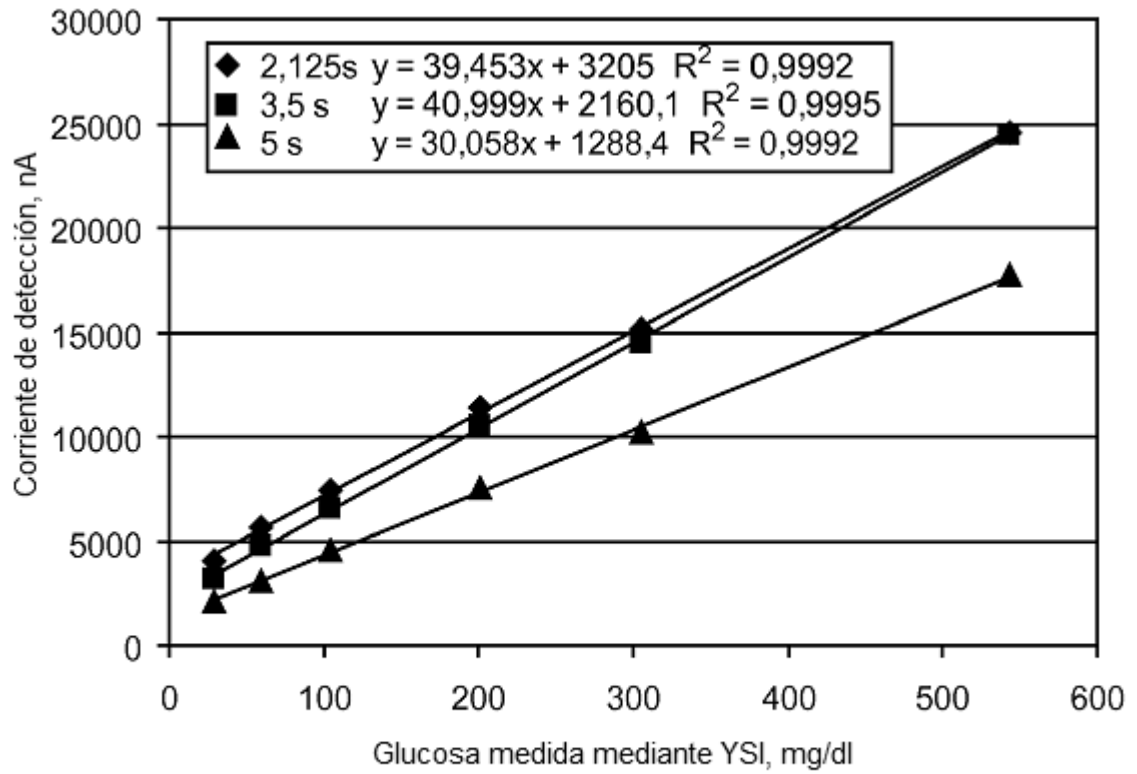


Fig.5

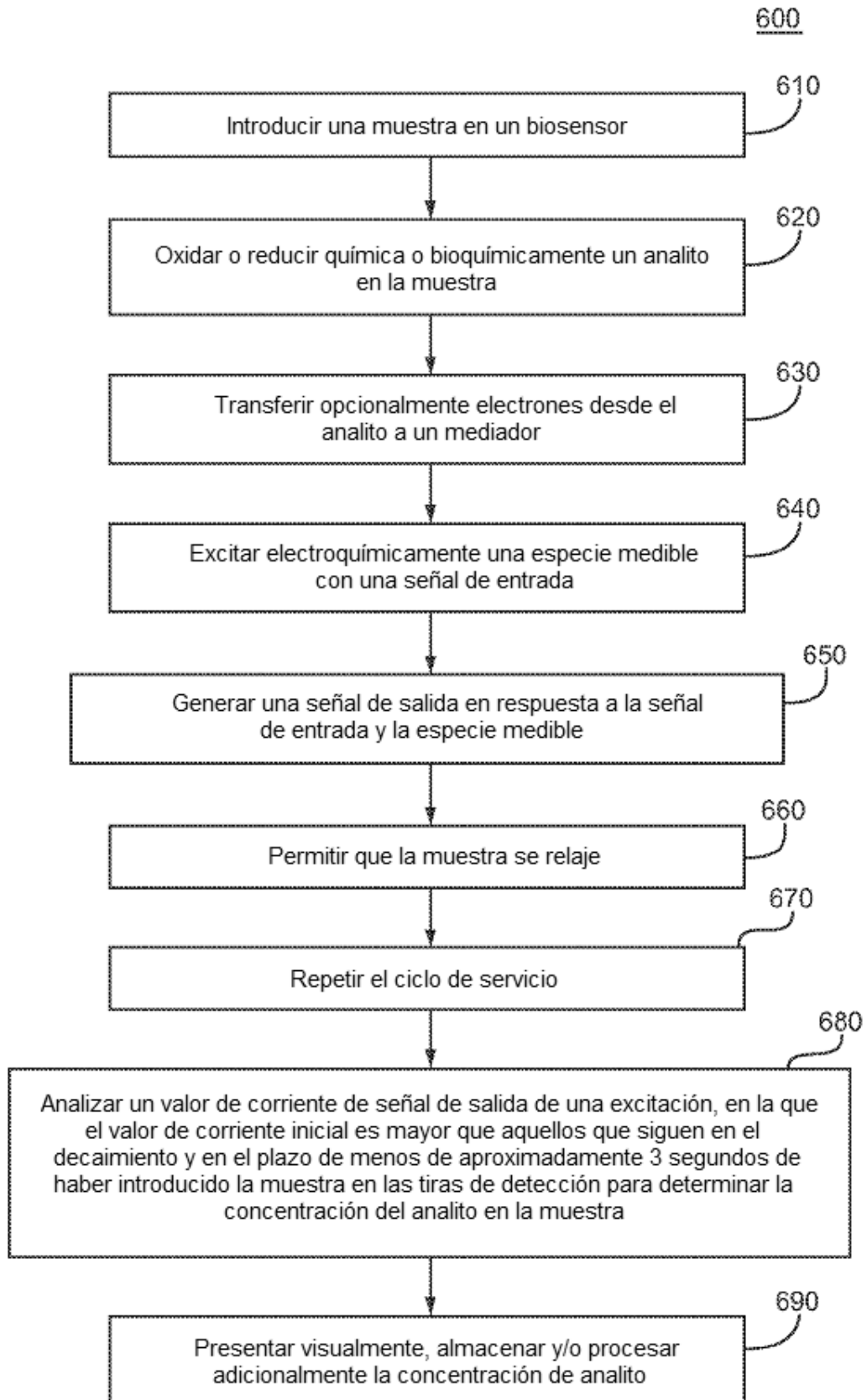


Fig. 6

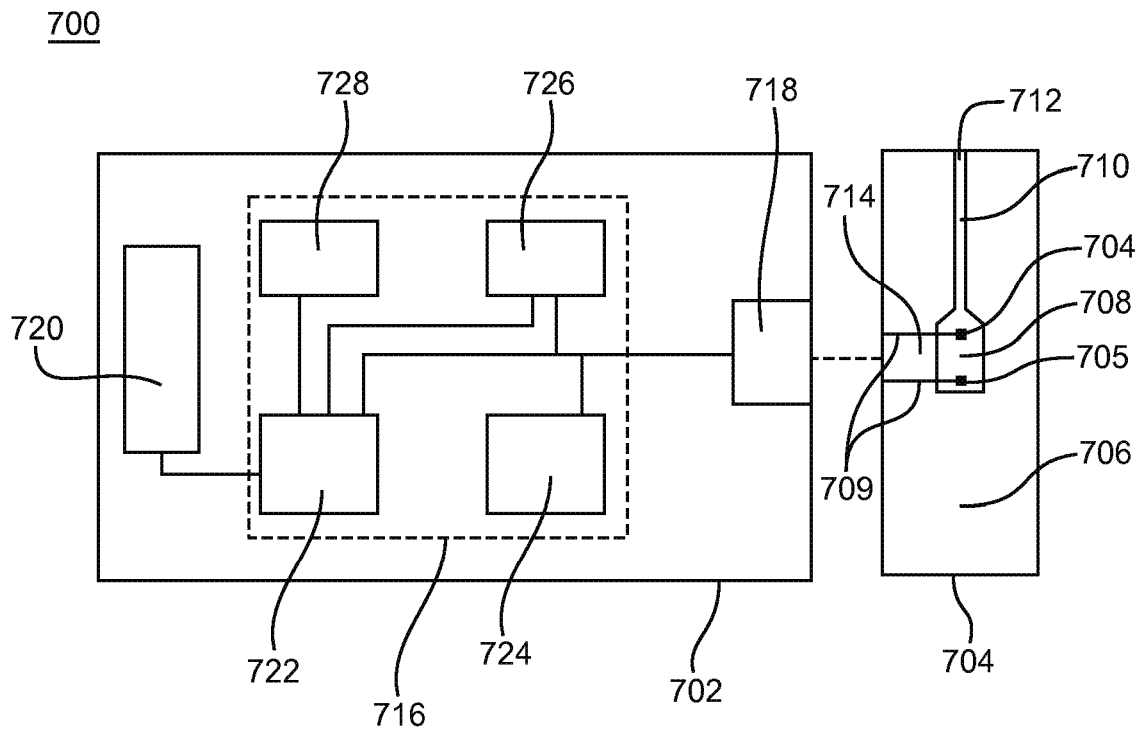


Fig. 7