

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 649**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2008 PCT/US2008/080865**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2009 WO09075951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008 E 08860137 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2222867**

54 Título: **Amperometría controlada por impulsos de lectura rápida**

30 Prioridad:

10.12.2007 US 12729

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

21.11.2018

73 Titular/es:

**ASCENSIA DIABETES CARE HOLDINGS AG
(100.0%)
Peter-Merian Strasse 90
4052 Basel , CH**

72 Inventor/es:

WU, HUAN-PING

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 690 649 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

Amperometría controlada por impulsos de lectura rápida

Antecedentes

5 Los biosensores proporcionan un análisis de un fluido biológico, tal como sangre entera, suero, plasma, orina, saliva, fluido intersticial, o intracelular. Típicamente, los biosensores tienen un dispositivo de medición que analiza una muestra que reside en una tira de sensor. La muestra está usualmente 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, tal como alcohol, glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, ácidos grasos libres, triglicéridos, proteínas, cetonas, fenilalanina o enzimas, en el fluido biológico. Los análisis pueden ser útiles en la diagnosis y tratamiento de anomalías fisiológicas. Por ejemplo, un individuo diabético puede utilizar un biosensor para determinar el nivel de glucosa en sangre entera para realizar ajustes de la dieta y/o medicación.

15 Los biosensores pueden estar diseñados para analizar uno o más analitos y pueden utilizar diferentes volúmenes de muestra. Algunos biosensores pueden analizar una única gota de sangre entera, tal como desde 0,25-15 microlitros (μ l) en volumen. Los biosensores pueden ser implementados utilizando dispositivos de medición sobre la mesa de trabajo, portátiles, y similares. Los dispositivos de medición portátiles pueden ser sostenidos en la mano y permitir la identificación y/o cuantificación de uno o más analitos en una muestra. Ejemplos de dispositivos de medición portátiles incluyen los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer HealthCare en Tarrytown, Nueva York, mientras que ejemplos de dispositivos de medición sobre la mesa de trabajo incluyen la Electrochemical Workstation disponible en CH Instruments en Austin, Texas. Los biosensores que proporcionen tiempos de análisis más cortos, al tiempo que proporcionan la exactitud y/o precisión deseadas, proporcionan un beneficio sustancial para el usuario.

25 Los biosensores pueden utilizar métodos ópticos y/o electroquímicos para analizar la muestra. En algunos sistemas ópticos, la concentración de analitos es determinada midiendo la luz que ha interactuado con una especie identificable por la luz o ha sido absorbida por ella, tal como el analito o una reacción o producto formado a partir de un indicador químico que reacciona con el analito. En otros sistemas ópticos, un indicador químico resulta fluorescente o emite luz en respuesta al analito cuando es iluminado por un haz de excitación. La luz puede ser convertida en una señal de salida eléctrica, tal como corriente o potencial, que puede ser procesada similarmente a la señal de salida a partir de un método electroquímico. En cualquier sistema óptico, el biosensor mide y correlaciona la luz con la concentración de analito de la muestra.

30 En biosensores electroquímicos, la concentración de analito es determinada a partir de una señal eléctrica generada por una reacción de oxidación/reacción o redox del analito o una especie que es sensible al analito cuando se aplica una señal de entrada a la muestra. La señal de entrada puede ser aplicada como un solo impulso o en múltiples impulsos, secuencias, o ciclos. Una oxidorreductasa, tal como una enzima o especie similar, puede ser añadida a la muestra para mejorar 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. Ejemplos de algunas oxidorreductasas específicas y analitos correspondientes están dados a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Oxidorreductasa (capa reactiva)	Analito
Glucosa dehidrogenasa	β -glucosa
Glucosa oxidasa	β -glucosa
Colesterol esterasa; colesterol oxidasa	Colesterol
Lipoproteína lipasa; glicerol kinasa; glicerol-3-fosfato oxidasa	Triglicéridos
Lactato oxidasa; lactato dehidrogenasa; diaforasa	Lactato
Piruvato oxidasa	Piruvato
Alcohol oxidasa	Alcohol
Bilirrubina oxidasa	Bilirrubina
Uricasa	Ácido úrico
Glutation oxidasa	NAD(P)H
Oxidorreductasa (capa reactiva)	Analito

Monóxido de carbono oxidorreductasa	Monóxido de carbono
-------------------------------------	---------------------

Puede utilizarse un mediador para mantener el estado de oxidación de la enzima. La Tabla II a continuación, proporciona algunas combinaciones convencionales de enzimas y mediadores para utilizar con analitos específicos.

Tabla II

Analito	Enzima	Mediador
Glucosa	Glucosa Oxidasa	Ferricianuro
Glucosa	Glucosa Dehidrogenasa	Ferricianuro
Colesterol	Colesterol Oxidasa	Ferricianuro
Lactato	Lactato Oxidasa	Ferricianuro
Ácido Úrico	Uricasa	Ferricianuro
Alcohol	Alcohol Oxidasa	Fenilendiamina

5 Los biosensores electroquímicos incluyen usualmente un dispositivo de medición que tiene contactos eléctricos que conectan con conductores eléctricos en la tira del sensor. Los conductores pueden estar hechos a partir de materiales conductores, tales como metales sólidos, pastas metálicas, carbono conductor, pastas de carbono conductor, polímeros conductores, y similares. Los conductores eléctricos típicamente conectan con electrodos de trabajo, de recuento, de referencia, y/u otros electrodos que se extienden a un depósito de muestras. Uno o más conductores eléctricos pueden también extenderse al depósito de muestras para proporcionar funcionalidad no proporcionada por los electrodos.

10 En muchos biosensores, la tira de sensor puede ser adaptada para uso exterior, interior, o parcialmente dentro de un organismo vivo. Cuando se utiliza fuera de un organismo vivo, una muestra del fluido biológico es introducida en un depósito de muestras en la tira de sensor. La tira del sensor puede ser colocada en el dispositivo de medición antes, después, o durante la introducción de la muestra para análisis. Cuando está dentro o parcialmente dentro de un organismo vivo, la tira de sensor puede ser sumergida continuamente en la muestra o la muestra puede ser introducida de forma intermitente en la tira. La tira de sensor puede incluir un depósito que aísla parcialmente un volumen de muestra o está abierta a la muestra. De manera similar, la muestra puede fluir continuamente a través de la tira o ser interrumpida para su análisis.

20 El dispositivo de medición aplica una señal de entrada a través de los contactos eléctricos a los conductores eléctricos en la tira de sensor. Los conductores eléctricos transportan la señal de entrada a través de los electrodos a la muestra presente en el depósito de muestras. La reacción redox del analito genera una señal de salida eléctrica en respuesta a la señal de entrada. La señal de salida eléctrica procedente de la tira puede ser una corriente (como generada por amperometría o voltametría), un potencial (como generado por potenciometría/galvanometría), o una carga acumulada (como generada por coulombimetría). El dispositivo de medición puede tener la capacidad de tratamiento para medir y correlacionar la señal de salida con la presencia y/o concentración de uno o más analitos en el fluido biológico.

25 En amperometría convencional, la corriente es medida durante un impulso de lectura cuando un potencial (tensión) constante es aplicado a través de los electrodos de trabajo y recuento de la tira del sensor. La corriente medida es utilizada para cuantificar el analito en la muestra. La amperometría mide la velocidad a la que una especie activa electroquímicamente, así mensurable, está siendo oxidada o reducida en o cerca del electrodo trabajo. Muchas variaciones del método amperométrico para biosensores han sido descritas, por ejemplo en las Patentes de los EE.UU de N° 5.620.579; 5.653.863; 6.153.069; y 6.413.411.

35 Una desventaja de los métodos amperométricos convencionales es la naturaleza de estado no estacionario de la corriente después de que se haya aplicado un potencial. La velocidad de cambio de corriente con respecto al tiempo es muy rápida inicialmente y resulta más lenta cuando el análisis prosigue debido a la naturaleza cambiante del proceso de difusión subyacente. Hasta que la velocidad de consumo de las especies mensurables ionizadas en la superficie del electrodo se iguala a la velocidad de difusión no, no puede obtenerse una corriente de estado estacionario. Así, los métodos de amperometría convencionales que miden la corriente durante el período transitorio antes de lo que se alcance una condición de estado estacionario, puede proporcionar más inexactitud que si la medición fuera tomada durante un período de tiempo de estado estacionario.

40 El rendimiento de la medición de un biosensor es definido en términos de exactitud y/o precisión. Aumentos en la exactitud y/o precisión proporcionan un incremento en el rendimiento de medición para el biosensor. La exactitud puede ser expresada en términos de sesgo de la lectura del analito del biosensor en comparación con una lectura de analito de referencia, representando mayores valores de sesgo menor exactitud, mientras que la precisión puede ser expresada en términos de la dispersión o varianza entre múltiples lecturas de analitos en relación a una media. Sesgo es la diferencia entre un valor determinado a partir del biosensor y el valor de referencia aceptado y puede ser expresada en términos de "sesgo absoluto" o "sesgo relativo". El sesgo absoluto puede ser expresado en las unidades de la medición, tal como

mg/dl, mientras que el sesgo relativo puede ser expresado como un porcentaje del valor de sesgo absoluto sobre el valor de referencia. Valores de referencia pueden ser obtenidos en un instrumento de referencia, tal como el YSI 2300 STAT PLUS™ disponible en YSI Inc., Yellow Springs, Ohio.

5 Muchos biosensores incluyen uno o más métodos para corregir el error asociado con un análisis. Los valores de concentración obtenidos a partir de un análisis con un error pueden ser inexactos. La capacidad para corregir estos análisis inexactos puede aumentar la exactitud de los valores de concentración obtenidos. Un sistema de corrección de errores puede compensar uno o más errores, tales como el contenido hematocrito de la muestra, que es diferente de una muestra de referencia. Por ejemplo, biosensores convencionales pueden estar configurados para informar de concentraciones de glucosa que presuponen un contenido hematocrito de 40% (v/v) para una muestra de sangre entera, independientemente del contenido real de hematocrito de la muestra. En estos sistemas, cualquier medición de glucosa realizada sobre una muestra de sangre entera que contenga menos o más del hematocrito de 40% incluirá un error o un sesgo atribuible al "efecto de hematocrito".

15 En tiras de sensor de biosensores convencionales para determinar las concentraciones de glucosa, la glucosa puede ser oxidada por una enzima, que a continuación transfiere el electrón a un mediador. Este mediador reducido se desplaza entonces al electrodo de trabajo donde es oxidado electroquímicamente. La cantidad de mediador que es oxidada puede estar correlacionada con la corriente que circula entre los electrodos de trabajo y de recuento de la tira del sensor. Cuantitativamente, la corriente medida en el electrodo de trabajo es directamente proporcional al coeficiente de difusión del mediador. El efecto de hematocrito interfiere con este proceso debido a que los glóbulos rojos bloquean la difusión del mediador al electrodo de trabajo. Posteriormente, el efecto de hematocrito influye en la cantidad de corriente medida en el electrodo de trabajo sin ninguna conexión con la cantidad de glucosa en la muestra.

20 El sesgo del hematocrito se refiere a la diferencia entre la concentración de glucosa de referencia obtenida con un instrumento de referencia y una lectura de glucosa experimental obtenida a partir de un biosensor para muestras que contienen niveles de hematocrito diferentes. La diferencia entre los valores de referencia y los valores obtenidos a partir del biosensor resulta de los niveles de hematocrito variables entre las muestras de sangre entera específica.

25 Además del efecto hematocrito, las inexactitudes de medición también pueden presentarse cuando la concentración de especie mensurable no se correlaciona con la concentración de analitos. Por ejemplo, cuando un sistema sensor determina la concentración de un mediador reducido generado en respuesta a la oxidación de un analito, cualquier mediador reducido no generado por oxidación del analito conducirá a que el sistema sensor indique que hay presente más analito en la muestra de lo que es correcto debido a los antecedentes del mediador. Así, "antecedentes del mediador" es el sesgo introducido en la concentración de analitos medida atribuible a especies mensurables no sensibles a la concentración de analitos subyacente.

30 En un intento de resolver una o más de estas desventajas, los biosensores convencionales han intentado múltiples técnicas, no solamente con respecto al diseño mecánico de la tira del sensor y a la selección del reactivo, sino también relativas a la manera en la que el dispositivo de medición aplica el potencial eléctrico a la tira. Por ejemplo, métodos convencionales para reducir el efecto de hematocrito para sensores amperométricos incluyen el uso de filtros, como se ha descrito en las Patentes de los EE.UU. N° 5.708.247 y 5.951.836; invirtiendo la polaridad de la corriente aplicada, como se ha descrito en el documento WO 2001/57510; y mediante métodos que maximizan la resistencia inherente de la muestra.

35 Múltiples métodos de aplicar la señal de entrada a la tira, comúnmente denominados como métodos, secuencias, o ciclos de impulso, han sido utilizados para abordar inexactitudes en la concentración de analitos determinada. Por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N° 4.897.162 la señal de entrada incluye una aplicación continua de potenciales de tensión ascendentes y descendentes que son combinados para dar una onda de forma triangular. Además, el documento WO 2004/053476 y los documentos de Patente de los EE.UU. 2003/017832 y 2003/0113933 describen señales de entrada que incluyen la aplicación continua de potenciales de tensión ascendentes y descendentes que también cambian de polaridad.

40 Otros métodos convencionales combinan una configuración específica de electrodo con una señal de entrada adaptada a esa configuración. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 5.942.102 combina la configuración específica de electrodo proporcionada por una celda de capa delgada con un impulso continuo de manera que los productos de reacción procedentes del electrodo de recuento llegan al electrodo de trabajo. Esta combinación es utilizada para accionar la reacción hasta que el cambio de corriente en función del tiempo resulta constante, alcanzando así una condición de estado estacionario verdadera para el mediador que se mueve entre los electrodos de trabajo y de recuento durante la operación potencial. Aunque cada uno de estos métodos equilibra distintas ventajas y desventajas, ninguno es ideal.

45 Como puede verse a partir de la descripción anterior, hay una necesidad creciente de biosensores perfeccionados, especialmente aquellos que pueden proporcionar una determinación exacta de manera creciente de la concentración de analito en menos tiempo. Los sistemas, dispositivos, y métodos de la presente invención resuelven al menos una de las desventajas asociadas con los sistemas convencionales.

Resumen

Se ha proporcionado un método para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye las operaciones según se ha definido en la reivindicación 1.

5 Un dispositivo de medición manual adaptado para recibir una tira de sensor se ha proporcionado para determinar la concentración de un analito en una muestra. El dispositivo está definido en la reivindicación 13.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede ser mejor comprendida con referencia a los dibujos y descripción siguientes. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, habiéndose puesto en su lugar énfasis en la ilustración de los principios de la invención.

10 La fig. 1 representa un método analítico electroquímico para determinar la presencia y/concentración de un analito en una muestra.

La fig. 2 es un gráfico que ilustra las señales de salida generadas a partir de una señal de entrada de control amperométrica.

15 La fig. 3A muestra el sesgo de hematocrito presente en valores de concentración de analito determinados a partir de cada uno de los tres valores de corriente medidos desde cada uno de los siete impulsos representados en la fig. 2.

La fig. 3B muestra el alcance del sesgo de hematocrito para muestras que incluyan 50, 100, y 400 mg/dl de glucosa.

La fig. 4 muestra el sesgo de hematocrito para el primer y tercer valores de corriente desde P5 en la fig. 3A para múltiples muestras de sangre entera.

20 La fig. 5 ilustra una representación esquemática de un biosensor que determina una concentración de analito en una muestra.

Descripción detallada

25 En el documento WO 2007/013915, titulado "Gated Amperometry", se utilizan señales de entrada pulsadas para analizar analitos en muestras. Las señales de entrada incluyen periodos de excitación y relajación alternativos. La presente invención se refiere a un sistema y método para analizar las señales de salida a partir de las señales de entrada pulsadas para reducir el sesgo, tales como las que se forman a partir del antecedente del mediador y del efecto de hematocrito. Correlacionando los valores de la señal de salida medidos dentro del período de 300 ms desde la iniciación de un impulso de excitación, puede mejorarse la exactitud y/o precisión del análisis.

30 La fig. 1 representa un análisis 100 electroquímico para determinar la presencia y/o concentración de un analito en una muestra. En 110, la muestra es introducida en el biosensor. En 120, una porción del analito en la muestra sufre una reacción redox. En 130, electrones son transferidos opcionalmente desde el analito a un mediador. En 140, una especie mensurable es excitada electroquímicamente con una señal de entrada. En 150, se genera y mide una señal de salida. En 160 se deja que la muestra se relaje, y en 170, se introducen impulsos de excitación adicionales. En 180, se ha determinado la presencia y/o concentración de la muestra a partir de la señal de salida, y en 190, la concentración puede ser presentada, almacenada, o similar.

35 En 110, la muestra es introducida a la porción de sensor del biosensor, tal como una tira de sensor. La tira de sensor incluye al menos un electrodo de trabajo y al menos un electrodo de recuento. Los electrodos pueden incluir uno o más capas reactivas. El electrodo de trabajo puede incluir una capa de barrera de difusión que es de una pieza con una capa reactiva o que es distinta de la capa reactiva. Cuando el electrodo de trabajo incluye una capa de barrera de difusión distinta, la capa reactiva puede o no estar dispuesta sobre la capa de barrera de difusión.

40 Una capa de barrera de difusión proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno donde puede recibir una especie mensurable. Los poros de la capa de barrera de difusión pueden ser seleccionados de modo que las especies mensurables pueden difundirse a la capa de barrera de difusión, mientras que constituyentes de la muestra, físicamente más grandes, tales como glóbulos rojos, son excluidos sustancialmente. Aunque las tiras de sensor convencionales han utilizado distintos materiales para filtrar glóbulos rojos desde la superficie del electrodo de trabajo, una capa de barrera de difusión proporciona un espacio poroso interno para contener y aislar una porción de la especie mensurable de la muestra. Un tratamiento más detallado de las capa de barrera de difusión puede ser encontrado en la publicación de los EE.UU N° 2007/0246357.

50 En 120 de la fig. 1, una porción del analito presente en la muestra es química o bioquímicamente oxidada o reducida, tal como mediante una oxidorreductasa. Esto ocurre cuando la muestra hidrata los reactivos. Después de la oxidación o reducción, los electrones pueden ser transferidos opcionalmente entre el analito y un mediador en 130. Así, se forma una especie mensurable ionizada, tal como a partir del analito o de un mediador. Puede ser beneficioso proporcionar un retardo de tiempo inicial, o "período de incubación", para que los reactivos reaccionen con el analito. Preferiblemente, el

retardo de tiempo inicial puede ser de desde 1 a 10 segundos. Un tratamiento más detallado de retardos de tiempo inicial puede ser encontrado en las Patentes de los EE.UU N° 5.620.579 y 5.653.863.

5 En 140 de la fig. 1, una especie mensurable, que puede ser el analito cargado desde 120 o el mediador cargado desde 130, es excitado electroquímicamente (oxidado o reducido) con una señal de entrada. Las señales de entrada pueden ser señales eléctricas, tales como corriente o potencial, que impulsan o se activan y desactivan en una secuencia establecida. La señal de entrada es una secuencia de impulsos de excitación separados por relajaciones. Durante un impulso amperométrico, el potencial eléctrico aplicado durante la excitación es aplicado preferiblemente a una tensión y polaridad sustancialmente constantes a lo largo de toda su duración. Esto contrasta directamente con algunas excitaciones convencionales donde la tensión es cambiada o "barrida" a través de múltiples potenciales y/o polaridades de tensión durante el registro o grabación de datos.

10 Durante una relajación, la señal eléctrica está desactivada. La desactivación incluye períodos de tiempo en los que una señal eléctrica no está presente y preferiblemente no incluye períodos de tiempo en los que una señal eléctrica está presente pero no tiene esencialmente amplitud. La señal eléctrica puede conmutarse entre activada y desactivada cerrando y abriendo un circuito eléctrico, respectivamente. El circuito eléctrico puede ser abierto y cerrado mecánica, eléctricamente, o mediante otros métodos.

15 Las señales de entrada pueden tener uno o más intervalos de impulso. Un intervalo de impulso en la suma de un impulso y la relajación que constituye un ciclo de trabajo. Cada impulso 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 una amperometría, durante el impulso. La anchura del impulso es la duración en el tiempo del impulso. Las anchuras del impulso en una señal de entrada pueden variar o ser sustancialmente las mismas. Cada relajación tiene una anchura de relajación, que es la duración en el tiempo de la relajación. Las anchuras de relajación en una señal de entrada pueden variar o ser sustancialmente las mismas.

20 Ajustando la anchura de la excitación y relajación de los ciclos de trabajo, las señales de entrada restringidas pueden aumentar la exactitud y/o precisión del análisis. Aunque no se desea estar limitado a ninguna teoría particular, este aumento de exactitud y/o precisión puede resultar a partir de la extracción de especies mensurables explicadas en el electrodo de trabajo desde el interior de una capa de barrera de difusión. En oposición a las especies mensurables exteriores a la capa de barrera de difusión, que pueden tener una tasa de difusión variable debido a que los glóbulos rojos y otros constituyentes de la muestra, especies mensurables dentro de la capa de barrera de difusión pueden tener una tasa de difusión relativamente constante al conductor. Por ejemplo, como se ha descrito en la Publicación de los EE.UU N° 2007/0246357, titulada "Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer", una anchura de impulso puede ser seleccionada para limitar sustancialmente la excitación de especies mensurables a una capa de barrera de difusión.

25 Señales de entrada preferibles incluyen al menos 3, 4, 6, 8, o 10 ciclos de trabajo aplicados durante menos de 30, 10, o 5 segundos. Más preferiblemente, al menos 3 ciclos de trabajo se aplican en el plazo de 10 segundos. La señal de entrada que incluye al menos 4 ciclos de trabajo aplicados en menos de 7 segundos es especialmente preferida actualmente. Las anchuras de impulso de la señal de entrada son seleccionadas independientemente en el intervalo de entre 0,3 y 0,8 segundos. Intervalos de impulsos preferibles son del orden de menos de 3, 2,5, o 1,5 segundos. Actualmente, las señales de entrada que tienen una anchura de impulso de 0,3 a 0,5 segundos en intervalos de impulso de desde 0,7 a 2 segundos son especialmente preferidas. La señal de entrada puede tener otros intervalos de impulso.

30 En 150 de la fig. 1, el biosensor genera una señal de salida en respuesta a las especies mensurables y a la señal de entrada. La señal de salida, tal como uno o más valores de corriente, puede ser medida continuamente o de manera intermitente y puede ser grabada como una función de tiempo. Las señales de salida pueden incluir aquellas que decaen inicialmente, aquellas que aumentan y luego decaen, aquellas que alcanzan un estado estacionario, y aquellas que son transitorias. Las corrientes de estado estacionario son observadas cuando el cambio de corriente en función del tiempo es sustancialmente constante, tal como en el intervalo de ± 10 o $\pm 5\%$. En lugar de corrientes de estado estacionario o que disminuyen lentamente convencionales, pueden obtenerse valores de corriente transitorias (que disminuyen rápidamente) a partir de señales de entrada pulsadas.

35 La fig. 2 es un gráfico que ilustra las señales de salida generadas a partir de una señal de entrada de control amperométrica. Cuando se traza en función del tiempo, cada impulso de excitación da como resultado un perfil de disminución transitoria que tiene un valor de corriente elevado inicial que disminuye. La señal de entrada aplicada por el biosensor incluía ocho impulsos y siete relajaciones, para un total de siete ciclos de trabajo. La fig. 2 omite el primer ciclo de trabajo y muestra que el octavo impulso no ha sido seguido por la relajación. Los impulsos fueron aplicados aproximadamente a 200 mV y tenían una anchura de impulso de aproximadamente 0,4 segundos. El intervalo de impulso para los ciclos de trabajo era de aproximadamente 1,4 segundos, proporcionando anchuras de relajación de aproximadamente 1 segundo. Las relajaciones fueron proporcionadas por un circuito abierto. Aunque se utilizaron impulsos de onda cuadrada, pueden utilizarse otros tipos de onda compatibles con el sistema de sensor y la muestra de ensayo.

40 El biosensor midió la señal de salida de manera intermitente durante cada impulso en la fig. 2 y grabó tres valores de

corriente en un dispositivo de memoria. Los valores de señal de salida fueron grabados aproximadamente a intervalos de 125 milisegundos (ms) comenzando aproximadamente 125 ms después de la iniciación de cada impulso. Los intervalos entre grabaciones sucesivas pueden ser iguales o diferentes. En la fig. 2, se grabaron tres valores de corriente procedentes de la señal de salida y se etiquetaron con la letra *I*, que muestra el número de impulsos y el número de medición por abonado. Así el tercer valor de corriente medido para el quinto impulso es etiquetado como $i_{5,3}$.

La fig. 3A muestra el sesgo de hematocrito presente en los valores de concentración de analito determinados a partir de cada uno de los tres valores de corriente medidos a partir de cada uno de los siete impulsos mostrados en la fig. 2, con un error de hematocrito mayor representado por valores numéricos absolutos mayores sobre el eje Y. Para cada impulso, el primer valor de corriente mostró el menor sesgo de hematocrito de los tres valores, resultando la diferencia de sesgo entre el primer y el tercer valores, mayor con cada impulso sucesivo. El sesgo de hematocrito medio inferior a través de las corrientes medidas también fue observado para cada impulso sucesivo; sin embargo, cada impulso adicional prolongó la duración del análisis. Así, mientras los valores de corriente desde P8 no incluían casi error de hematocrito, el primer valor de corriente desde P5 puede proporcionar un equilibrio preferido entre el error de hematocrito y el tiempo de análisis. También es de interés que el primer valor de corriente medido para P5 tenía aproximadamente el mismo error de hematocrito que el tercer valor de corriente desde P8, tomado más de 3 segundos después. Estos resultados establecen que los valores de corriente medidos previamente en la anchura de impulso incluyen el menor error de hematocrito.

La fig. 3B muestra el alcance del sesgo de hematocrito para muestras que incluyen 50, 100, y 400 mg/dl de glucosa, con mayores valores de alcance sobre el eje Y que representan un mayor error de hematocrito. Como en la fig. 3A, el primer valor de corriente mostró el menor sesgo de hematocrito de los cuatro valores de corriente medidos durante cada impulso, resultando la diferencia de sesgo entre el primer y cuarto valores mayor con cada impulso sucesivo. El sesgo de hematocrito inesperadamente inferior en el primer valor de corriente medido para cada impulso fue más pronunciado al nivel de concentración de glucosa mayor de 400 mg/dl. Así, la mejora de exactitud obtenida a partir de las mediciones de corriente tomadas anteriormente en la disminución creció cuando aumentó la concentración de glucosa en la muestra de sangre entera.

La fig. 4 muestra el sesgo de hematocrito para el primer y tercer valores de corriente desde P5 en la fig. 3A para múltiples muestras de sangre entera que incluyen contenido de hematocrito y glucosa variable. El primer valor de corriente $i_{5,1}$ mostró una correlación R^2 de 0,18, mientras que el tercer valor de corriente $i_{5,3}$ mostró una correlación R^2 de 0,08, mayor del 50% de reducción. La exactitud de la concentración de analito mejorada obtenida a partir de valores de corriente tomados anteriormente en la disminución es inesperada y contrasta directamente con las enseñanzas anteriores de que la exactitud es conseguida a partir de mediciones tomadas en la última parte de estado estacionario de una disminución. Estos resultados establecen en contra de la intuición que puede obtenerse una exactitud y/o precisión mejoradas a partir de mediciones tomadas anteriormente en la parte transitoria que cambia rápidamente de la disminución.

El valor de corriente de salida a partir del cual es determinada la concentración de analito es medido dentro de un período de menos de 300 ms después de la aplicación del impulso de excitación. Más preferiblemente, el valor de corriente de salida utilizado para determinar la concentración de analito de la muestra es medido dentro de un período de menos de 175 ms a partir de la aplicación de un impulso de excitación o en el intervalo de 10 a 150 ms de aplicación del impulso. Más preferiblemente aún, el valor de corriente de salida a partir del cual es determinada la concentración es medido dentro de un período de 30 a 150 ms de aplicación de un impulso de excitación. Actualmente, determinar la concentración del analito partir de un valor de corriente de salida medido en el intervalo de 60 a 150 ms de aplicación de un impulso de excitación es especialmente preferido.

El impulso a partir del cual es medido el valor de corriente de salida analítico para determinar la concentración del analito en la muestra es aplicado en un período de 11 segundos o menos de aplicación del impulso de excitación inicial y es aplicado más preferiblemente en un período de 7 segundos o menos de aplicación del impulso inicial.

En 160 de la fig. 1, la muestra sufre relajación. El dispositivo de medición puede abrir el circuito a través de la tira del sensor, permitiendo así la relajación. Durante la relajación 160, la corriente presente durante la excitación 140 es reducida sustancialmente al menos en la mitad, preferiblemente en un orden de magnitud, y más preferiblemente a cero. Preferiblemente, un estado de corriente cero es proporcionado por un circuito abierto u otro método conocido para los expertos en la técnica para proporcionar un flujo de corriente sustancialmente de cero. Preferiblemente, la señal de salida no es grabada durante la relajación 160.

Durante la relajación 160, un agente ionizante, tal como una oxidorreductasa, puede reaccionar con el analito para generar especies mensurables adicionales sin los efectos de un potencial eléctrico. Por ejemplo, un biosensor de glucosa que incluye glucosa oxidasa y un mediador de ferricianuro como reactivos producirán ferrocianuro adicional (mediador reducido) sensible a la concentración de analito de la muestra sin interferencia a partir de un potencial eléctrico durante la relajación 160.

En 170 de la fig. 1, el biosensor continúa aplicando impulsos desde la señal de entrada a los electrodos de trabajo y de recuento durante el período de tiempo deseado. El ciclo de trabajo que incluye la excitación 140 y la relajación 160 puede ser repetido o puede aplicarse un ciclo de trabajo que tiene diferentes anchuras y/o intervalos de impulso.

En 180 de la fig. 1, el biosensor analiza el valor de la señal de salida grabada dentro del período de 300 ms de aplicación de un impulso para determinar la concentración del analito en la muestra. Los valores de corriente, de tiempo y/u otros valores adicionales pueden también ser analizados. En 190, el valor de concentración de analito puede ser presentado, almacenado para futura referencia, y/o utilizado para cálculos adicionales.

- 5 La fig. 5 ilustra una representación esquemática de un biosensor 500 que determina una concentración de analito en una muestra de un fluido biológico utilizando una señal de entrada pulsada. El biosensor 500 incluye un dispositivo 502 de medición y una tira 504 de sensor, que puede ser implementada en cualquier instrumento analítico, incluyendo un dispositivo en una mesa de trabajo, un dispositivo portátil o manual, o similar. El biosensor 500 puede ser utilizado para determinar concentraciones de analito incluyendo las de glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, y similares.
- 10 Aunque se ha mostrado una configuración particular, el biosensor 500 puede tener otras configuraciones, incluyendo aquellas con componentes adicionales.

- 15 La tira 504 de sensor tiene una base 506 que forma un depósito 508 y un canal 510 con una abertura 1212. El depósito 508 y el canal 510 pueden ser cubiertos por una tapa con un orificio de ventilación. El depósito 508 define un volumen parcialmente encerrado. El depósito 508 puede contener una composición que ayuda a retener una muestra líquida tal como polímeros que se hinchan en agua o matrices de polímero poroso. Pueden depositarse reactivos en el depósito 508 y/o en el canal 510. Los reactivos pueden incluir una o más enzimas, aglutinantes, mediadores, y especies similares. La tira 504 de sensor también puede tener una interfaz 514 de muestra dispuesta junto al depósito 508. La interfaz 514 de muestra puede rodear parcial o completamente el depósito 508. La tira 504 de sensor puede tener otras configuraciones.

- 20 La interfaz 514 de muestra tiene conductores conectados a un electrodo de trabajo y a un electrodo de recuento. Los electrodos pueden estar sustancialmente en el mismo plano o en más de un plano. Otras distancias de separación entre los electrodos y la tapa pueden ser utilizadas. Los electrodos pueden estar dispuestos sobre una superficie de la base 506 que forma el depósito 508. Los electrodos pueden extenderse o sobresalir al depósito 508. Una capa dieléctrica puede cubrir parcialmente los conductores y/o los electrodos. La interfaz 514 de muestra puede tener otros electrodos y conductores.
- 25

El dispositivo 502 de medición incluye circuitos eléctricos 516 conectados a una interfaz 518 de sensor y a un dispositivo de presentación 520. Los circuitos eléctricos 516 incluyen un procesador 522 conectado a un generador 524 de señal, un sensor 526 de temperatura opcional, y un medio 528 de almacenamiento.

- 30 El generador 524 de señal proporciona una señal de entrada eléctrica a la interfaz 518 de sensor en respuesta al procesador 522. La señal de entrada eléctrica puede ser transmitida por la interfaz 518 de sensor a la interfaz 514 de muestra para aplicar la señal de entrada eléctrica a la muestra del fluido biológico. La señal de entrada eléctrica puede ser un potencial o corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de los mismos, tal como cuando se aplica una señal de CA con una señal de CC desplazada. La señal de entrada eléctrica puede ser aplicada como un solo impulso o en múltiples impulsos, secuencias, o ciclos. El generador 524 de señal también puede grabar una señal de salida procedente de la interfaz de sensor como un generador-grabador.
- 35

- El sensor 526 de temperatura opcional determina la temperatura de la muestra en el depósito de la tira 504 del sensor. La temperatura de la muestra puede ser medida, calculada a partir de la señal de salida, o asumida que es la misma o similar a una medición de la temperatura ambiente o a la temperatura de un dispositivo que implementa el sistema biosensor. La temperatura puede ser medida utilizando un termistor, un termómetro u otro dispositivo de detección de temperatura. Pueden utilizarse otras técnicas para determinar la temperatura de la muestra.
- 40

El medio 528 de almacenamiento puede ser una memoria magnética, óptica o de semiconductor, otro dispositivo de almacenamiento, o similar. El medio 528 de almacenamiento puede ser un dispositivo de memoria fijo, un dispositivo de memoria extraíble, tal como una tarjeta de memoria, ser accedida a distancia, o similar.

- 45 El procesador 522 implementa el análisis de analito y el tratamiento de datos utilizando un código de software legible por ordenador y datos almacenados en el medio 528 de almacenamiento. El procesador 522 puede iniciar el análisis de analito en respuesta a la presencia de la tira 504 de sensor en la interfaz 518 de sensor, la aplicación de una muestra a la tira 504 de sensor, en respuesta a la entrada de un usuario, o similar. El procesador 522 dirige el generador 524 de señal para proporcionar la señal de entrada eléctrica a la interfaz 518 de sensor. El procesador 522 puede recibir la temperatura de muestra desde el sensor 526 de temperatura opcional. El procesador 522 recibe la señal de salida desde la interfaz 518 del sensor. La señal de salida es generada en respuesta a la reacción redox del analito en la muestra. El procesador 522 mide la señal de salida dentro del período de 300 ms de la aplicación de un impulso de excitación desde el generador 524 de señal. La señal de salida es correlacionada con la concentración de analito de la muestra utilizando una o más ecuaciones de correlación en el procesador 522. Los resultados del análisis de analito pueden ser emitidos al dispositivo de presentación 520 y pueden ser almacenados en el medio 528 de almacenamiento.
- 50

- 55 Las ecuaciones de correlación relativas a las concentraciones de analito y las señales de salida pueden ser representadas gráfica, matemáticamente, en una combinación de las mismas, o de manera similar. Las ecuaciones de correlación pueden ser representadas por una tabla de número de programa (PNA), otra tabla de búsqueda, o similar

5 que está almacenada en el medio 528 de almacenamiento. Instrucciones relativas a la implementación del análisis de analito pueden ser proporcionadas por el código de software legible por ordenador almacenado en el medio 528 de almacenamiento. El código puede ser un código de objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad descrita en este documento. Los datos procedentes del análisis de analito pueden ser sometidos a uno o más tratamientos de datos, incluyendo la determinación de tasas de disminución, constantes K, proporciones, y similares en el procesador 522.

10 La interfaz 518 de sensor tiene contactos que conectan o comunican eléctricamente con los conductores en la interfaz 514 de muestra de la tira 504 de sensor. La interfaz 518 de sensor transmite la señal de entrada eléctrica desde el generador 524 de señal a través de los contactos a los conectores en la interfaz 514 de muestra. La interfaz 518 de sensor transmite también la señal de salida desde la muestra a través de los contactos al procesador 522 y/o generador 524 de señal.

El dispositivo de presentación 520 puede ser analógico o digital. El dispositivo de presentación puede ser un dispositivo de presentación de LCD adaptado para prestar una lectura numérica.

15 En uso, una muestra líquida para análisis es transferida al depósito 508 introduciendo el líquido en la abertura 512. La muestra líquida fluye a través del canal 510, llenando el depósito 508, mientras expulsa el aire contenido previamente. La muestra líquida reacciona químicamente con los reactivos depositados en el canal 510 y/o en el depósito 508.

20 La tira 502 de sensor está dispuesta adyacente al dispositivo de medición 502. Adyacente incluye posiciones en las que la interfaz 514 de la muestra está en comunicación eléctrica y/u óptica con la interfaz 508 de sensor. La comunicación eléctrica incluye la transferencia de señales de entrada y/o de salida entre contactos en la interfaz 518 de sensor y conductores en la interfaz 514 de muestra. La comunicación óptica incluye la transferencia de luz entre un portal óptico en la interfaz 514 de muestra y un detector en la interfaz 508 de sensor. La comunicación óptica incluye también la transferencia de luz entre un portal óptico en la interfaz 502 de muestra y una fuente de luz en la interfaz 508 de sensor.

25 Aunque se han descrito distintas realizaciones de la invención, será evidente para los expertos en la técnica que son posibles otras realizaciones e implementaciones dentro del marco de la invención. Por consiguiente, el invento no ha de estar restringido excepto a la luz de las reivindicaciones adjuntas y de sus equivalencias.

REIVINDICACIONES

- 1 Un método para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:
 aplicar una señal de entrada a la muestra, comprendiendo la señal de entrada al menos 3 ciclos de trabajo dentro de un período de 10 segundos, comprendiendo la ciclo de trabajo un impulso de excitación y una relajación;
- 5 medir una señal de salida en respuesta a una especie mensurable en menos de 300 milisegundos de aplicación del impulso de excitación de al menos uno de los ciclos de trabajo; y
- determinar la concentración del analito en la muestra en respuesta a dicha señal de salida medida, en donde el impulso de excitación del ciclo de trabajo a partir del cual es medida dicha señal de salida tiene una anchura de impulso de desde 0,3 a 0,8 segundos y es aplicada en 11 segundos o menos después de la aplicación del impulso de excitación inicial a la muestra.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la señal de entrada comprende al menos 4 ciclos de trabajo dentro de un período de 7 segundos de aplicación de la señal de entrada.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la anchura de impulso de cada uno de los impulsos de excitación de al menos 3 ciclos de trabajo es del orden de 0,3 a 0,8 segundos, preferiblemente de 0,3 a 0,5 segundos.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la señal de salida es medida en menos de 175 milisegundos, preferiblemente en el período de 60 a 150 milisegundos, de aplicación del impulso de excitación de uno de los ciclos de trabajo.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el impulso de excitación del ciclo de trabajo a partir del que es medida la señal de salida es aplicado dentro del período de 7 segundos o menos de aplicación del impulso de excitación inicial a la muestra.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la excitación tiene una tensión sustancialmente constante y en donde la señal de entrada comprende preferiblemente excitaciones de onda cuadrada.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además grabar al menos una corriente en función del tiempo durante la aplicación de la señal de entrada.
- 25 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la determinación comprende aplicar al menos un tratamiento de datos al menos a una corriente de la señal de salida.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además: excitar a las especies mensurables en el interior de una capa de barrera de difusión; y excluir sustancialmente de excitación a las especies mensurables en el exterior de la capa de barrera de difusión.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relajación es sensible a un circuito abierto.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relajación es de al menos 0,5 segundos.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la señal de salida incluye una degradación transitoria y la concentración del analito es determinada a partir de la degradación transitoria.
- 35 13. Un dispositivo (502) de medición manual, para determinar la concentración de un analito en una muestra, en donde el dispositivo (502) está adaptado para recibir una tira (504) de sensor y el dispositivo (502) comprende:
- contactos;
- al menos un dispositivo de presentación (520); y
- 40 circuitos electrónicos (516) que establecen comunicación eléctrica entre los contactos y el dispositivo de presentación (520), comprendiendo los circuitos (516):
- un cargador eléctrico (524) y un procesador (522) en comunicación eléctrica, comprendiendo el procesador (522) en comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento (528) un código de software legible por ordenador, que cuando es ejecutado por el procesador (522), hace que el cargador (524) implemente una señal de entrada que comprende al menos 3 ciclos de trabajo dentro de un período de 10 segundos, entre los contactos, comprendiendo cada ciclo de trabajo una excitación y una relajación,
- 45 en donde el procesador (522) puede ser operado para medir al menos un valor de corriente en al menos

los dos contactos en menos los 300 milisegundos después de que el cargador (524) aplique la excitación, teniendo la excitación una anchura de impulso que oscila desde 0,3 a 0,8 segundos,

el procesador (522) puede ser operado para medir al menos un valor de corriente dentro del período de 11 segundos o menos después de que el cargador (524) implemente la señal de entrada, y

5 el procesador (522) puede ser operado para determinar la concentración de analito en el fluido biológico en respuesta al menos a un valor de corriente.

14. El dispositivo según la reivindicación 13, en donde el cargador (524) puede ser operado para implementar las excitaciones a una tensión sustancialmente constante.

10 15. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en donde el procesador (522) puede ser operado para medir al menos el valor de corriente durante una parte transitoria de una degradación.

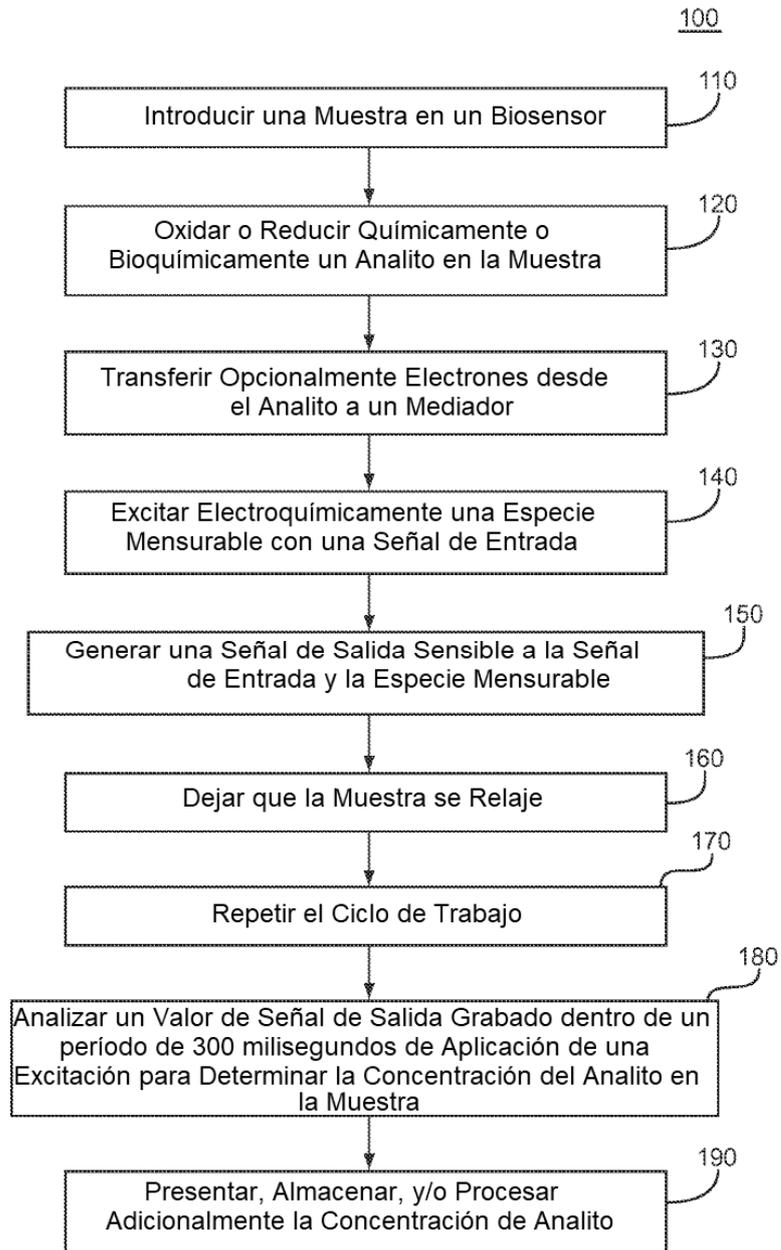


Fig.1

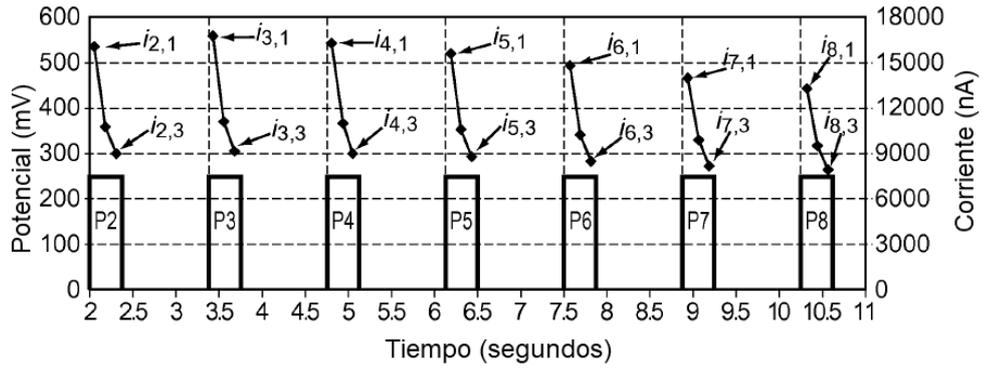


Fig. 2

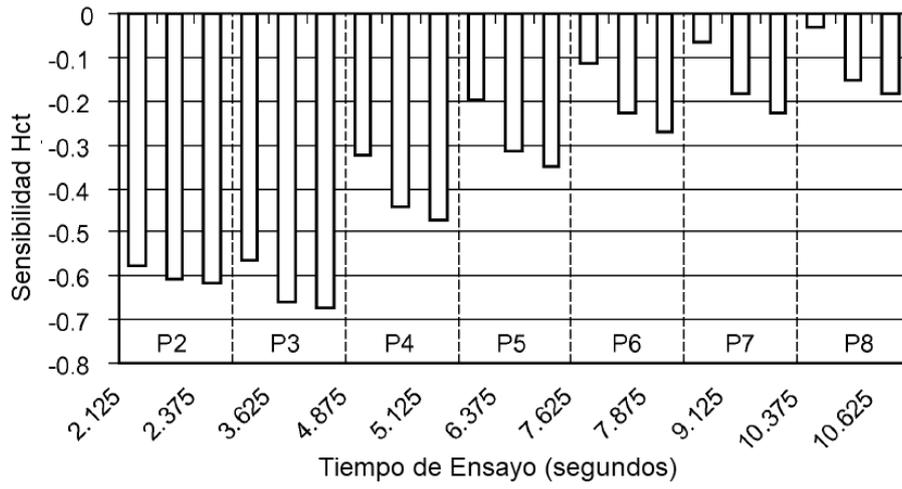


Fig. 3A

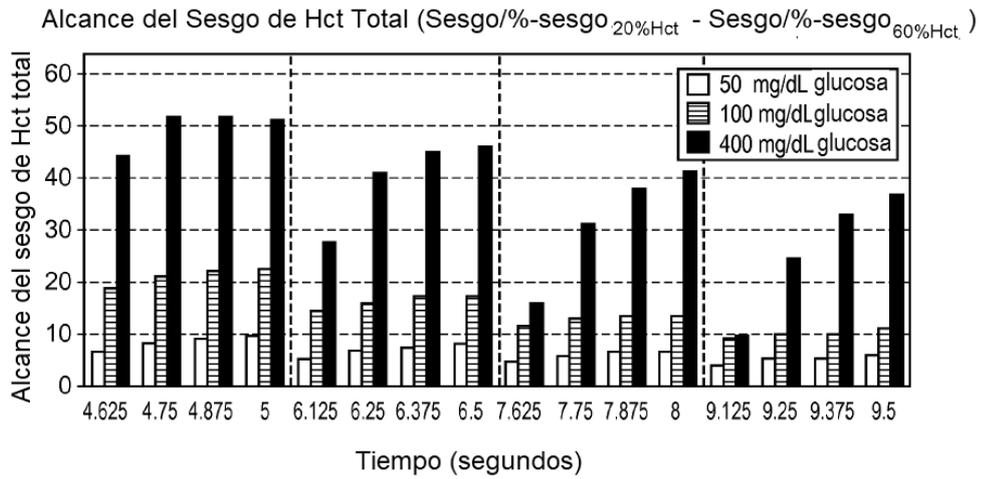


Fig.3B

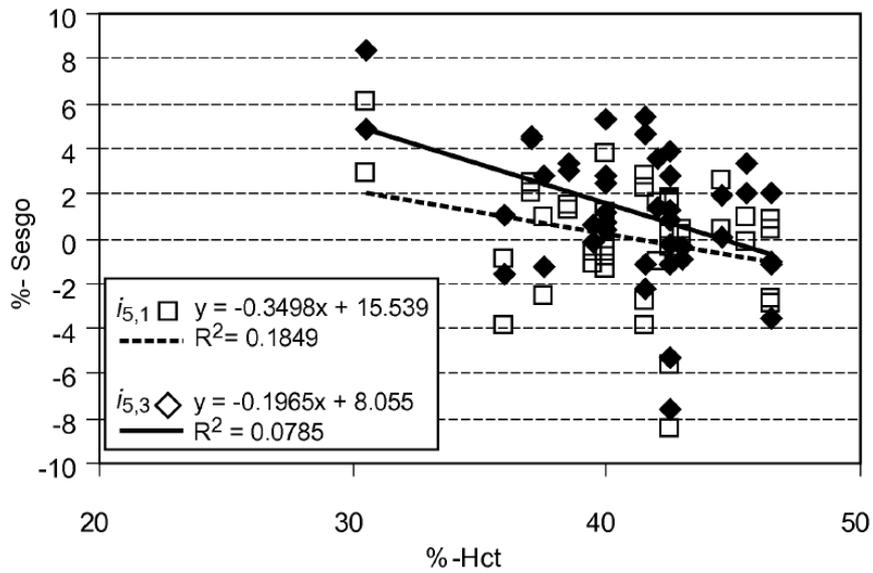


Fig.4

