

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 685**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2007 PCT/US2007/077955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2008 WO08036516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2007 E 07814768 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2089531**

54 Título: **Sistema de biosensor que tiene estabilidad y rendimiento de hematocrito potenciados**

30 Prioridad:

22.09.2006 US 846688 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WU, HUAN-PING;
NELSON, CHRISTINE, D.;
SPRADLIN, HOPE y
MAURER, ERIC**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 748 685 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

Sistema de biosensor que tiene estabilidad y rendimiento de hematocrito potenciados

ANTECEDENTES

5 Los biosensores proporcionan un análisis de un líquido biológico, tal como sangre completa, orina, o saliva. Normalmente, un biosensor analiza una muestra de líquido biológico para determinar la concentración de uno o más analitos, tales como glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, o bilirrubina, en el líquido biológico. El análisis es 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 a la dieta y/o medicación.

10 Los biosensores se pueden implementar usando dispositivos de mesa, portátiles, y similares. Los dispositivos portátiles pueden ser de mano. Los biosensores se pueden diseñar para analizar uno o más analitos y pueden usar diferentes volúmenes de líquidos biológicos. Algunos biosensores pueden analizar una única gota de sangre completa, tal como de 0,25-15 microlitros (μL) de volumen. Los ejemplos de dispositivos portátiles de medición incluyen los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer Corporation; los biosensores Precision® disponibles de Abbott en Abbott Park, Illinois; los biosensores Accucheck® disponibles de Roche en Indianápolis, Indiana; y los biosensores OneTouch Ultra® disponibles de Lifescan en Milpitas, California. Los ejemplos de dispositivos de medición de mesa incluyen el analizador BAS 100B disponible de BAS Instruments en West Lafayette, Indiana; la estación de trabajo electroquímica CH Instruments disponible de CH Instruments en Austin, Texas; la estación de trabajo electroquímica Cypress disponible de Cypress Systems en Lawrence, Kansas; y el instrumento electroquímico EG&G disponible de Princeton Research Instruments en Princeton, New Jersey.

20 Los biosensores normalmente miden una señal eléctrica para determinar la concentración de analito en una muestra de líquido biológico. El analito normalmente experimenta una reacción de oxidación/reducción o redox cuando se aplica una señal de entrada a la muestra. Se puede añadir una enzima o especie similar a la muestra para potenciar la reacción redox. La señal de entrada normalmente es una señal eléctrica, tal como una corriente o potencial. La reacción redox genera una señal de salida en respuesta a la señal de entrada. La señal de salida normalmente es una señal eléctrica, tal como una corriente o potencial, que se pueden medir y correlacionar con la concentración de analito en el líquido biológico.

30 Muchos biosensores tienen un dispositivo de medición y una tira de sensor. Se introduce una muestra del líquido biológico en una cámara de muestra en la tira de sensor. La tira de sensor se coloca en el dispositivo de medición para el análisis. El dispositivo de medición tiene normalmente contactos eléctricos que conectan con conductores eléctricos en la tira de sensor. Los conductores eléctricos normalmente se conectan con electrodos de trabajo, contraelectrodos, y/u otros electrodos que se extienden dentro de una cámara de muestra. El dispositivo de medición aplica la señal de entrada mediante 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 una muestra depositada en la cámara de muestra. La reacción redox del analito genera una señal de salida en respuesta a la señal de entrada. El dispositivo de medición determina la concentración de analito en respuesta a la señal de salida.

40 La tira de sensor puede incluir reactivos que reaccionan con el analito en la muestra de líquido biológico. Los reactivos pueden incluir un agente de ionización para facilitar la reacción redox del analito, así como mediadores u otras sustancias que ayudan en la transferencia de electrones entre el analito y el conductor. El agente de ionización puede ser una oxidoreductasa, tal como una enzima específica de analito, que cataliza la oxidación de glucosa en una muestra de sangre completa. Los reactivos pueden incluir un aglutinante que mantiene juntos la enzima y el mediador.

45 Una desventaja de las composiciones de reactivo usadas en los biosensores convencionales es el cambio en el rendimiento de medición, ya sea la exactitud o precisión, que ocurre cuando se almacena la tira de sensor. La electrónica y los métodos de análisis usados por el dispositivo de medición para determinar la concentración de analito de la muestra se seleccionan, en general, en vista de la composición de reactivo sobre la tira de sensor que rinde como se fabricó inicialmente. Sin embargo, después del transporte y almacenamiento en las estanterías del almacén, la composición de reactivo se degrada con el tiempo y la temperatura. Este cambio en la química de la composición de reactivo puede dar como resultado una reducción del rendimiento de medición.

50 Para aumentar la estabilidad a largo plazo de las composiciones de biosensor de reactivo, los biosensores convencionales se basan, en general, en un exceso sustancial de enzima y mediador en relación con la cantidad requerida de estos reactivos para analizar la muestra. Esperando que estos reactivos se degraden con el tiempo, las composiciones de reactivo convencionales incluyen cantidades sustancialmente mayores de enzima y/o mediador que las requeridas para reaccionar estequiométricamente con el analito. Además de aumentar el coste del biosensor mediante el uso de reactivos de sacrificio, los reactivos innecesarios pueden requerir un mayor volumen de muestra, tiempo de análisis más largo, y disminuir el rendimiento de medición del biosensor debido a muchos factores.

55 Por ejemplo, la publicación PCT WO 88/03270 desvela una densidad de deposición global de 3 mg/cm^2 ($30 \mu\text{g/mm}^2$) con un método de serigrafía. La cantidad relativa de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fue 57,7 %, también fosfato a 28,8 % y glucosa

oxidasa (GO) a 3,6 %. La traducción de estos porcentajes en densidades de deposición sobre la tira de sensor da como resultado una densidad de $K_3Fe(CN)_6$ de $17,31 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, una densidad de tampón fosfato de $8,64 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ y una densidad de GO de $1,08 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. En otro ejemplo, la columna 17, líneas 25-35, de la patente de EE.UU. N° 4.711.245 desvela la deposición de $15 \mu\text{L}$ de una disolución $0,1 \text{ M}$ de 1,1'-dimetilferroceno en tolueno sobre un electrodo de disco que tiene un diámetro de 4 mm . Con un peso molecular de 214 g/mol , el mediador de 1,1'-dimetilferroceno se aplicó a una densidad de deposición de $25,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ [$(15 \mu\text{L} * 0,1 \text{ M} * 214 \text{ g/mol}) / 2^2 * 3,14 \text{ mm}^2 = 25,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$]. En un ejemplo adicional, la patente de EE.UU. N° 5.958.199 desvela la deposición sobre el electrodo sensor de $4 \mu\text{L}$ de una disolución que incluye 40 mg de GO, 16 mg de $K_3Fe(CN)_6$ y 20 mg de CMC en 1 mL de agua. En este caso, las densidades de deposición fueron $6,67 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para GO, $10,67 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para $K_3Fe(CN)_6$ y $13,33 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para CMC, con un área de electrodo estimada (área de deposición) de 6 mm^2 . En un ejemplo adicional, la patente de EE.UU. N° 5.997.817 describe una formulación de reactivo que incluye 59 g de $K_3Fe(CN)_6$ disuelto en aproximadamente 900 mL agua con otros componentes. Aproximadamente $4,5 \mu\text{L}$ de este reactivo se depositaron sobre una abertura de $21,4 \text{ mm}^2$ ($3,2 \times 6,7$) dando una densidad de deposición de mediador de $13,96 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($4,5 \times 10^{-3} \text{ mL} * 59 \text{ g}/900 \text{ mL}$).

En cada uno de estos ejemplos, las composiciones de reactivo tuvieron densidades de deposición de mediador en el intervalo $10 - 25 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, mientras que la densidad de deposición de enzima estuvo en el intervalo de $1 - 6 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Esta gran carga de mediador en relación con la enzima puede ser atribuible a la aplicación individual de la composición tanto a los electrodos de trabajo como a los contraelectrodos. Dependiendo del diseño del sensor, el mediador puede funcionar en el contraelectrodo para soportar la actividad electroquímica en el electrodo de trabajo. Así, una deposición de composición de reactivo única que cubre ambos electrodos puede dar como resultado la sustancial sobrecarga del electrodo de trabajo con mediador.

Los ejemplos muestran que los excesos de enzima y mediador se usan para garantizar que ingredientes activos suficientes estén presentes para la precisa medición de glucosa. El usar tiras de sensor fabricadas con elevadas cantidades de reactivos de sacrificio después del almacenamiento a largo plazo puede dar como resultado la desventaja de un cambio en el rendimiento de medición. Este cambio se puede observar en al menos dos formas: (1) un incremento de corriente de fondo con el tiempo (que afecta la ordenada en el origen de calibración) y (2) un cambio en la sensibilidad del sensor (que afecta la pendiente de calibración).

Durante el almacenamiento, se puede producir mediador reducido de las interacciones entre el mediador oxidado y el sistema de enzima y polímero. Esto es un proceso natural que se cree que está gobernado por la termodinámica. Cuanto mayor sea la cantidad de mediador o enzima, mayor será la cantidad de mediador reducido que se produce. A medida que aumenta la concentración de mediador reducido con el tiempo, aumentará la corriente de fondo hacia el fin de la estabilidad en almacén de las tiras de sensor.

Se han propuesto múltiples métodos para reducir el efecto del cambio sobre el rendimiento del sensor antes del uso de una tira de sensor almacenada. Por ejemplo, Genshaw et al. en la patente de EE.UU. N° 5.653.863 desvelaron un método de uso de un impulso inicial relativamente largo antes del análisis para oxidar el mediador que se redujo durante el transporte y el almacenamiento. Aunque es eficaz, este método alargó el tiempo requerido para completar el análisis.

Así, sería deseable aumentar la estabilidad a largo plazo de la composición de reactivo para mejorar el rendimiento de medición del biosensor después del transporte y almacenamiento. Dicho aumento de la estabilidad a largo plazo de la composición de reactivo puede aumentar el rendimiento de medición del biosensor y proporcionar una mayor estabilidad en almacén para las tiras de sensor. También se desearía reducir la cantidad de enzima y/o mediador de sacrificio incluidos en la composición de reactivo y reducir el tiempo requerido para completar el análisis.

Otro inconveniente de los biosensores convencionales usados para medir la concentración de glucosa en muestras de sangre completa (WB) se denomina el "efecto del hematocrito". Además de agua y glucosa, las muestras de WB contienen glóbulos rojos (RBC). El hematocrito es el volumen de una muestra de WB ocupado por RBC en relación con el volumen total de la muestra de WB, y se expresa frecuentemente como un porcentaje. El efecto del hematocrito ocurre cuando los glóbulos rojos bloquean la difusión del analito y/o mediador hacia uno o más electrodos del biosensor. Puesto que la señal de salida medida por el biosensor corresponde a la velocidad de difusión del analito y/o mediador, los RBC pueden introducir error al análisis, interfiriendo con este proceso de difusión. Así, cuanto más se desvíe el porcentaje de hematocrito (volumen de glóbulos rojos) del de la calibración del sistema de % de hematocrito para una muestra de WB, mayor será el sesgo de hematocrito (error) en las lecturas de glucosa obtenidas del biosensor.

Las muestras de WB tienen, en general, porcentajes de hematocrito que varían desde 20 hasta 60% , siendo $\sim 40 \%$ el promedio. Si se prueban muestras de WB que contienen niveles idénticos de glucosa, pero que tienen hematocritos de 20 , 40 y 60% , se informarán tres lecturas de glucosa diferentes por un sistema basado en un conjunto de constantes de calibración (pendiente y ordenada en el origen de la muestra de WB que contiene 40% de hematocrito, por ejemplo). Aún cuando las concentraciones de glucosa sean las mismas, el sistema informará que la muestra de WB de 20% de hematocrito contiene más glucosa que la muestra de WB de 40% de hematocrito, y que la muestra de WB de 60% de hematocrito contiene menos glucosa que la muestra de WB de 40% de

hematocrito debido a los RBC que interfieren con la difusión del analito y/o mediador a la superficie del electrodo. Así, los biosensores convencionales pueden no ser capaces de distinguir entre una concentración más baja de analito y una concentración más alta de analito donde los RBC interfieren con la difusión.

5 Los biosensores convencionales se configuran, en general, para informar concentraciones de glucosa suponiendo un 40 % de contenido de hematocrito para la muestra de WB, independientemente del contenido real de hematocrito. Para estos sistemas, cualquier medición de glucosa realizada en una muestra de sangre que contiene menos o más de 40 % de hematocrito incluirá cierto sesgo de hematocrito atribuible al efecto del hematocrito.

10 Se han propuesto diversos métodos y técnicas para reducir el sesgo del efecto del hematocrito sobre las mediciones de glucosa. Por ejemplo, Ohara et al. en la patente de EE.UU. N° 6.475.372 desvelaron un método de uso de la relación de corrientes de un impulso de potencia directo e inverso para compensar el efecto del hematocrito. McAleer et al. en las patentes de EE.UU. N° 5.708.247 y 5.951.836 desvelaron una formulación de reactivo usando partículas de sílice para filtrar el RBC de la superficie del electrodo para reducir el efecto del hematocrito. Carter et al. en la patente de EE.UU. N° 5.628.890 desvelaron un método de uso de una amplia separación de electrodos en combinación con capas de malla para distribuir la muestra de sangre para reducir el efecto del hematocrito.

15 Estas técnicas convencionales para reducir el sesgo atribuible al efecto del hematocrito incluyeron (a) co-deposición de un polímero para minimizar el efecto del hematocrito, (b) adición de diversos tipos de sílice fundida para potenciar el efecto de filtración para la capa de polímero, (c) coeficientes de compensación basados en la relación entre corrientes de un impulso de potencial directo e inverso, y (d) auto-compensación utilizando la resistencia a la disolución existente de las muestras de sangre completa. Aunque estos métodos pueden ser útiles, los sensores de glucosa convencionales continúan presentando un sesgo analítico significativo atribuible al efecto del hematocrito, en general, desde aproximadamente 15 hasta 30 %. Así, sería deseable proporcionar sistemas para cuantificar analitos en líquidos biológicos, en particular el contenido de glucosa de sangre completa, que redujeran el sesgo del efecto del hematocrito. También se refiere a los documentos de patente US6120676A y US2005016844A1, así como a EP1074832A1, WO2006/042304A, WO2006/096619A y US6413398B1, que están relacionados con las tiras de sensor electroquímicas. El documento de patente US6120676 mencionado desvela un sensor diseñado para determinar la cantidad y concentración de analito en una muestra. El sensor comprende un electrodo de trabajo recubierto con un mediador redox no lixiviable que actúa de agente de transferencia de electrones entre el analito y el electrodo. Se puede añadir un segundo agente de transferencia de electrones, tal como una enzima, para facilitar la electro-oxidación o electrorreducción del analito. En un Ejemplo 1, un mediador puede ascender en la capa de reactivo a 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y en el Ejemplo 4, un mediador puede ascender en la capa de reactivo a 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. El documento de patente US2005/016844A1 mencionado desvela una tira de reactivo para tiras reactivas con densidades muy bajas de deposición de mediador y enzima. La capa de reactivo desvelada en el documento de patente US2005/016844A1 se deposita con un peso de cobertura de 53 g/m^2 y comprende 0,86 % en peso de mediador y 0,40 % en peso de enzima. Como se ha mencionado anteriormente, sin embargo, aún siguen siendo retos la estabilidad a largo plazo y la mayor estabilidad en almacén.

SUMARIO

El problema se resuelve por un tira de sensor electroquímica según la reivindicación 1, así como un método de medición según la reivindicación 10. Las realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes. En un aspecto de la divulgación, una tira de sensor electroquímica incluye una base, primer y segundo electrodos sobre la base, y una tapa sobre la base. La tira incluye al menos una primera capa sobre un primer conductor, incluyendo la primera capa una capa de reactivo que incluye 1,72 a 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de un mediador y un sistema de enzima a una densidad de deposición desde 0,42 hasta 0,8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. La tira proporciona un valor determinado de concentración que tiene al menos uno de un sesgo de estabilidad inferior a $\pm 10\%$ después del almacenamiento a 50 °C durante 2 semanas cuando se compara con una tira de comparación almacenada a -20 °C durante 2 semanas, un sesgo de hematocrito inferior a $\pm 10\%$ para muestras de sangre completa que incluye desde 20 hasta 60 % de hematocrito, y una relación entre la ordenada en el origen y la pendiente de como máximo 20 mg/dL.

El primer y segundo electrodos de la tira pueden estar en sustancialmente el mismo plano y el segundo electrodo puede incluir la primera capa sobre un segundo conductor. El segundo electrodo puede incluir una segunda capa sobre el segundo conductor, y la segunda capa puede incluir una capa de reactivo diferente en composición de la capa de reactivo de la primera capa. Los electrodos se pueden separar más de 200 μm y se pueden separar de una porción superior de la tapa al menos 100 μm .

El espesor inicial promedio de la capa de reactivo de la tira puede ser inferior a 8 μm o puede ser desde 0,25 hasta 3 μm . La capa de reactivo de la tira se puede formar a una densidad de deposición de como máximo 0,2 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ a partir de una disolución de reactivo. La capa de reactivo puede incluir poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), hidroxietilencelulosa, carboximetilcelulosa, o una combinación de los mismos, como aglutinante polimérico. La densidad de deposición del aglutinante polimérico puede ser como máximo 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ sobre el primer conductor. El aglutinante polimérico puede ser parcialmente soluble en agua y/o puede formar un material de tipo gel con la hidratación.

La capa de reactivo incluye un sistema de enzima a una densidad de deposición desde 0,42 hasta 0,8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Puede incluir como máximo 1,3 unidades de enzima. La capa de reactivo sobre el electrodo de trabajo incluye 1,72 a 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador. El mediador puede ser un mediador de transferencia de dos electrones y puede ser 3-fenilimino-3H-fenotiazinas, 3-fenilimino-3H-fenoxazinas, sales de las mismas, ácidos de las mismas, derivados de las mismas, o sus combinaciones. El mediador puede tener un potencial redox de al menos 100 mV inferior al del ferricianuro.

La tira puede tener un sesgo de estabilidad inferior a $\pm 5\%$ después del almacenamiento a 50 °C durante 2 o 4 semanas cuando se compara con una tira de comparación almacenada a -20 °C durante 2 o 4 semanas, respectivamente. La tira puede tener un sesgo de hematocrito inferior a $\pm 5\%$ para muestras de sangre completa que incluye desde 20 hasta 60 % de hematocrito. La tira puede tener una relación entre la ordenada en el origen y la pendiente de como máximo 10 mg/dL o como máximo 1 mg/dL.

En otro aspecto, se proporciona un método de determinación de la concentración de un analito en una muestra con una tira de sensor electroquímica según la invención. El método incluye aplicar una secuencia de impulsos a la muestra, incluyendo la secuencia de impulsos al menos 3 ciclos de trabajo en el plazo de 30 segundos, y donde cada ciclo de trabajo comprende una excitación y una relajación. El método también incluye medir al menos una de las excitaciones; y determinar la concentración de analito en la muestra, donde la concentración tiene al menos uno de un sesgo de estabilidad inferior a $\pm 10\%$, un sesgo de hematocrito inferior a $\pm 10\%$ para muestras de sangre completa a lo largo de un intervalo de 20 a 60 % de hematocrito, y una relación entre la ordenada en el origen y la pendiente de como máximo 20 mg/dL.

El método puede incluir al menos 3 ciclos de trabajo en el plazo de 9 segundos y la secuencia de impulsos puede estar completa en como máximo 5 segundos. La determinación de la concentración de analito en la muestra puede incluir determinar la concentración de analito en la muestra a partir de una medición de corriente tomada en el plazo de 2 segundos desde la aplicación de la secuencia de pulsos. Cada ciclo de trabajo incluye una excitación y una relajación, donde cada excitación puede tener una duración desde 0,01 hasta 3 segundos. Las excitaciones pueden tener una duración sumada de como máximo 10 segundos o como máximo 2 segundos, y las excitaciones pueden tener amplitudes que difieren por 500 mV. Las excitaciones pueden ser como máximo 45 % del tiempo de la secuencia de impulsos. Las relajaciones pueden cada una tener una duración de al menos 0,2 segundos o pueden tener una duración de desde 0,2 hasta 3 segundos. La secuencia de impulsos puede incluir una excitación inicial desde 0,75 hasta 3 segundos de duración, donde esta excitación inicial es de duración más larga que las excitaciones de los ciclos de trabajo.

El método puede determinar una concentración que tiene un sesgo de estabilidad inferior a $\pm 5\%$ después del almacenamiento a 50 °C durante 2 o 4 semanas cuando se compara con una tira de comparación almacenada a -20 °C durante 2 o 4 semanas, respectivamente. La concentración puede tener un sesgo de hematocrito inferior a $\pm 5\%$ para muestras de sangre completa que incluye desde 20 hasta 60 % de hematocrito. La concentración puede tener una relación entre la ordenada en el origen y la pendiente de como máximo 10 mg/dL o como máximo 1 mg/dL.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se puede entender mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, haciendo énfasis en su lugar en ilustrar los principios de la invención. Además, en las figuras, números de referencia similares designan, en general, partes correspondientes en todas las vistas diferentes.

La FIG. 1A es una representación en perspectiva de una tira de sensor ensamblada.

La FIG. 1B es un diagrama en vista desde arriba de una tira de sensor, con la tapa quitada.

La FIG. 2A es un diagrama en vista desde un extremo de la tira de sensor de la FIG. 1B.

La FIG. 2B representa la transferencia de un único electrón por un mediador desde un sistema de enzima hasta un electrodo de trabajo.

La FIG. 2C representa la transferencia de dos electrones por un mediador desde un sistema de enzima hasta un electrodo de trabajo.

La FIG. 3 representa un método electroquímico de determinación de la presencia y concentración de un analito en una muestra.

Las FIGs. 4A-4D representan ejemplos de secuencias de impulsos amperométricos regulados donde múltiples ciclos de trabajo se aplicaron a la tira de sensor después de la introducción de la muestra.

Las FIGs. 5A y 5B representan las curvas de respuesta a dosis para tiras de sensor que incluyen el sistema de enzima PQQ-GDH al 20 %, 40 % y 55 % de nivel de hematocrito. Las curvas de respuesta de la FIG. 5B se

registraron con una tira de sensor según la invención, mientras que las curvas mostradas en la Fig. 5A se registraron con una tira de sensor a modo de ejemplo no según la invención.

La FIG. 5C presenta las relaciones I/S en mg/dL determinadas a partir de los datos experimentales.

5 La FIG. 5D muestra las relaciones I/S desde 0 hasta 20 mg/dL para múltiples concentraciones de glucosa determinadas de tiras de sensor que tienen composiciones de reactivo RC2, RC3 o RC4.

La FIG. 5E muestra el rendimiento de hematocrito casi idéntico de una tira de sensor a modo de ejemplo no según la invención del sistema con plasma y muestras de sangre completa de 40 % de hematocrito.

La FIG. 6A muestra el sesgo de estabilidad para cuatro composiciones de reactivo, en donde RC3 es según la invención, que incluye el sistema de enzima PQQ-GDH después de 2 semanas a 50 °C.

10 La FIG. 6B muestra el sesgo de estabilidad para cuatro composiciones de reactivo, en donde RC3 es según la invención, que incluye el sistema de enzima PQQ-GDH después de 4 semanas a 50 °C.

La FIG. 6C muestra el sesgo de estabilidad para tres composiciones de reactivo, en donde RC3 es según la invención, que incluye el sistema de enzima de PQQ-GDH después de 52 semanas a 25 °C bajo 80 % de humedad relativa.

15 La FIG. 6D muestra la varianza en el sesgo de estabilidad para tiras de sensor que incluyen RC2, que es un ejemplo no según la invención, donde el punto de datos usado para calcular la concentración de analito se tomó en momentos variables después de empezar el análisis.

La FIG. 7A representa la curva de respuesta a dosis de una tira de sensor a modo de ejemplo no según la invención para múltiples muestras de sangre completa.

20 La FIG. 7B representa la difusión del sesgo absoluto de hematocrito para cuatro lotes de fabricación de tiras de sensor a modo de ejemplo no según la invención obtenidas con múltiples muestras de sangre completa.

La FIG. 7C compara la sensibilidad del hematocrito entre tiras de sensor a modo de ejemplo no según la invención y tiras de sensor convencionales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 Los biosensores proporcionan a los pacientes el beneficio de medición casi instantánea de niveles de glucosa. Los errores en estas mediciones pueden ser atribuibles a una degradación de la composición de reactivo y/o al efecto del hematocrito. La degradación de la composición de reactivo es un proceso continuo que ocurre durante el periodo de tiempo que la tira de sensor se transporta y se almacena después de la fabricación. Múltiples factores pueden afectar la velocidad a la que se degrada la composición de reactivo, incluyendo la temperatura. El efecto del hematocrito surge cuando los glóbulos rojos afectan aleatoriamente la velocidad de difusión de especies medibles a la superficie conductora del electrodo de trabajo.

30 Reduciendo la cantidad de mediador y enzima usados sobre la tira de sensor, se puede aumentar la estabilidad a largo plazo de la composición de reactivo en relación con los biosensores y composiciones de reactivo convencionales. Así, se pueden mejorar el sesgo de estabilidad y las relaciones entre la ordenada en el origen y la pendiente de la tira de sensor. Además, combinando un método de análisis regulado con la composición de reactivo de estabilidad potenciada, se puede reducir el efecto del hematocrito. Así, según la presente invención, se pueden mejorar uno o cualquier combinación de estos y otros parámetros de rendimiento.

35 Los biosensores de la presente invención demuestran un sesgo de estabilidad de preferentemente inferior a $\pm 10\%$, más preferentemente inferior a $\pm 5\%$, después del almacenamiento a 50 °C durante 4 semanas cuando se compara con tiras de sensor almacenadas a -20 °C durante 4 semanas. Además, los biosensores de la presente invención demuestran un sesgo de hematocrito de preferentemente inferior a $\pm 10\%$, más preferentemente inferior a $\pm 5\%$ para muestras de WB que incluyen desde 20 hasta 60 % de hematocrito. Además, los biosensores de la presente invención demuestran preferentemente una relación entre la ordenada en el origen y la pendiente de como máximo 20 mg/dL, más preferentemente como máximo 10 mg/dL o como máximo 6 mg/dL, e incluso más preferentemente como máximo 1 mg/dL. Se pueden mejorar estos y otros parámetros de rendimiento de la tira de sensor.

40 Las FIGs. 1A y 1B representan una tira de sensor **100**, que se puede usar en la presente invención. La FIG. 1A es una representación en perspectiva de una tira de sensor ensamblada **100** que incluye una base de sensor **110**, al menos parcialmente cubierta por una tapa **120** que incluye un respiradero **130**, un área de cobertura de muestra **140** y una abertura de extremo de entrada **150**. Se forma un volumen parcialmente encerrado **160** (el hueco capilar o el hueco de la tapadera) entre la base **110** y la tapa **120**. También se pueden usar otros diseños de tira de sensor compatibles con la presente invención, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. N° 5.120.420 y 5.798.031.

50

Se puede transferir una muestra líquida para análisis en el hueco de la tapadera **160** introduciendo el líquido en la abertura **150**. El líquido llena el hueco de la tapadera **160** mientras que expulsa el aire previamente contenido a través del respiradero **130**. El hueco de la tapadera **160** puede contener una composición (no mostrada) que ayuda a retener la muestra líquida en el hueco de la tapadera. Los ejemplos de dichas composiciones incluyen polímeros hinchables en agua, tales como carboximetilcelulosa y polietilenglicol; y matrices de polímero poroso, tales como dextrano y poliacrilamida.

La FIG. 1B representa una vista desde arriba de la tira de sensor **100**, con la tapa **120** quitada. Los conductores **170** y **180** pueden estar tendidos debajo de una capa dieléctrica **190** desde la abertura **150** hasta un electrodo de trabajo **175** y un contraelectrodo **185**, respectivamente. En un aspecto, los electrodos de trabajo y contraelectrodos **175**, **185** pueden estar sustancialmente en el mismo plano, como se representa en la figura. En un aspecto relacionado, los electrodos de trabajo y contraelectrodos **175**, **185** se pueden separar más de 200 o 250 μm y se pueden separar de una porción superior de la tapa **120** al menos 100 μm . En otro aspecto, los electrodos de trabajo y contraelectrodos **175**, **185** se pueden separar menos de 200 μm . La capa dieléctrica **190** puede cubrir parcialmente los electrodos **175**, **185** y se pueden fabricar de cualquier material eléctrico adecuado, tal como un polímero aislante.

El contraelectrodo **185** puede soportar la actividad electroquímica en el electrodo de trabajo **175** de la tira de sensor **100**. En un aspecto, el potencial para soportar la actividad electroquímica en el electrodo de trabajo **175** se puede proporcionar al sistema de sensor formando el contraelectrodo **185** de un material inerte, tal como carbono, y que incluye una especie redox soluble, tal como ferricianuro, dentro del hueco de la tapadera **160**. En otro aspecto, el potencial en el contraelectrodo **185** puede ser un potencial de referencia logrado formando el contraelectrodo **185** a partir de un par redox, tal como Ag/AgCl, para proporcionar un contraelectrodo de referencia combinado. Alternativamente, la tira de sensor **100** se puede proporcionar con un tercer conductor y electrodo (no mostrados) para proporcionar un potencial de referencia al sistema de sensor.

La FIG. 2A representa un diagrama en vista desde un extremo de la tira de sensor representada en la FIG. 1B que muestra la estructura de capas del electrodo de trabajo **175** y el contraelectrodo **185**. Los conductores **170** y **180** se pueden encontrar directamente sobre la base **110**. Las capas conductoras superficiales **270** y **280** se pueden depositar opcionalmente sobre los conductores **170** y **180**, respectivamente. Las capas conductoras superficiales **270**, **280** se pueden fabricar del mismo material o de materiales diferentes.

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 forma que el material no experimente una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis de la muestra. Los conductores **170**, **180** incluyen preferentemente una fina capa de una pasta de metal o metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre, o tungsteno. Las capas conductoras superficiales **270**, **280** incluyen preferentemente carbono, oro, platino, paladio, o combinaciones de los mismos. Si una capa conductora superficial no está presente sobre un conductor, el conductor se fabrica preferentemente de un material no ionizante.

El material conductor superficial se puede depositar sobre los conductores **170**, **180** por cualquier medio convencional compatible con la operación de la tira de sensor, que incluye deposición de lámina, deposición química de vapor, deposición de suspensión, y similares. En el caso de deposición de suspensión, la mezcla se puede aplicar como una tinta a los conductores **170**, **180**, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.798.031.

Las capas de reactivo **275** y **285** se pueden depositar sobre los conductores **170** y **180**, respectivamente. Las capas se forman a partir de al menos una composición de reactivo que incluye reactivos y opcionalmente un aglutinante. El aglutinante es preferentemente un material polimérico que es al menos parcialmente soluble en agua. En un aspecto, el aglutinante puede formar un gel o material de tipo gel cuando se hidrata por la muestra. En otro aspecto, el aglutinante puede filtrar glóbulos rojos.

Los materiales poliméricos adecuados parcialmente solubles en agua para su uso como el aglutinante pueden incluir poli(óxido de etileno) (PEO), carboximetilcelulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa, etilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, tales como polilisina, poli(sulfonato de estireno), gelatina, ácido acrílico, ácido metacrílico, almidón, anhídrido maleico, sales de los mismos, derivados de los mismos, y combinaciones de los mismos. Entre los materiales aglutinantes anteriores, se prefieren PEO, PVA, CMC y HEC, siendo actualmente la CMC la más preferida.

Además del aglutinante, las capas de reactivo **275** y **285** pueden incluir los mismos reactivos o reactivos diferentes. Cuando se incluyen los mismos reactivos, las capas de reactivo **275** y **285** pueden ser la misma capa. En un aspecto, los reactivos presentes en la primera capa **275** se pueden seleccionar para su uso con el electrodo de trabajo **175**, mientras que los reactivos presentes en la segunda capa **285** se pueden seleccionar para su uso con el contraelectrodo **185**. Por ejemplo, los reactivos en la capa **285** pueden facilitar el flujo libre de electrones entre la muestra y el conductor **180**. Similarmente, los reactivos en la capa **275** pueden facilitar la reacción del analito.

La capa de reactivo **275** incluye un sistema de enzima específico para el analito que puede facilitar la reacción del analito mientras que potencia la especificidad del sistema de sensor por el analito, especialmente en muestras

biológicas complejas. El sistema de enzima puede incluir una o más enzimas, cofactores, y/u otros restos que participan en la reacción redox con el analito. Por ejemplo, se pueden usar una alcohol oxidasa para proporcionar una tira de sensor que es sensible a la presencia de alcohol en una muestra. Dicho sistema podría ser útil en la medición de concentraciones de alcohol en sangre. En otro ejemplo, se pueden usar glucosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa para proporcionar una tira de sensor que es sensible a la presencia de glucosa en una muestra. Este sistema podría ser útil en medir concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo en pacientes que se sabe o se sospecha que tienen diabetes.

Las enzimas para su uso en el sistema de enzima incluyen alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, β -hidroxibutirato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Los sistemas de enzima preferibles son independientes del oxígeno, así no se oxidan sustancialmente por el oxígeno.

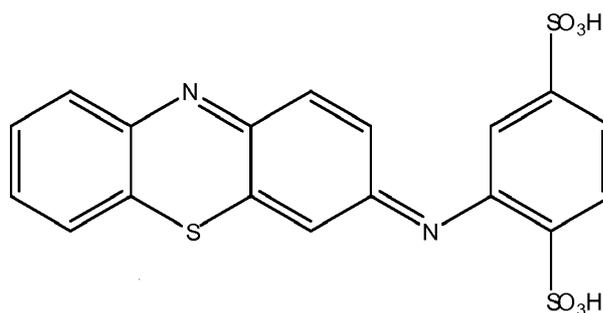
Dicha familia de enzimas independiente de oxígeno es la glucosa deshidrogenasa (GDH). Usando diferentes coenzimas o cofactores, la GDH puede ser mediada en un modo diferente por diferentes mediadores. Dependiendo de su asociación con GDH, un cofactor, tal como flavina adenina dinucleótido (FAD), puede ser fuertemente retenido por la enzima hospedadora, tal como en el caso de FAD-GDH; o un cofactor, tal como pirroloquinolinquinona (PQQ), se puede unir covalentemente a la enzima hospedadora, tal como con PQQ-GDH. El cofactor en cada uno de estos sistemas de enzima puede ser o bien permanentemente retenido por la enzima hospedadora, o la coenzima y la apo-enzima se pueden reconstituir antes de añadir el sistema de enzima a la composición de reactivo. La coenzima también se puede añadir independientemente al resto de enzima hospedadora en la composición de reactivo para ayudar en la función catalítica de la enzima hospedadora, tal como en los casos de nicotinamida adenina dinucleótido NAD/NADH⁺ o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADP/NADPH⁺.

La capa de reactivo **275** también incluye un mediador para comunicar más eficazmente los resultados de la reacción del analito al conductor superficial **270** y/o al conductor **170**. Los mediadores se pueden separar en dos grupos basándose en su actividad electroquímica. Los mediadores de transferencia de un electrón son restos químicos capaces de aceptar un electrón adicional durante las condiciones de la reacción electroquímica, mientras que los mediadores de transferencia de dos electrones son restos químicos capaces de aceptar dos electrones adicionales durante las condiciones de la reacción. Como se representa en la FIG. 2B, los mediadores de transferencia de un electrón pueden transferir un electrón desde la enzima hasta el electrodo de trabajo, mientras que como se representa en la FIG. 2C, los mediadores de transferencia de dos electrones pueden transferir dos electrones.

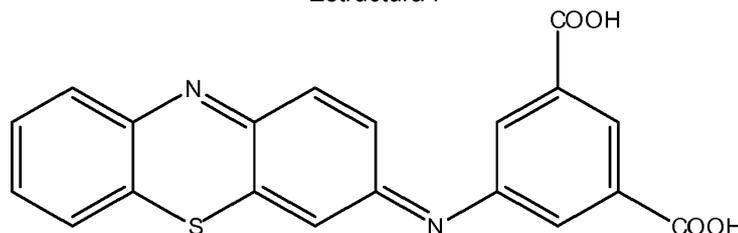
Aunque se pueden usar otros mediadores, se prefieren los mediadores de transferencia de dos electrones debido a su capacidad para transferir aproximadamente el doble de electrones del sistema de enzima al electrodo de trabajo para la misma cantidad molar de mediador en relación con los mediadores de transferencia de un electrón. Reduciendo la cantidad de mediador requerido por el sensor para rendir en relación con las tiras de sensor convencionales, las tiras de sensor de la presente invención pueden demostrar un aumento en la estabilidad a largo plazo. Este aumento de estabilidad puede ser atribuible a una reducción en la desnaturalización enzimática por el mediador durante el almacenamiento. El aumento de estabilidad también puede ser atribuible a una reducción en la cantidad de mediador disponible para oxidar la enzima durante el almacenamiento.

Los ejemplos de los mediadores de transferencia de un electrón incluyen compuestos, tales como 1,1'-dimetilferroceno, ferrocianuro y ferricianuro, y hexaamina de rutenio (III) y rutenio (II). Los mediadores de dos electrones incluyen las quinonas e hidroquinonas orgánicas, tales como fenantrolinquinona; fenotiazina y derivados de fenoxazina; 3-(fenilamino)-3H-fenoxazinas; fenotiazinas; y 7-hidroxi-9,9-dimetil-9H-acridin-2-ona y sus derivados. Los ejemplos de mediadores de dos electrones adicionales incluyen las moléculas orgánicas electroactivas descritas en las patentes de EE.UU. N° 5.393.615; 5.498.542; y 5.520.786, por ejemplo.

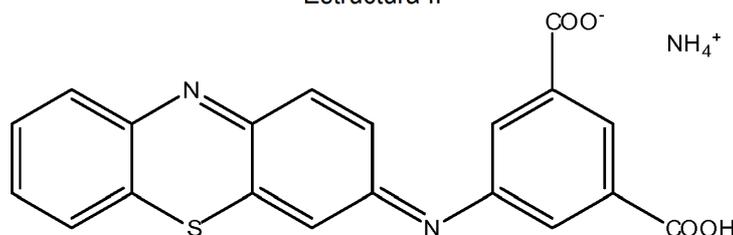
Los mediadores de transferencia de dos electrones preferidos incluyen 3-fenilimino-3H-fenotiazinas (PIPT) y 3-fenilimino-3H-fenoxazinas (PIPO). Los mediadores de dos electrones más preferidos incluyen el ácido carboxílico o la sal, tal como sales de amonio, de derivados de fenotiazina. Actualmente, los mediadores de dos electrones especialmente preferidos incluyen ácido (E)-2-(3H-fenotiazin-3-ilidenamino)benzeno-1,4-disulfónico (Estructura I), ácido (E)-5-(3H-fenotiazin-3-ilidenamino)isofáltico (Estructura II), (E)-3-(3H-fenotiazin-3-ilidenamino)-5-carboxibenzoato de amonio (Estructura III), y sus combinaciones. Las fórmulas estructurales de estos mediadores se presentan a continuación.



Estructura I



Estructura II



Estructura III

5 En otro respecto, los mediadores de dos electrones preferidos tienen un potencial redox que es al menos 100 mV más bajo, más preferentemente al menos 150 mV más bajo, que el ferricianuro.

Las capas de reactivo **275**, **285** se pueden depositar por cualquier medio conveniente, tal como impresión, deposición de líquido, o deposición por chorro de tinta. En un aspecto, las capas se depositan por impresión. Con otros factores siendo iguales, el ángulo de la cuchilla de impresión puede afectar inversamente el espesor de las capas de reactivo. Por ejemplo, cuando la cuchilla se mueve a un ángulo de aproximadamente 82° con respecto a la base **110**, la capa puede tener un espesor de aproximadamente 10 μm. Similarmente, cuando se usa un ángulo de cuchilla de aproximadamente 62° con respecto a la base **110**, se puede producir una capa 30 μm más gruesa. Así, ángulos de cuchilla más bajos pueden proporcionar capas más gruesas de reactivo. Además del ángulo de cuchilla, otros factores, tales como la viscosidad del material que se aplica, así como el tamaño del tamiz y la combinación de emulsión, pueden afectar el espesor resultante de las capas de reactivo **275**, **285**.

15 Cuando se prefieren capas de reactivo más finas, se pueden requerir métodos de deposición distintos de la impresión, tales como micro-pipeteado, chorro de tinta, o deposición con agujas. Estos métodos de deposición dan, en general, a las de reactivo secas un espesor de micrómetros o inferior a micrómetros, tal como 1 - 2 μm. Por ejemplo, los métodos de deposición con agujas pueden proporcionar espesores promedio de capas de reactivo de 1 μm. El espesor de la capa de reactivo resultante de la deposición con agujas, por ejemplo, se puede controlar por la cantidad de polímero incluido en la composición de reactivo, proporcionando mayor contenido de polímero capas de reactivo más gruesas. Las capas de reactivo más finas pueden requerir anchuras de impulsos más cortas que las capas de reactivo más gruesas para mantener el rendimiento de medición deseado y/o miden sustancialmente analito dentro de la capa de barrera de la difusión (DBL).

25 El electrodo de trabajo **175** también puede incluir una DBL que es integrante de una capa de reactivo **275** o que es una capa distinta **290**, tal como se representa en la FIG. 2A. Así, la DBL se pueden formar como una combinación reactivo/DBL sobre el conductor, como una capa distinta sobre el conductor, o como una capa distinta sobre la capa de reactivo. Cuando el electrodo de trabajo **175** incluye la DBL distinta **290**, la capa de reactivo **275** puede o puede no residir sobre la DBL **290**. En lugar de residir sobre la DBL **290**, la capa de reactivo **275** puede residir sobre cualquier porción de la tira de sensor **100** que permite que el reactivo se solubilice en la muestra. Por ejemplo, la capa de reactivo **175** puede residir sobre la base **110** o sobre la tapa **120**.

La DBL proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno donde puede residir una especie medible. Los poros de la DBL se pueden seleccionar de manera que las especies medibles puedan difundir en la DBL, mientras que constituyentes de muestra físicamente más grandes, tales como RBCs, se excluyen sustancialmente. Aunque las tiras de sensor convencionales han usado diversos materiales para filtrar RBCs de la superficie del electrodo de trabajo, una DBL proporciona un espacio poroso interno para contener y aislar una porción de las especies medibles de la muestra.

Cuando la capa de reactivo **275** incluye un aglutinante soluble en agua, cualquier porción del aglutinante que no se solubilice en la muestra antes de la aplicación de una excitación puede funcionar como una DBL integral. El espesor inicial promedio de una combinación DBL/capa de reactivo es preferentemente inferior a 16 u 8 micrómetros (μm) y más preferentemente inferior a 4 μm . Actualmente, un espesor inicial promedio especialmente preferido de una combinación DBL/capa de reactivo es desde 0,25 hasta 3 μm o desde 0,5 hasta 2 μm . El espesor inicial promedio deseado de una combinación DBL/capa de reactivo se puede seleccionar para una longitud de excitación específica basándose en cuándo llega a ser relativamente constante la velocidad de difusión de las especies medibles de la DBL a una superficie conductora, tal como la superficie del conductor **170** o la superficie del conductor superficial **270** de la FIG. 2A. En un aspecto, la DBL/capa de reactivo puede tener un espesor inicial promedio de 1 μm o menos cuando se combina con una anchura de los impulsos de excitación de 0,25 segundos o menos.

La DBL distinta **290** puede incluir cualquier material que proporcione el espacio de poros deseado, mientras que sea parcialmente o lentamente soluble en la muestra. En un aspecto, la DBL distinta **290** puede incluir un material aglutinante de reactivo que carece de reactivos. La DBL distinta **290** puede tener un espesor inicial promedio de desde 1 hasta 15 μm , y más preferentemente desde 2 hasta 5 μm .

La FIG. 3 representa un análisis electroquímico **300** para determinar la presencia y opcionalmente la concentración de un analito **322** en una muestra **312**. En **310**, la muestra **312** se introduce a una tira de sensor **314**, tal como la tira de sensor representada en las FIGs. 1A-1B y 2A. Las capas de reactivo, tales como **275** y/o **285** de la FIG. 2A, empiezan a solubilizarse en la muestra **312**, permitiendo así la reacción.

En este momento en el análisis, puede ser beneficioso proporcionar un retardo de tiempo inicial, o "periodo de incubación", para que los reactivos reaccionen con la muestra **312**. Preferentemente, el retardo de tiempo inicial puede ser desde 0,5 hasta 5 segundos. Se puede encontrar un tratamiento más en profundidad de los retardos de tiempo inicial en las patentes de EE.UU. Nº 5.620.579 y 5.653.863.

Durante la reacción, una porción del analito **322** presente en la muestra **312** se oxida o reduce química o bioquímicamente en **320**, tal como por una oxidorreductasa. Tras la oxidación o reducción, los electrones se pueden transferir entre el analito **322** y un mediador **332** en **330**, tal como a través de la oxidorreductasa.

En **340**, el mediador cargado **332** se excita (oxida o reduce) electroquímicamente. Por ejemplo, cuando la muestra **312** es sangre completa que contiene glucosa oxidada por el sistema de enzima PQQ-GDH en **320**, que entonces transfiere dos electrones para reducir un mediador de derivado de fenotiazina en **330**, la excitación de **340** oxida el mediador de derivado de fenotiazina en el electrodo de trabajo. De este modo, los electrones se transfieren selectivamente desde el analito de glucosa hasta el electrodo de trabajo de la tira de sensor donde se pueden detectar por un dispositivo de medición.

La corriente resultante de la excitación **340** se puede registrar durante la excitación **340** en función del tiempo en **350**. En **360**, la muestra experimenta relajación. Preferentemente, la corriente no se registra durante la relajación **360**. Se pueden analizar los valores de corriente y tiempo registrados para determinar la presencia y/o concentración del analito **322** en la muestra **312** en **370**.

Los sistemas sensores amperométricos aplican un potencial (tensión) a la tira de sensor para excitar las especies medibles mientras que se monitoriza la corriente (amperaje). Los sistemas sensores amperométricos convencionales pueden mantener el potencial mientras que miden la corriente durante una duración de impulsos de lectura continuos de desde 5 hasta 10 segundos, por ejemplo. A diferencia de los métodos convencionales, los ciclos de trabajo usados en el análisis electroquímico **300** sustituyen los impulsos de lectura continuos de larga duración con múltiples excitaciones y relajaciones de corta duración. Una descripción más detallada de las múltiples secuencias de impulsos de excitación y relajación o "reguladas" se puede encontrar en el documento de patente PCT/US2006/028013, presentado el 19 de julio de 2006, titulado "Gated Amperometry".

Con referencia a la FIG. 3, la excitación **340**, el registro **350** y la relajación **360** constituyen un único ciclo de trabajo. Preferentemente, se aplican al menos 2, 4, 6 o 7 ciclos de trabajo durante un periodo de tiempo 3, 5, 7, 9 o 14 segundos independientemente seleccionado. En un aspecto, los ciclos de trabajo se aplican durante un periodo de tiempo de 3 a 14 segundos. En otro aspecto, se aplican al menos 4 ciclos de trabajo en el plazo de 30 segundos, 9 segundos, o menos. En otro aspecto, se pueden aplicar desde 2 hasta 6 ciclos de trabajo en el plazo de 10 segundos o menos. En otro aspecto, se pueden aplicar desde 2 hasta 4 ciclos de trabajo en el plazo de 3 a 9 segundos.

Después de la excitación **340**, en **360**, el dispositivo de medición puede abrir el circuito a través de la tira de sensor **314**, permitiendo así que el sistema se relaje. Durante la relajación **360**, la corriente presente durante la excitación **340** se reduce sustancialmente al menos la mitad, preferentemente en un orden de magnitud, y más preferentemente hasta cero. Preferentemente, se proporciona un estado de corriente cero por un circuito abierto u otro método conocido por los expertos habituales en la técnica para proporcionar un flujo de corriente de sustancialmente cero. En un aspecto, la relajación **360** es al menos 0,5 o al menos 0,2 segundos de duración. En otro aspecto, la relajación **360** es desde 0,2 hasta 3 segundos, o desde 0,5 hasta 1 segundo de duración.

Las FIGs. 4A-4D representan ejemplos de secuencias de impulsos amperométricos regulados donde se aplicaron múltiples ciclos de trabajo a la tira de sensor después de la introducción de la muestra. En estos ejemplos, se usaron impulsos de onda cuadrada; sin embargo, también se pueden usar otros tipos de ondas compatibles con el sistema de sensor y la muestra de prueba.

Cada secuencia de impulsos representada incluye un impulso de excitación inicial de un segundo **420** seguido por múltiples excitaciones de 0,25 segundos **430**. El impulso de excitación inicial **420** puede ser de duración más larga que las excitaciones posteriores **430**. Por ejemplo, el impulso de excitación inicial **420** puede variar desde 0,75 hasta 3 segundos de duración. La longitud del pulso de excitación **420** se puede ajustar para oxidar la cantidad relativamente pequeña del sistema de enzima depositado sobre la tira. Cuando se usa el impulso de excitación inicial **420**, es preferentemente de mayor duración que las siguientes múltiples excitaciones **430**. Por ejemplo, la secuencia de impulsos puede incluir el impulso de excitación inicial **420** que tiene una duración de 2 segundos, seguido por una relación de circuito abierto de 3 segundos, seguido por la posterior excitación **430** que tiene una duración de 0,125 segundos.

Las múltiples excitaciones **430** pueden variar desde 0,01 hasta 3 segundos de duración. En un aspecto, la longitud de excitación total es dos segundos o menos, incluyendo así el impulso inicial de un segundo **420**, seguido por cuatro de las excitaciones de 0,25 segundos **430**. En otro aspecto, la longitud de excitación total es 1,5 segundos o menos, incluyendo así el impulso inicial de un segundo **420** seguido por una o dos de las excitaciones de 0,25 segundos **430**. La secuencia de impulsos puede incluir excitaciones adicionales, tales como la excitación **440** representada en la FIG. 4A. En otro aspecto, las excitaciones pueden ser de diferentes amplitudes, tal como se representa en las FIGs. 4C y 4D. En un aspecto preferido, cuando se usan excitaciones de diferentes amplitudes, la diferencia en las amplitudes puede estar dentro de 500 mV.

Las excitaciones cortas pueden permitir el análisis preciso de la muestra con composiciones de reactivo que tienen concentraciones reducidas de polímero, sistema de enzima y mediador en relación con las composiciones convencionales. Además, las cortas excitaciones permiten que el análisis se complete en el plazo de 8,5 segundos o menos, o más preferentemente, 5 segundos o menos, desde la aplicación inicial de una señal a la tira de sensor.

Se pueden usar ya sea excitaciones cortas o largas. Preferentemente, la medición de corriente de la que se determina la concentración de analito se toma en el plazo de 2 segundos o 1 segundo desde la aplicación inicial de la señal. Más preferentemente, se combinan múltiples excitaciones cortas con una medición de corriente tomada en el plazo de 2 segundos, 1 segundo, o menos desde la aplicación inicial de la señal para determinar la concentración de analito de la muestra.

En combinación con las secuencias de impulsos amperométricos regulados de la presente invención, se encontró que las composiciones de reactivo que incluyen cantidades específicas de aglutinante polimérico, sistema de enzima y/o mediador reducían el sesgo de hematocrito y/o aumentaban la estabilidad a largo plazo. Mientras que las tiras convencionales se describen frecuentemente en términos del porcentaje de cada componente de la composición de reactivo, es la densidad de cada ingrediente de la composición de reactivo (cantidad absoluta por área) la que es relevante para la estabilidad a largo plazo. Limitando la cantidad de mediador y enzima disponible para la interacción, se puede reducir sustancialmente la cantidad de mediador medioambientalmente reducido (mediador no sensible a la concentración de analito subyacente) presente en el momento del análisis. Así, se proporciona una reducción beneficiosa en la corriente de fondo. Como los biosensores convencionales usan exceso de enzima en un intento por mejorar la estabilidad a largo plazo, fue inesperado que una reducción en el sistema de enzima y/o mediador proporcionara una mejora en la estabilidad a largo plazo para los presentes biosensores. Además, si se optimizan composiciones individuales de reactivo para cada electrodo, la cantidad relativa de mediador disponible para interactuar con la enzima se puede reducir adicionalmente en relación con las tiras de sensor de composición de reactivo único.

Por ejemplo, los sesgos de hematocrito fueron mayores con las mayores concentraciones de polímero de 2 %, 1,5 %, y 1 % que con una concentración de polímero de 0,5 % (p/p) en la disolución de reactivo cuando se usa una alta carga de enzima. Esto puede ser atribuible a las mayores concentraciones de polímero que producen capas de reactivo más gruesas que afectan el sesgo de hematocrito con la rehidratación. Así, como los tiempos de ensayo se vuelven más cortos, se puede preferir la rápida rehidratación sin un aumento en el sesgo de hematocrito. De este modo, se puede alcanzar un equilibrio preferible entre el contenido de polímero y la carga de enzima de la composición de reactivo para proporcionar el nivel de hidratación deseado durante el tiempo del ensayo. Cuando se

aplica a la tira de sensor, se puede preferir la densidad de polímero de las deposiciones de $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ o menos, siendo las densidades de deposición de polímero desde $0,8$ hasta $1,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ las más preferidas.

5 Cuando se depositan diferentes disoluciones de deposición sobre los electrodos de trabajo y contraelectrodos, se controla la cantidad del sistema de enzima presente sobre el electrodo de trabajo. Así, el depositar aproximadamente $0,24 \mu\text{L}$ de una disolución que incluye $1,2 \text{ U}$ del sistema de enzima PQQ-GDH, $2,57 \mu\text{g}$ del mediador de Estructura I, $1,18 \mu\text{g}$ del polímero de CMC y $3,28 \mu\text{g}$ de tampón fosfato proporciona una concentración de disolución de reactivo de $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ de sistema de enzima, mediador 24 mM , $0,5 \%$ de polímero y tampón fosfato 100 mM .

10 El depositar esta disolución de reactivo sobre un área de deposición de $1,5 \text{ mm}^2$ que incluye un área de electrodo de trabajo de 1 mm^2 proporciona una densidad de deposición del sistema de enzima en el electrodo de trabajo de aproximadamente $0,8 \text{ U}/\text{mm}^2$ ($1,2 \text{ U}/1,5 \text{ mm}^2$), una densidad de deposición de mediador de $1,72 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($2,57 \mu\text{g}/1,5 \text{ mm}^2$), una densidad de deposición de polímero de $0,8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ y una densidad de deposición de tampón fosfato de $2,2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Similarmente, para una disolución de reactivo que incluye aproximadamente $2 \text{ U}/\mu\text{L}$ del sistema de enzima PQQ-GDH, 24 mM del mediador de Estructura I, $0,5 \%$ de CMC y tampón fosfato 100 mM , la densidad de deposición del sistema de enzima será aproximadamente $0,3 \text{ U}/\text{mm}^2$. Además, la actividad específica de un sistema de enzima se puede traducir en densidad en peso en términos de $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Por ejemplo, si la actividad de un sistema de enzima es $770 \text{ U}/\text{mg}$, la densidad de la actividad del sistema de enzima de $0,3 \text{ U}/\text{mm}^2$ es $0,39 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ en densidad en peso. Así, se puede tener en cuenta la actividad de un sistema de enzima cuando se determina la densidad de deposición para el sistema de enzima.

20 Las capas de reactivo convencionales incluyen densidades de deposición de enzima de 1 a $6 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. A diferencia, después de la deposición, las composiciones de reactivo de la presente invención incluyen densidades de deposición del sistema de enzima entre $0,42$ y $0,8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Las disoluciones de deposición de la presente invención pueden incluir aproximadamente $4 \text{ U}/\mu\text{L}$ o menos del sistema de enzima o pueden incluir aproximadamente $3 \text{ U}/\mu\text{L}$ o menos del sistema de enzima. Actualmente, se pueden incluir $2,2 \text{ U}/\mu\text{L}$ o menos del sistema de enzima PQQ-GDH en la disolución de reactivo. Así, cuando la composición de reactivo se aplica a la tira de sensor, pueden estar presentes $1,3$ unidades o menos del sistema de enzima sobre la tira de sensor, siendo más preferidas $0,3$ a $0,8$ unidades.

30 Las tiras de sensor convencionales tienen, en general, densidades de deposición de mediador que varían desde 10 hasta $25 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. A diferencia, una capa de reactivo según la invención comprende desde $1,72$ hasta $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de un mediador. En un aspecto preferido, son preferibles los mediadores de dos electrones a los mediadores de un electrón.

35 La Tabla I, a continuación, proporciona las densidades de deposición de los componentes aglutinante polimérico, tampón, sistema de enzima y mediador en las composiciones de reactivo usadas en las FIGs. 5A-5E y FIGs. 6A-6C, tratadas más adelante. La densidad de deposición del sistema de enzima para la composición de reactivo 3 (RC3) a $0,42 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ es casi 60% inferior al valor de $1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ más bajo de las tiras convencionales previamente tratadas. Entre RC1, RC2, RC3 y RC4 de la Tabla I, solo RC3 es según la presente invención.

40 Similarmente, las densidades de mediador dadas en la Tabla I son aproximadamente un orden de magnitud más pequeñas que las de las tiras de sensor convencionales. Por ejemplo, la densidad de deposición del mediador de RC3 fue aproximadamente un quinto al de una tira de sensor convencional. Esta reducción en la densidad de deposición del mediador en relación con las tiras de sensor convencionales puede proporcionar un aumento sustancial en la estabilidad a largo plazo de RC3, que es una composición de reactivo según la presente invención.

Tabla I

	CMC, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	Tampón, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	PQQ/GDH, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	Mediador, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$
RC1	1,59	2,17	3,99	1,72
RC2	0,79	2,19	1,07	1,72
RC3	0,79	2,19	0,42	1,72
RC4	0,77	2,22	0,99	1,36

45 La FIG. 5A representa las curvas de respuesta a dosis de glucosa a diferentes niveles de hematocrito en muestras de WB para la tira de sensor RC2 que incluyó $1,2$ unidades por sensor (U/sensor) a una densidad de deposición de $0,8 \text{ U}/\text{mm}^2$ de la enzima PQQ-GDH. La FIG. 5B representa las curvas de respuesta a dosis de glucosa a diferentes

niveles de hematocrito en muestras de WB para la tira de sensor RC3 que incluyó 0,5 U/sensor a una densidad de deposición de 0,3 U/mm² de la enzima PQQ-GDH. Tanto los sensores de 1,2 U como 0,5 U suministraron sesgos de hematocrito inferiores a ± 5 %. Sin embargo, se observó una diferencia entre los sensores de 1,2 U y 0,5 U con respecto a la sensibilidad del sistema y ordenada en el origen.

5 Se puede observar una reducción en la relación entre la ordenada en el origen y la pendiente para 0,5 U/sensor de la FIG. 5B que compara las relaciones entre la ordenada en el origen y la pendiente (I/S), expresadas en unidades de mg/dL, con las de 1,2 U/sensor de la FIG. 5A, representando relaciones más bajas una reducción en la señal de fondo. Así, la relación I/S para 1,2 U/sensor de la FIG. 5A es ~6 mg/dL, mientras que la relación I/S para 10 0,5 U/sensor de la FIG. 5B es ~0,15 mg/dL, una reducción de aproximadamente 40 veces al 40 % de concentración de hematocrito. Se estableció el rendimiento superior de la señal de fondo del sensor de 0,5 U en relación con un sensor de 1,5 U.

En un aspecto, la característica de rendimiento de bajo fondo (baja ordenada en el origen) se puede proporcionar por densidades de deposición de mediador y de enzima relativamente bajas. En otro aspecto, la característica de rendimiento de alta sensibilidad (alta pendiente) se puede proporcionar optimizando la relación de sincronización de las excitaciones y relajaciones de la secuencia de impulsos. Por ejemplo, el combinar un periodo de relajación relativamente largo de 1,5 segundos con un periodo de excitación relativamente corto de 0,25 segundos proporciona una gran densidad de corriente en la superficie del electrodo de trabajo. Numéricamente, el valor relativamente pequeño de la ordenada en el origen con respecto al valor relativamente grande mejora adicionalmente I/S. Así, se pueden proporcionar características de rendimiento de sensor preferibles (valores I/S pequeños) por la composición de reactivo y el método de medición en combinación.

La Ecuación (1), a continuación, proporciona una relación analítica entre la imprecisión de la corriente y la imprecisión resultante en la concentración de glucosa determinada en función de la relación I/S cuando la relación de glucosa y corriente es $i = S \cdot G + Int$:

$$\frac{\Delta G / G}{\Delta i / i} = \frac{SD_G / G}{SD_i / i} = \frac{\%CV_G}{\%CV_i} = 1 + \frac{1}{G} \frac{Int}{S} \quad (1),$$

25 donde G indica la concentración de glucosa, $\Delta G/G$ es el error relativo de la concentración de glucosa en mg/dL, $\Delta i/i$ es el error relativo de la corriente medida, SD_G/G es la desviación estándar relativa en $\Delta G/G$, SD_i/i es la desviación estándar relativa en $\Delta i/i$, $\%CV_G$ es el coeficiente de varianza, que es proporcional a la desviación estándar relativa y representa la precisión de la medición de glucosa, $\%CV_i$ es el coeficiente de varianza, que es proporcional a la desviación estándar relativa y representa la precisión de la medición de corriente, y Int/S es la relación entre la ordenada en el origen y la pendiente (I/S) en mg/dL. La ecuación (1) puede derivar de $i = S \cdot G + Int$ tomando la derivada de la función inversa $G = f(i) = (i - Int)/S$ en la derivación y análisis de la propagación del error. Debido al término $1 + 1/G$, una imprecisión de corriente de 1 da como resultado una imprecisión de la concentración de glucosa superior a 1 si el valor I/S es mayor que cero. Las relaciones entre la ordenada en el origen y la pendiente (I/S) expresadas en mg/dL se pueden expresar en términos de milimoles/Litro (mM/L) dividiendo el valor de I/S (mg/dL) entre 18 ([mg/dL]/18 = [mM]) para glucosa).

La imprecisión de la corriente describe la varianza entre las mediciones de corriente de múltiples tiras de sensor. Así, la imprecisión de la corriente representa la cantidad que se diferencia un valor de corriente registrado del valor promedio de corriente cuando se analizan muestras idénticas de glucosa usando múltiples tiras de sensor. Cuanto más se desvía un valor de corriente registrado de una tira particular del valor promedio para múltiples tiras, peor se correlaciona la corriente registrada de esa tira con la concentración real de glucosa de la muestra. Así, la precisión de la medición de corriente se puede medir por su imprecisión o $\%CV_i$, y la precisión de la medición de glucosa también se puede medir por su imprecisión o $\%CV_G$.

La Tabla II, a continuación, proporciona pendientes (valores 1/G) calculadas con la Ecuación (1) a partir de múltiples concentraciones de glucosa en mg/dL. Así, $1/57,6 = 0,0174$, $1/111 = 0,009$, $1/222,25 = 0,0045$, $1/444,75 = 0,0022$, y $1/669 = 0,0015$, donde los denominadores son las concentraciones de glucosa en plasma probadas. A medida que aumenta la concentración de glucosa, disminuye el valor de la pendiente según la Ecuación (1).

Tabla II

Concentración de glucosa en mg/dL	Relación I/S calculada a partir de la Ecuación (1)	Relación I/S experimentalmente determinada
57,6	0,0174	0,0174
111	0,009	0,009
222,25	0,0045	0,0045

444,75	0,0022	0,0022
669	0,0015	0,0015

La FIG. 5C presenta las relaciones I/S en mg/dL determinadas a partir de datos experimentales. Se obtuvieron los valores de corriente con secuencias de impulsos amperométricos regulados de las muestras de WB que incluyen 40 % de hematocrito y concentraciones de glucosa de 57,6, 111, 222,25, 444,75 o 669 mg/dL. Las constantes de calibración se determinaron a 4, 5,5, 7, 8,5, 10, 11,5, 13 y 14,5 segundos en el análisis. Como se puede apreciar de la tabla, los valores calculados y experimentalmente determinados son los mismos, confirmando la capacidad de la Ecuación (1) para describir el comportamiento de la tira de sensor con relación a la impresión de glucosa y corriente.

Para bajas concentraciones de glucosa, tales como 50 mg/dL e inferiores, es preferible mantener un valor de I/S bajo para reducir la imprecisión introducida en la concentración de glucosa determinada a partir de la imprecisión subyacente en el valor de corriente registrado. Por ejemplo, si la relación I/S es 50 mg/dL y la concentración de glucosa es 50 mg/dL, entonces la relación de $\%CV_G/\%CV_I$ es 2 [$1+(I/S)/G = 1 + 50/50 = 2$], y cualquier imprecisión de corriente se amplificará en un factor de 2 en la concentración de glucosa determinada. Así, si la imprecisión típica en los valores de corriente registrados es 3,5 %, un sistema que tiene una relación I/S de 50 mg/dL da como resultado una imprecisión de glucosa de 7 %.

La FIG. 5D muestra relaciones I/S desde 0 hasta 20 mg/dL para concentraciones de glucosa de 55,375, 112,25 y 433,5 mg/dL determinadas a partir de tiras de sensor que tienen composiciones de reactivo RC2, RC3 o RC4 de la Tabla I, anteriormente. Como las relaciones de I/S disminuyen desde 20, también disminuye la imprecisión asociada a la concentración de glucosa determinada. Así, se demuestra que se prefieren relaciones de I/S más bajas a concentraciones de glucosa más bajas, como se ha tratado previamente.

Cuando se consideran cada uno de estos factores, se prefieren las tiras de sensor que tienen una relación I/S de 20 mg/dL o menos, siendo más preferidas las que tienen relaciones I/S de 10 mg/dL o menos o 6 mg/dL o menos. Actualmente, son incluso más preferidas las tiras que tienen una relación I/S de 1 mg/dL o menos.

La FIG. 5E muestra el rendimiento de hematocrito casi idéntico de un sistema de sensor usado con muestras de sangre completa de plasma y 40 % de hematocrito. En este ejemplo, la composición de reactivo de la tira de sensor fue RC2, como se describe en la Tabla I, anteriormente. Así, las secuencias de impulsos reguladas en combinación con las composiciones de reactivo proporcionan una reducción sustancial en el efecto de hematocrito observado para muestras de WB.

La FIG. 6A muestra el efecto del estrés medioambiental sobre la estabilidad a largo plazo de las tiras de sensor. El eje Y del gráfico muestra el sesgo de estabilidad absoluto en términos de mg/dL para concentraciones de glucosa inferiores a 75 mg/dL o el % de sesgo para concentraciones de glucosa a y por encima de 75 mg/dL para tiras de sensor medioambientalmente estresadas en relación con tiras de sensor almacenadas a -20 °C. Las tiras de sensor estresadas se habían almacenado a 50 °C durante dos semanas como un proceso acelerado que simuló el almacenamiento a 25 °C durante 18 meses. Puesto que la densidad del mediador fue inicialmente baja (1,72 ug/mm²), la línea media del sesgo de estabilidad en la FIG. 6A estableció que a medida que disminuyó la densidad de la enzima desde RC1 (3,2 U/mm², o 4 ug/mm² a 770 U/mg de actividad enzimática específica) hasta RC2, RC3 y RC4 (ambas a 0,8 U/mm² o menos), así lo hicieron los sesgos medioambientalmente inducidos.

La FIG. 6A también estableció que una composición de reactivo como RC3 de acuerdo con la presente invención proporciona estabilidad a largo plazo suficiente para no requerir un impulso oxidativo largo inicial antes del análisis, tal como el descrito en la patente de EE.UU. N° 5.653.863 a Genshaw et al. El análisis que generó los datos de la FIG. 6A tuvo una duración total de 4,5 segundos con un tiempo de oxidación total de 1,5 segundos (correspondiente a la secuencia de impulsos de la FIG. 4A). Así, solo el 30 % del tiempo de ensayo se gastó oxidando la muestra de WB en la FIG. 6A, en comparación con ~67 % del tiempo de ensayo total en el ensayo de la patente de EE.UU. N° 5.653.863 (20 segundos de oxidación con respecto a un tiempo de análisis total de 30 segundos). En un aspecto, se gasta 45 % o menos del tiempo de ensayo total oxidando la muestra. En otro aspecto, se gasta 35 % o menos del tiempo de ensayo total oxidando la muestra.

Aunque pareció que el mediador de la Estructura III tenía un sesgo de estabilidad ligeramente menor que el mediador de la Estructura I en la FIG. 6A, esta pequeña diferencia puede ser atribuible a otros factores dentro del sistema de prueba. Así, las composiciones de reactivo RC2, RC3 y RC4 en combinación con las secuencias de impulsos regulados demostraron un sesgo de estabilidad inferior a ± 5 % después de la exposición a temperaturas de 50 °C durante dos semanas, pero no RC1 con una mayor densidad de deposición de sistema de enzima.

La FIG. 6B muestra el efecto del estrés medioambiental sobre la estabilidad a largo plazo de las tiras de sensor almacenadas a 50 °C durante cuatro semanas. El eje Y del gráfico muestra el sesgo de estabilidad absoluto en términos de mg/dL para concentraciones de glucosa inferiores a 75 mg/dL o el % de sesgo para concentraciones de glucosa a y por encima de 75 mg/dL para tiras de sensor medioambientalmente estresadas en relación con tiras de

sensor almacenadas a -20 °C. El aumento en el sesgo de estabilidad durante el periodo de almacenamiento de 4 semanas de la FIG. 6B en relación con el periodo de almacenamiento de 2 semanas más corto de la FIG. 6A se observa en los valores del eje Y para RC1. Puesto que la densidad del mediador fue inicialmente baja (1,72 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$), la línea media del sesgo de estabilidad en la FIG. 6B estableció que a medida que disminuyó la densidad desde RC1 (3,2 U/mm^2 , o 4 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ a 770 U/mg de actividad enzimática específica) hasta RC2, RC3 y RC4 (ambas a 0,8 U/mm^2 o menos), así lo hicieron los sesgos medioambientalmente inducidos. Así, la línea media del sesgo de estabilidad para el periodo de almacenamiento de 4 semanas más largo de la FIG. 6B también disminuye sustancialmente para RC2, RC3 y RC4 en relación con RC1. Incluso después de 4 semanas de almacenamiento a 50 °C, las composiciones de reactivo RC2, RC3 y RC4 en combinación con las secuencias de impulsos regulados demostraron un sesgo de estabilidad inferior a $\pm 5\%$.

La FIG. 6C muestra el sesgo de estabilidad para tres composiciones de reactivo que incluyen el sistema de enzima PQQ-GDH después de 52 semanas a 25 °C bajo 60 % de humedad relativa. A diferencia de en la FIG. 6A y 6B, se usó un periodo de tiempo más largo a una temperatura más baja para envejecer las tiras. Los valores de sesgo para RC2 y RC3 fueron similares a los observados con el envejecimiento acelerado, siendo inferiores a $\pm 5\%$ de media. RC4 mostró un aumento en el sesgo en relación con los resultados de envejecimiento acelerado de la FIG. 6A y 6B, aumentando hasta un poco menos que el nivel de $\pm 10\%$ de media. Este aumento puede ser atribuible al error experimental o a una cuestión de estabilidad con el lote de mediador de la Estructura III usado en RC4 en las circunstancias específicas de esta prueba.

La FIG. 6D muestra los valores del sesgo de estabilidad para tiras de sensor que incluyen RC2 donde el punto de datos usado para calcular la concentración de analito se tomó en un momento específico después de empezar el análisis. Por ejemplo, la línea de 2,75 segundos representa los valores de sesgo/ % de sesgo de la concentración de analito como se determina después del primer impulso de excitación corto, tal como la excitación 430 en la FIG. 4A. Similarmente, la línea de 4,375 segundos representa los valores de sesgo/ % de sesgo de concentración de analito como se determina después de un segundo impulso de excitación corto. Así, usando una tira de sensor medioambientalmente estresada que incluye RC2 y una secuencia de impulsos regulada, se puede determinar con exactitud la concentración de analito de la muestra en menos de 3 segundos.

Ejemplo 1: Preparación de tiras de sensor

En un aspecto, se prepararon tiras de sensor usando deposición con agujas. Se preparó la disolución de reactivo del contraelectrodo preparando una disolución madre de tampón fosfato 100 mM en 1 % de carboximetilcelulosa (CMC). Luego se disolvió mediador en polvo suficiente en la disolución tampón/CMC para preparar una disolución final de mediador 100 mM en tampón fosfato 100 mM y 1 % de CMC.

Se preparó la disolución de reactivo del electrodo de trabajo preparando normalmente una disolución madre de tampón fosfato 100 mM en 0,5 % de CMC (100 mL, por ejemplo). Luego se disolvió mediador en polvo suficiente en la disolución tampón/CMC para preparar una disolución (10 mL, por ejemplo) de mediador 24 - 25 mM en tampón fosfato 100 mM y 0,5 % de CMC. Finalmente, para una carga de enzima de 5 $\text{U}/\mu\text{L}$, se combinaron aproximadamente 33,4 mg del sistema de enzima PQQ-GDH (749 U/mg de actividad específica) con 5 mL de la disolución de mediador/tampón/CMC en un recipiente de vidrio ($[5000\text{U}/\text{mL} * 5 \text{ mL}]/[749 \text{ U}/\text{mg}] = 33,4 \text{ mg}$). Se arremolinó lentamente la mezcla para disolver el polvo de enzima seco en la disolución. Esta formulación fue para RC2. Si solo se necesitaron 2 mL de disolución de reactivo final, entonces se pesaron aproximadamente 13,4 mg de enzima PQQ-GDH con 749 U/mg de actividad específica. Similarmente, para la composición RC3 de 2 $\text{U}/\mu\text{L}$, se disolvieron aproximadamente 13,4 mg de enzima PQQ-GDH con la actividad específica de 749 U/mg por 5 mL de la disolución de mediador/tampón/CMC para constituir la disolución de reactivo final para deposición. Si solo se necesitaron 2 mL de la disolución de reactivo final, entonces se pesaron aproximadamente 5,34 mg de enzima PQQ-GDH a 749 U/mg de actividad específica para preparar la disolución final.

Se usó deposición con agujas para depositar la disolución de reactivo de contraelectrodo sobre una de las superficies de carbono para formar el contraelectrodo. El volumen suministrado por cada deposición fue desde aproximadamente 0,2 hasta 0,24 μL , que se extendió para cubrir un área de aproximadamente 1,5 a 2 mm^2 . Similarmente, se usó deposición con agujas para depositar la disolución de reactivo de electrodo de trabajo sobre una de las superficies de carbono para formar el electrodo de trabajo. El volumen para cada deposición de electrodo de trabajo también fue aproximadamente 0,2 - 0,24 μL , con una extensión de disolución similar sobre el carbono para formar el electrodo de trabajo. Se dejó secar al aire la hoja de sensor completada durante 15 minutos, seguido por almacenamiento en un recipiente desecado antes de la laminación final para formar las tiras de sensor completadas. En un aspecto, se prefieren densidades de deposición de disolución de reactivo de 0,16 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ (0,24 $\mu\text{L}/1,5 \text{ mm}^2$) o menos en el electrodo de trabajo.

Ejemplo 2: Estudio de donante (las tiras de sensor a modo de ejemplo SS1 a SS4 no son según la invención)

Se recogieron muestras de sangre completa de 21 sujetos que tenían diabetes mellitus. Se realizaron dos análisis en cada sujeto para proporcionar 42 mediciones de cada uno de los lotes de tiras de sensor SS1, que son las tiras de sensor a modo de ejemplo no según la invención, como se proporciona en la Tabla III, a continuación. Se usaron

5 diferentes composiciones de reactivo de electrodos de trabajo y contraelectrodos para SS1 a SS3, mientras que SS4 usó una única composición de reactivo que cubría sustancialmente ambos conductores. SS1, SS2 y SS3 representan diferentes lotes de fabricación que usan las mismas cantidades de reactivo. El volumen de composición de reactivo depositado sobre los conductores individuales para SS1 a SS3 fue aproximadamente 0,24 µL, con dos áreas de deposición de aproximadamente 1,5 mm² cada una. El volumen de composición de reactivo depositado para cubrir ambos conductores para SS1 fue aproximadamente 0,3 µL, con un área de deposición total de aproximadamente 3 mm².

Tabla III

	Deposición de electrodo de trabajo	Deposición de contraelectrodo
SS1	1,62 µg/mm ² de CMC 1,11 µg/mm ² de tampón 0,58 µg/mm ² de sistema de enzima PQQ/GDH 1,39 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1	1,62 µg/mm ² de CMC 1,11 µg/mm ² de tampón 1,39 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1
SS2	1,62 µg/mm ² de CMC 1,11 µg/mm ² de tampón 0,58 µg/mm ² de sistema de enzima PQQ/GDH 1,39 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1	1,62 µg/mm ² de CMC 1,11 µg/mm ² de tampón 1,39 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1
SS3	1,62 µg/mm ² de CMC 1,11 µg/mm ² de tampón 0,58 µg/mm ² de sistema de enzima PQQ/GDH 1,39 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1	1,62 µg/mm ² de CMC 1,11 µg/mm ² de tampón 1,39 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1
SS4	1,14 µg/mm ² de CMC 0,78 µg/mm ² de tampón 0,41 µg/mm ² de sistema de enzima PQQ/GDH 1,95 µg/mm ² de mediador de la Estructura I pH 7,2 ± 0,1	Mismo que el electrodo de trabajo

10 Las muestras se analizaron con una secuencia de impulsos que tenía una excitación inicial que incluía dos excitaciones cortas separadas por aproximadamente 0,25 segundos, seguido por una relajación de 1 segundo. Después de la excitación y relajación iniciales, se aplicó una secuencia de tres excitaciones de aproximadamente 0,375 segundos separada por dos relajaciones de aproximadamente 1 segundo. Se usó una corriente de salida registrada después de aproximadamente 5 segundos desde la aplicación de la señal de entrada inicial para
15 determinar la concentración de glucosa de la muestra.

Las Tablas IV y V, a continuación, proporcionan el estado estadístico de los resultados de hematocrito para SS1 a SS4, donde se realizaron dos análisis con cada tipo de tira de sensor para cada una de las 21 muestras de sangre para proporcionar 42 lecturas. La Tabla IV muestra la pendiente, ordenada en el origen y relación I/S para cada lote de tiras de sensor, mientras que la Tabla V muestra el porcentaje de lecturas que tienen sesgos dentro de ±
20 15/± 15 %, ± 10/± 10 %, o ± 5/± 5 % del valor de referencia de YSI. Para concentraciones de glucosa inferiores a 75 mg/dL, el sesgo se expresa como mg/dL (absoluto) y para concentraciones de glucosa de 75 mg/dL y mayores el sesgo se expresa en porcentaje (relativo).

Tabla IV

Sensor	Pendiente	Ordenada en el origen	Relación I/S mg/dL
SS1	34,61	91,73	2,65
SS2	32,65	-115,8	-3,55
SS3	30,76	-28,00	-0,91
SS4	33,91	106,87	3,15

Tabla V

Sensor	% de sesgo dentro de $\pm 15\%$	% de sesgo dentro de $\pm 10\%$	% de sesgo dentro de $\pm 5\%$
SS1	100	100	93
SS2	100	97,6	64
SS3	100	97,6	93
SS4	100	97,6	67

5 La Tabla IV establece que cada lote de tiras de sensor tenía una relación I/S inferior a 5 mg/dL, estableciendo así la señal de fondo superior de las tiras. El rendimiento de un sistema de sensor se puede caracterizar por la diseminación de los sesgos frente a los valores de referencia.

Esta diseminación se puede medir por el porcentaje de valores de sesgo que se encuentran dentro de ciertos límites, tales como $\pm 15\text{ mg/dL} \pm 15\%$ o $\pm 10\text{ mg/dL} \pm 10\%$. Cuanto más pequeño sea el límite, mejor es el rendimiento. Múltiples factores, que incluyen la imprecisión de la medición y el efecto del hematocrito, contribuirán a los valores de sesgo. Normalmente, el rendimiento se juzga por tener al menos 95 % de la población de datos dentro de un cierto límite de rendimiento. Así, la Tabla V establece que 100 % de la población de datos de SS1 a SS4 estaba dentro del límite de $\pm 15\text{ mg/dL} \pm 15\%$. Además, más del 95 % de la población de datos de SS1 a SS4 estaba dentro del límite de $\pm 10\text{ mg/dL} \pm 10\%$.

15 La FIG. 7A representa la curva de respuesta a dosis del lote SS1 para las 21 muestras de sangre completa. El valor R^2 de 0,997 estableció la capacidad de la tira para proporcionar valores de corriente con exactitud que reflejaban la concentración real de glucosa de las muestras. La FIG. 7B representa las diseminaciones del sesgo para los lotes SS1 a SS4 con las 42 lecturas de 21 muestras a través del intervalo de concentración de glucosa en el estudio de donantes. La figura establece que el 100 % de los valores de sesgo para todas las tiras de sensor se encontraron dentro de $\pm 15\%$, y que el rendimiento de los lotes de fabricación SS1 y SS3 fue superior en las condiciones del estudio, estando el 93 % de la población de datos dentro del límite $\pm 5\%$. La estrecha diseminación de sesgo para las tiras de sensor se puede atribuir a la sensibilidad y precisión potenciadas, reflejado en las pequeñas relaciones I/S, y al pequeño efecto del hematocrito proporcionado por las tiras.

25 La FIG. 7C representa la sensibilidad del hematocrito, sesgo de hematocrito en relación con el contenido de hematocrito de la muestra, obtenido del lote SS1, en comparación con una tira convencional que tiene una densidad de deposición de $2,96\ \mu\text{g/mm}^2$ para un polímero HEC, $0,69\ \mu\text{g/mm}^2$ para un tampón cítico, $2,14\ \mu\text{g/mm}^2$ para una enzima glucosa oxidasa, y $13\ \mu\text{g/mm}^2$ para el mediador ferricianuro. Se obtuvo una sensibilidad a hematocrito de -0,26 para el lote SS1, mientras que las tiras de sensor convencionales tuvieron una pendiente de -1,26, indicando los valores de pendiente numéricamente mayores mayor sensibilidad de hematocrito. Así, la sensibilidad de hematocrito del lote SS1 fue aproximadamente 79 % inferior a la proporcionada por las tiras convencionales.

Para proporcionar un claro y coherente entendimiento de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se proporcionan las siguientes definiciones.

"Sistema" se define como una tira de sensor electroquímica en comunicación eléctrica a través de sus conductores con un dispositivo electrónico de medición, que permite la cuantificación de un analito en una muestra.

35 "Dispositivo de medición" se define como un dispositivo electrónico que puede aplicar una señal de entrada eléctrica y medir la señal de salida resultante. El dispositivo de medición puede también incluir la capacidad de procesamiento para determinar la presencia y/o concentración de uno o más analitos en respuesta a la señal de salida.

- "Analito" se define como una o más sustancias presentes en una muestra. Un análisis determina la presencia y/o concentración del analito presente en la muestra.
- 5 "Muestra" se define como una composición que puede contener una cantidad desconocida de analito. Normalmente, una muestra para análisis electroquímico está en forma líquida, y preferentemente la muestra es una mezcla acuosa. Una muestra puede ser una muestra biológica, tal como sangre, orina o saliva. Una muestra también puede ser un derivado de una muestra biológica, tal como un extracto, una dilución, un filtrado, o un precipitado reconstituido.
- "Conductor" se define como una sustancia eléctricamente conductora que permanece estacionaria durante un análisis electroquímico. Los ejemplos de materiales conductores incluyen metales sólidos, pastas metálicas, carbono conductor, pastas de carbono conductor, y polímeros conductores.
- 10 "Material no ionizante" se define como un material que no se ioniza durante el análisis electroquímico de un analito. Los ejemplos de materiales no ionizantes incluyen carbono, oro, platino y paladio.
- "Rendimiento de la medición" se define en términos de exactitud y/o precisión. Así, un aumento en el rendimiento de medición puede ser un aumento en la exactitud y/o precisión de la medición.
- 15 "Precisión" se define como cómo de próximas están múltiples mediciones de analito para la misma muestra. La precisión se puede expresar en términos de la diseminación o varianza entre múltiples mediciones en relación con una media.
- "Exactitud" se define como cómo de próxima corresponde la cantidad de analito medida por una tira de sensor a la cantidad verdadera de analito en la muestra. La exactitud se puede expresar en términos de sesgo, reflejando mayores valores de sesgo menos exactitud.
- 20 "Sesgo" se define como la diferencia entre un valor medido y el valor de referencia aceptado. El sesgo se puede expresar en términos de "sesgo absoluto" o "sesgo relativo". El sesgo absoluto se puede expresar en las unidades de la medición, tales como mg/dL, mientras que el sesgo relativo se puede expresar como un porcentaje del valor del sesgo absoluto con respecto al valor de referencia. Se pueden expresar tanto el sesgo de hematocrito como el sesgo de estabilidad en términos de un valor de sesgo absoluto o como un porcentaje. El sesgo de hematocrito usa una concentración de analito obtenida con un instrumento de referencia, tal como YSI 2300 STAT PLUS™ disponible de YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, como el valor de referencia aceptado. El sesgo de estabilidad usa una concentración de analito obtenida de una tira de sensor almacenada a una temperatura de -20 °C para reducir sustancialmente la alteración térmica de la composición de reactivo.
- 25 "Sensibilidad de hematocrito" se define como el grado al que los cambios en el nivel de hematocrito de una muestra afectan los valores del sesgo de hematocrito para un análisis.
- 30 "Estabilidad a largo plazo" se define en relación con tiras de sensor envasadas, tales como con lámina y desecante, y almacenadas a -20 °C durante 2 o 4 semanas después de la fabricación frente a las tiras de sensor expuestas a 50 °C durante 2 o 4 semanas, respectivamente. El almacenamiento a 50 °C durante 2 semanas se puede considerar hasta aproximadamente 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. El cambio promedio o la desviación para los niveles de 0 %, 50 % 100 %, y 400 % de hematocrito en el rendimiento de medición para la tira almacenada a 50 °C frente -20 °C indica el cambio de la estabilidad a largo plazo o "sesgo de estabilidad" para la tira de sensor. En este caso, un aumento en la señal de fondo o sesgo muestra una disminución en el rendimiento de medición para la tira de sensor. Así, almacenando las tiras de sensor envasadas a 50 °C y observando el cambio de sesgo en relación con las tiras almacenadas a -20 °C, se puede obtener una indicación de cuánto aumentará el sesgo para las tiras de sensor que quedan en las estanterías del almacén durante diversos periodos de tiempo.
- 35 "Mediador" se define como una sustancia que se puede oxidar o reducir y que puede transferir uno o más electrones. Un mediador es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés, pero proporciona la medición indirecta del analito. En un sistema simple, el mediador experimenta una reacción redox en respuesta a la oxidación o reducción del analito. El mediador oxidado o reducido experimenta entonces la reacción opuesta en el electrodo de trabajo de la tira de sensor y se regenera a su número de oxidación original.
- 45 "Especie medible" se define como cualquier especie electroquímicamente activa que se pueda oxidar o reducir bajo un potencial apropiado en la superficie del electrodo de una tira de sensor electroquímica. Los ejemplos de especies medibles incluyen un analito, un sustrato, o un mediador.
- 50 "Oxidorreductasa" se define como cualquier enzima que facilita la oxidación o reducción de una especie medible. Una oxidorreductasa es un reactivo. El término oxidorreductasa incluye "oxidases", que facilitan reacciones de oxidación donde el oxígeno molecular es el aceptor de electrones; "reductasas" que facilitan las reacciones de reducción donde el analito se reduce y el oxígeno molecular no es el analito; y "deshidrogenasas", que facilitan reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular no es el aceptor de electrones. Véase, por ejemplo, Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, edición revisada, A.D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997) pp. 161, 476, 477, y 560.
- 55

- 5 "Molécula orgánica electroactiva" se define como una molécula orgánica que carece de un metal que es capaz de experimentar una reacción redox. Las moléculas orgánicas electroactivas se pueden comportar como especies redox y/o como mediadores. Los ejemplos de moléculas orgánicas electroactivas incluyen la coenzima pirroloquinolinaquinona (PQQ), benzoquinonas y naftoquinonas, N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenazinas, fenotiazinas, indofenoles e indaminas.
- "Aglutinante" se define como un material que proporciona soporte físico y contención a los reactivos mientras que tiene compatibilidad química con los reactivos.
- 10 "Espesor inicial promedio" se define como la altura promedio de una capa en su estado seco antes de la introducción de una muestra líquida. El término promedio se usa debido a que la superficie superior de la capa es irregular, que tiene picos y valles.
- "Densidad de deposición" se define como la masa de un material depositado sobre un área. Por ejemplo, cuando se depositan 0,24 µL de una disolución que contiene 2,57 µg de un sólido sobre una superficie que tiene un área de 1,5 mm², resulta una densidad de deposición de 1,72 µg/mm² (2,57 µg/1,5 mm²).
- 15 "Unidad enzimática" (U) se define como la cantidad de un sistema de enzima que catalizará la transformación (oxidación o reducción) de 1 micromol de sustrato (analito) en 1 minuto en condiciones estándar.
- "Actividad enzimática" o "actividad", con respecto a un sistema de enzima, es el número de unidades enzimáticas por volumen. Así, la actividad se puede dar en términos de U/L o mU/mL donde 1 U/L = µmol/minuto/Litro, por ejemplo.
- 20 "Reacción redox" se define como una reacción química entre dos especies que implica la transferencia de al menos un electrón de una primera especie a una segunda especie. Así, una reacción redox incluye una oxidación y una reducción. La porción de oxidación de la reacción implica la pérdida de al menos un electrón por la primera especie, y la porción de reducción implica la adición de al menos un electrón a la segunda especie. La carga iónica de una especie que se oxida se hace más positiva por una cantidad igual al número de electrones transferidos. Asimismo, la carga iónica de una especie que se reduce se hace menos positiva por una cantidad igual al número de electrones transferidos.
- 25 "Número de oxidación" se define como la carga iónica formal de una especie química, tal como un átomo. Un número de oxidación más alto, tal como (III), es más positivo, y un número de oxidación más bajo, tal como (II), es menos positivo. Una especie neutra tiene una carga iónica de cero (0). La oxidación de una especie da como resultado un aumento en el número de oxidación de esa especie, y la reducción de una especie da como resultado una disminución en el número de oxidación de esa especie.
- 30 "Par redox" se define como dos especies conjugadas de una sustancia química que tienen diferentes números de oxidación. La reducción de las especies que tienen el número de oxidación más alto produce las especies que tienen el número de oxidación más bajo. Alternativamente, la oxidación de las especies que tienen el número de oxidación más bajo produce las especies que tienen el número de oxidación más alto.
- 35 "Especie oxidable" se define como la especie de un par redox que tienen el número de oxidación más bajo, y que es así capaz de ser oxidada en la especie que tienen el número de oxidación más alto. Asimismo, el término "especie reducible" se define como la especie de un par redox que tiene el número de oxidación más alto, y que es así capaz de ser reducida en la especie que tiene el número de oxidación más bajo.
- 40 "Especie redox soluble" se define como una sustancia que es capaz de experimentar oxidación o reducción y que es soluble en agua (pH 7, 25 °C) a un nivel de al menos 1,0 gramo por litro. Las especies redox solubles incluyen moléculas orgánicas electroactivas, complejos de metales de organotransición y complejos de coordinación de metales de transición. El término "especie redox soluble" excluye metales elementales e iones metálicos solitarios, especialmente los que son insolubles o moderadamente solubles en agua.
- 45 "Complejo de metal de organotransición", también denominado "complejo OTM", se define como un complejo donde un metal de transición se une a al menos un átomo de carbono mediante un enlace sigma (carga formal de -1 en el átomo de carbono sigma unido al metal de transición) o un enlace pi (carga formal de 0 en los átomos de carbono pi unidos al metal de transición). Por ejemplo, el ferroceno es un complejo OTM con dos anillos ciclopentadienilo (Cp), cada uno unido a través de sus cinco átomos de carbono a un centro de hierro por dos enlaces pi y un enlace sigma.
- 50 Otro ejemplo de un complejo OTM es ferricianuro (III) y su homólogo de ferrocianuro (II) reducido, donde seis ligandos ciano (carga formal de -1 en cada uno de los 6 ligandos) son sigma unidos a un centro de hierro a través de los átomos de carbono de los grupos ciano.
- 55 "Complejo de coordinación" se define como un complejo que tiene geometría de coordinación bien definida, tal como geometría plana octaédrica o cuadrada. A diferencia de los complejos de OTM, que se definen por su enlace, los complejos de coordinación se definen por su geometría. Así, los complejos de coordinación pueden ser complejos OTM (tales como el ferricianuro previamente mencionado), o complejos donde átomos no metálicos distintos de

- 5 carbono, tales como heteroátomos que incluyen nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, se unen dativamente al centro de metal de transición. Por ejemplo, la hexaamina de rutenio es un complejo de coordinación que tiene una geometría octaédrica bien definida donde seis ligandos NH_3 (carga formal de 0 en cada uno de los 6 ligandos) se unen dativamente al centro de rutenio. Una discusión más completa de los complejos de metales de organotransición, complejos de coordinación y enlaces de metal de transición se puede encontrar en Collman et al., Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry (1987) y Miessler & Tarr, Inorganic Chemistry (1991).
- 10 "Dispositivo de mano" se define como un dispositivo que se puede sostener en una mano humana y es portátil. Un ejemplo de un dispositivo de mano es el dispositivo de medición que acompaña al sistema de monitorización de glucosa en sangre Ascensia® Elite, disponible de Bayer HealthCare, LLC, Elkhart, IN.
- 15 "Sobre" se define como "encima de" y es con respecto a la orientación que se describe. Por ejemplo, si un primer elemento se deposita sobre al menos una porción de un segundo elemento, se dice que el primer elemento se "deposita sobre" el segundo. En otro ejemplo, si un primer elemento está presente encima de al menos una porción de un segundo elemento, el primer elemento se dice que 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 sobre su superficie superior, incluso un segundo elemento sobre al menos una porción del primer elemento, y su recubrimiento superior se puede describir como "sobre" el primer elemento. Así, el uso del término "sobre" puede o puede no significar que los dos elementos que se relacionan estén en contacto físico entre sí.
- 20 Aunque se han descrito diversas realizaciones de la invención, será evidente para los expertos habituales en la técnica que otras realizaciones e implementaciones son posibles dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una tira de sensor electroquímica (100) que tiene un primer electrodo (175), un segundo electrodo (185) y una tapa (120) sobre una base (110), caracterizada por:
- 5 un primer electrodo (175) sobre la base (110) que tiene al menos una primera capa sobre un primer conductor (270), incluyendo la primera capa una capa de reactivo (275) que comprende desde 1,72 hasta 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de un mediador y un sistema de enzima a una densidad de deposición desde 0,42 hasta 0,8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$;
- donde la tira (100) está configurada para proporcionar un valor determinado de concentración de analito.
2. La tira de sensor electroquímica (100) de la reivindicación 1, caracterizada además por que el segundo electrodo incluye una segunda capa sobre un segundo conductor (280), donde la segunda capa comprende otra capa de reactivo (285) diferente en composición de la capa de reactivo (275) de la primera capa.
- 10 3. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer y segundo electrodos (175, 185) se separan de una porción superior de la tapa (120) al menos 100 μm .
4. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el espesor inicial promedio de la capa de reactivo (275, 285) es inferior a 8 μm y donde la capa de reactivo (275, 285) tiene una densidad de deposición de como máximo 0,2 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ de una disolución de reactivo.
- 15 5. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la capa de reactivo (275, 285) comprende un aglutinante polimérico seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), hidroxietilencelulosa, carboximetilcelulosa, y combinaciones de los mismos, y donde la densidad de deposición del aglutinante polimérico es como máximo 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ sobre el primer conductor.
- 20 6. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la capa de reactivo (275, 285) comprende un aglutinante polimérico parcialmente soluble en agua que forma un material de tipo gel con la hidratación.
7. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la capa de reactivo comprende como máximo 1,3 unidades de un sistema de enzima.
- 25 8. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el mediador es un mediador de transferencia de dos electrones, y donde el mediador de transferencia de dos electrones es al menos uno de 3-fenilimino-3H-fenotiazinas, 3-fenilimino-3H-fenoxazinas, sales de las mismas, ácidos de las mismas, y derivados de las mismas.
- 30 9. La tira de sensor electroquímica (100) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el mediador tiene un potencial redox de al menos 100 mV inferior al ferricianuro.
10. Un método de determinación de la concentración de un analito en una muestra con una tira de sensor electroquímica (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por:
- 35 hacer reaccionar la muestra con una capa de reactivo (275), comprendiendo la capa de reactivo (275) desde 1,72 hasta 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de un mediador y un sistema de enzima a una densidad de deposición desde 0,42 hasta 0,8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$;
- 40 aplicar una secuencia de impulsos a un analito que contiene la muestra, donde la secuencia de impulsos comprende al menos 3 ciclos de trabajo en el plazo de 30 segundos, preferentemente al menos 3 ciclos de trabajo en el plazo de 9 segundos, o más preferentemente al menos tres ciclos de trabajo en como máximo 5 segundos, y donde cada ciclo de trabajo comprende una excitación y una relajación;
- medir al menos una de las excitaciones; y determinar la concentración de analito en la muestra de la medición.
11. El método de la reivindicación precedente, caracterizado además por determinar la concentración de analito en la muestra a partir de una medición de corriente tomada en el plazo de 2 segundos desde la aplicación de la secuencia de impulsos.
- 45 12. El método de una de las dos reivindicaciones precedentes, donde las excitaciones tienen cada una una duración desde 0,01 hasta 3 segundos, o preferentemente como máximo 2 segundos.
13. El método de una cualquiera de las tres reivindicaciones precedentes, donde las excitaciones tienen una duración sumada de como máximo 10 segundos, o donde las excitaciones comprenden como máximo 45 % del tiempo de la secuencia de impulsos.

ES 2 748 685 T3

14. El método de una cualquiera de las cuatro reivindicaciones precedentes, donde las excitaciones son amplitudes que tienen una diferencia dentro de 500 mV.
15. El método de una cualquiera de las cinco reivindicaciones precedentes, donde las relajaciones tienen cada una una duración desde 0,2 hasta 3 segundos.
- 5 16. El método de una cualquiera de las seis reivindicaciones precedentes, donde la secuencia de impulsos incluye una excitación inicial desde 0,75 hasta 3 segundos de duración, y donde la excitación inicial es más larga en duración que las excitaciones de los al menos 3 ciclos de trabajo.

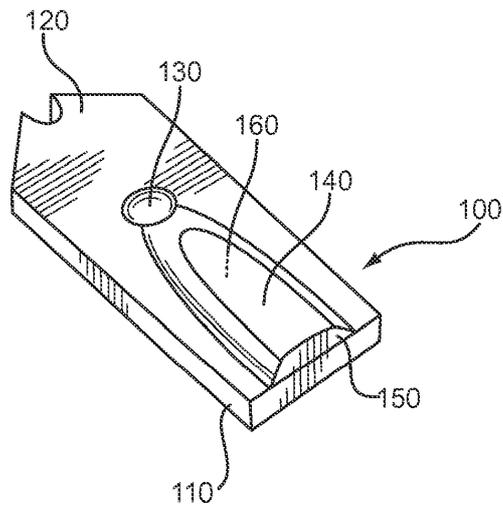


Fig. 1A

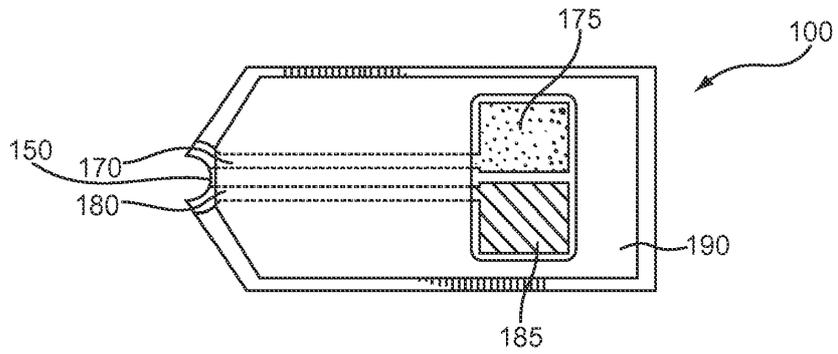


Fig. 1B

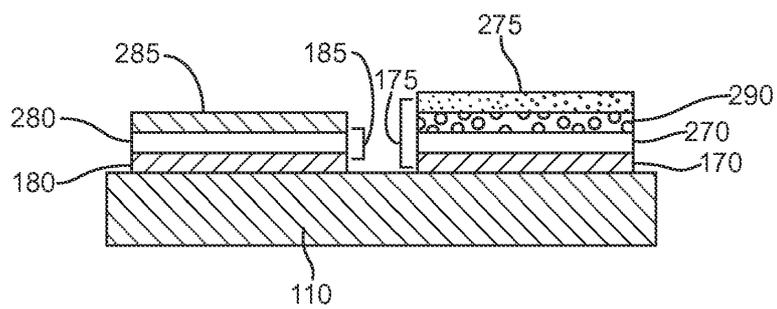


Fig. 2A

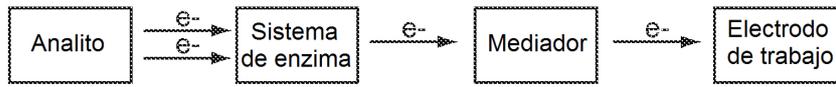


Fig.2B

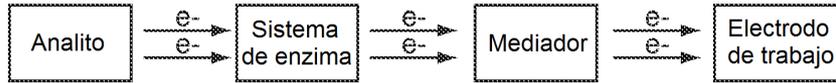


Fig.2C

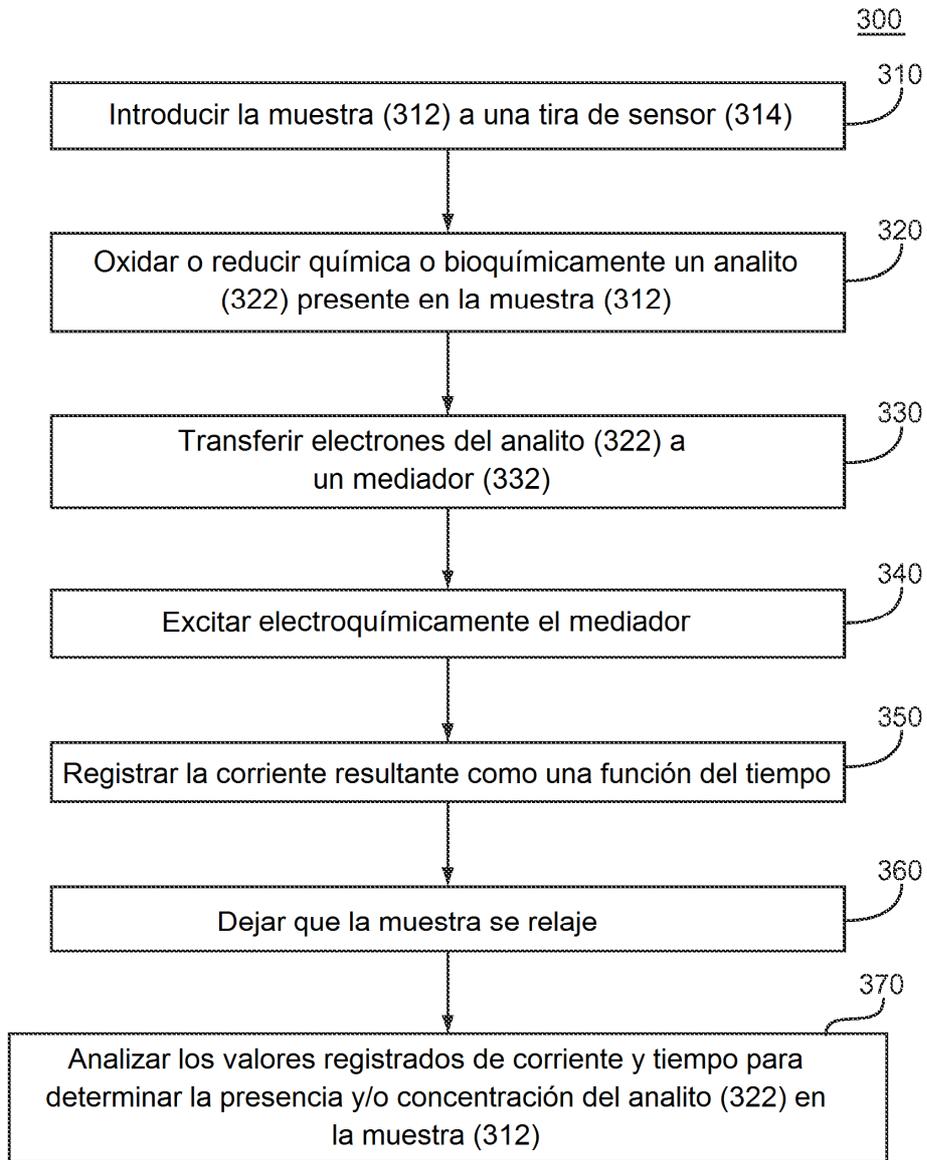


Fig.3

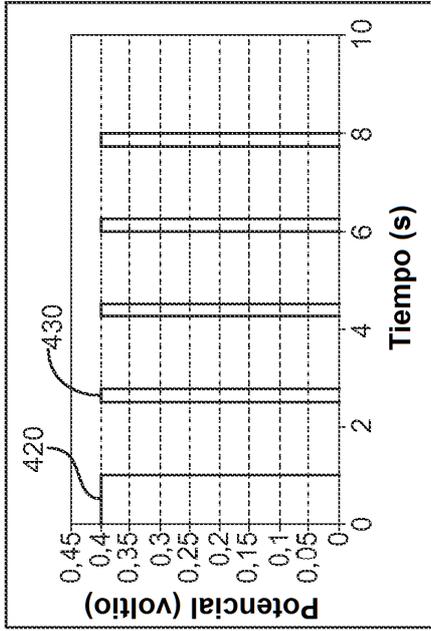


Fig. 4B

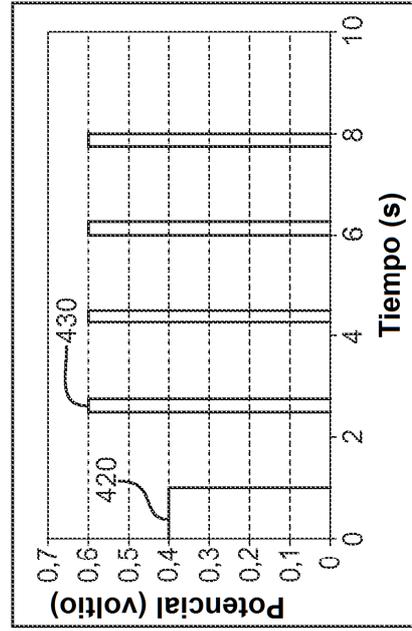


Fig. 4D

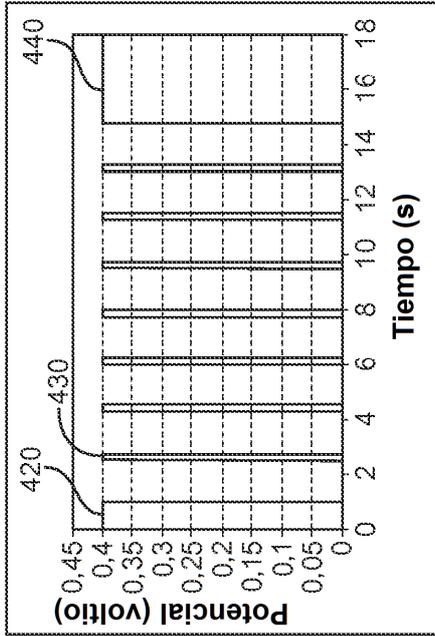


Fig. 4A

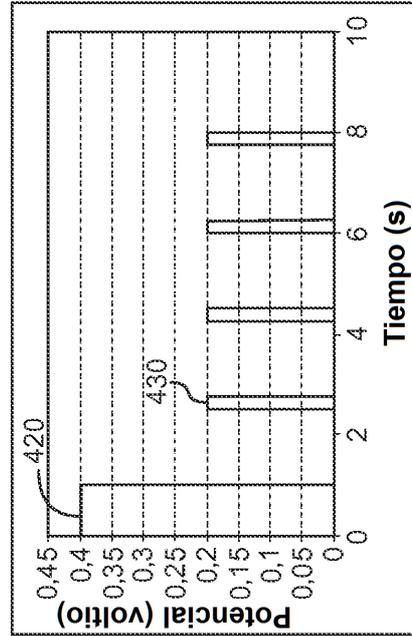


Fig. 4C

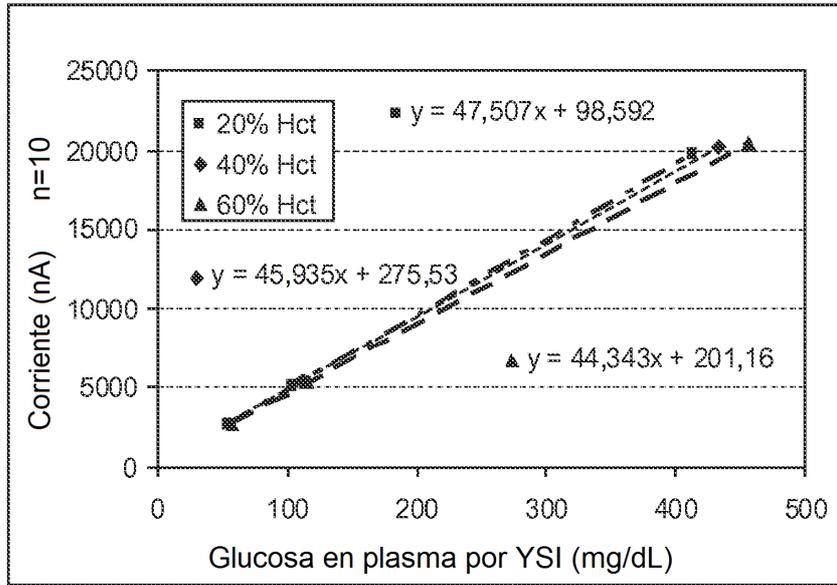


Fig. 5A

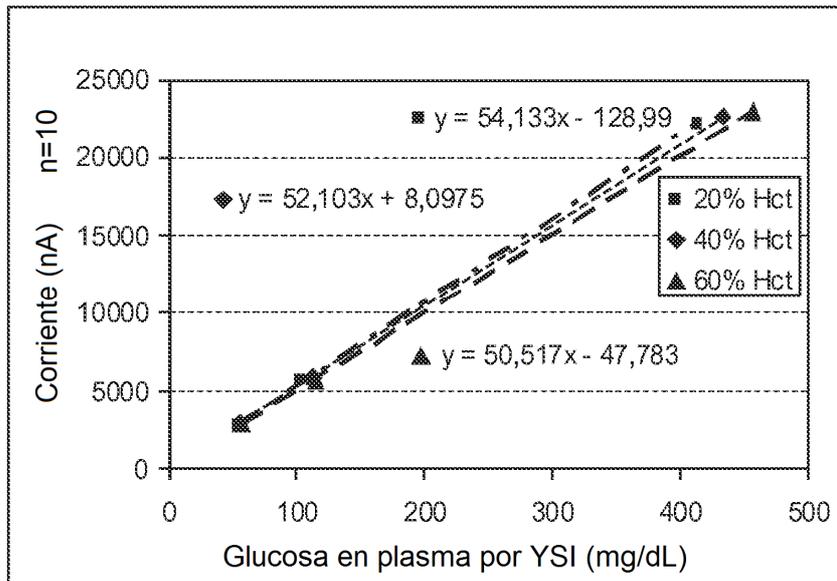


Fig. 5B

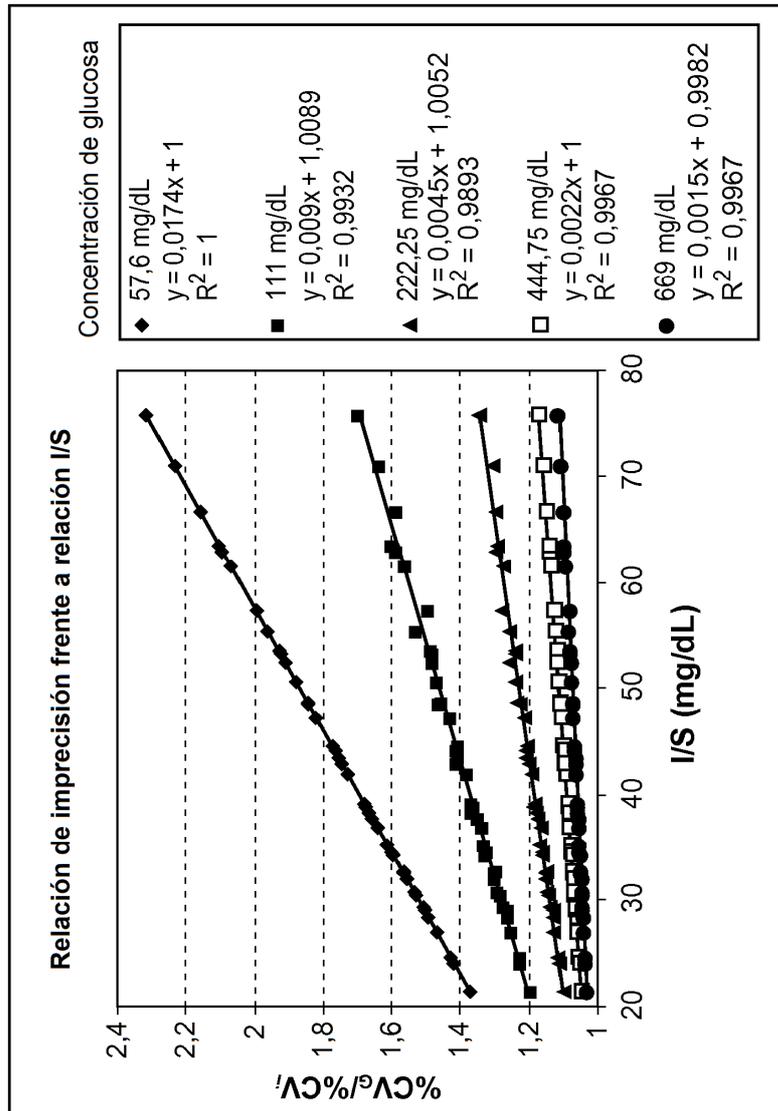


Fig.5C

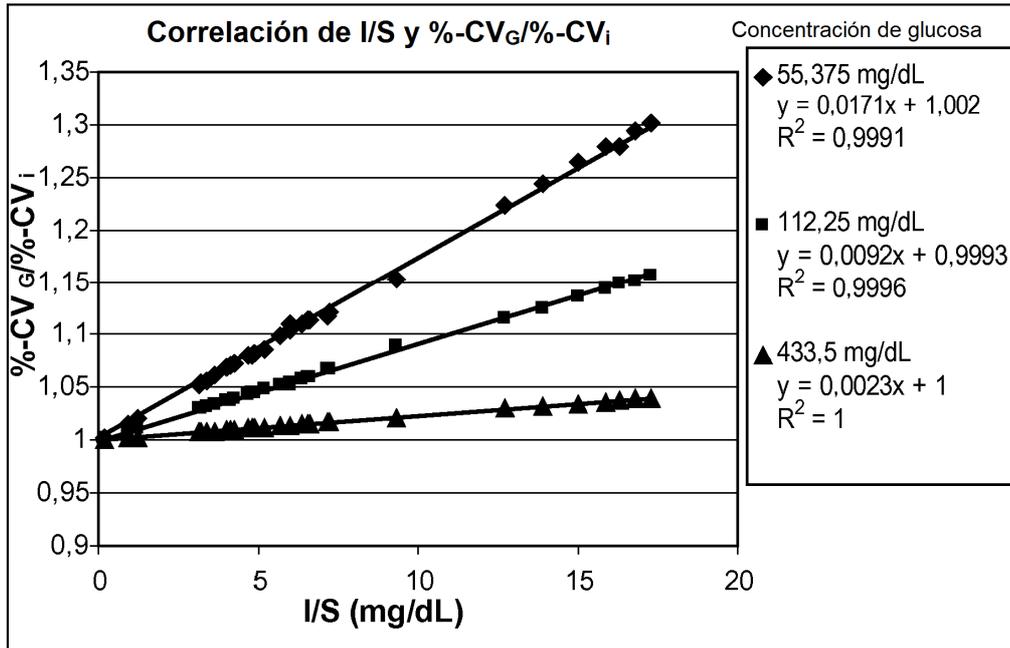


Fig.5D

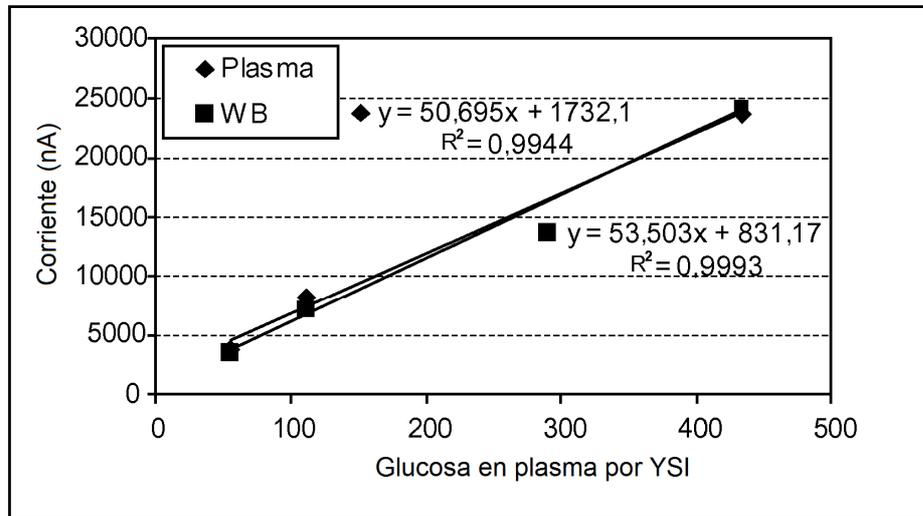


Fig.5E

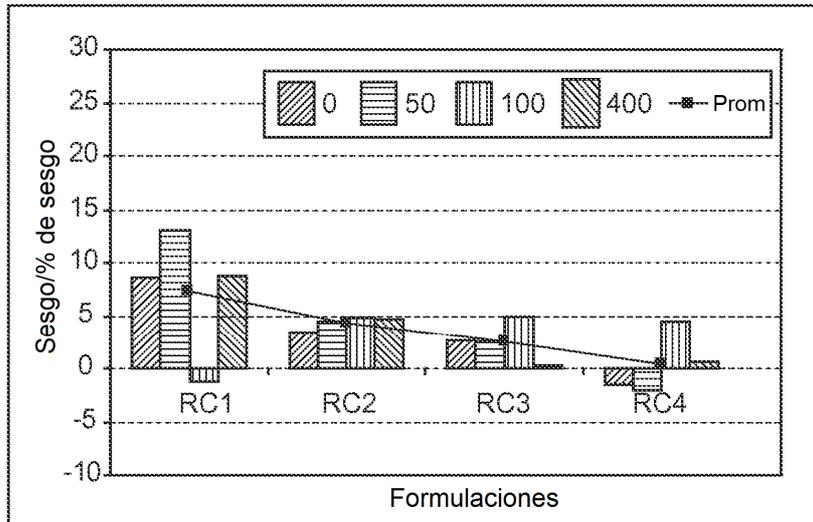


Fig.6A

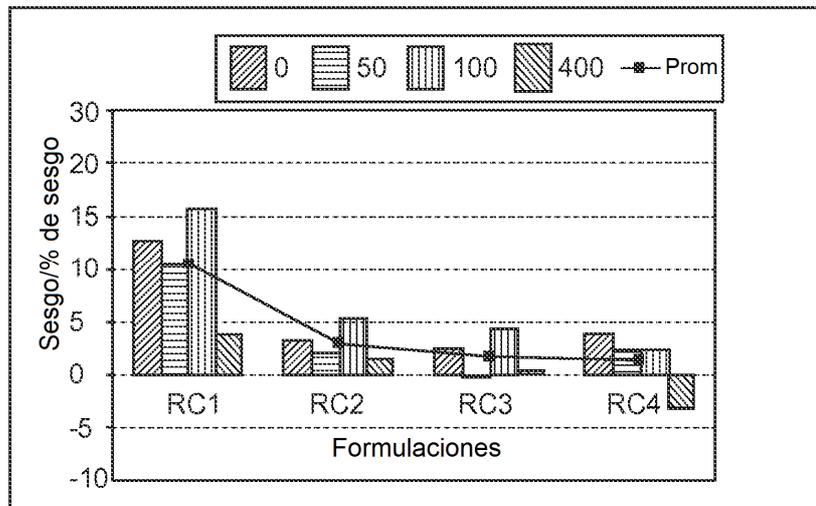


Fig.6B

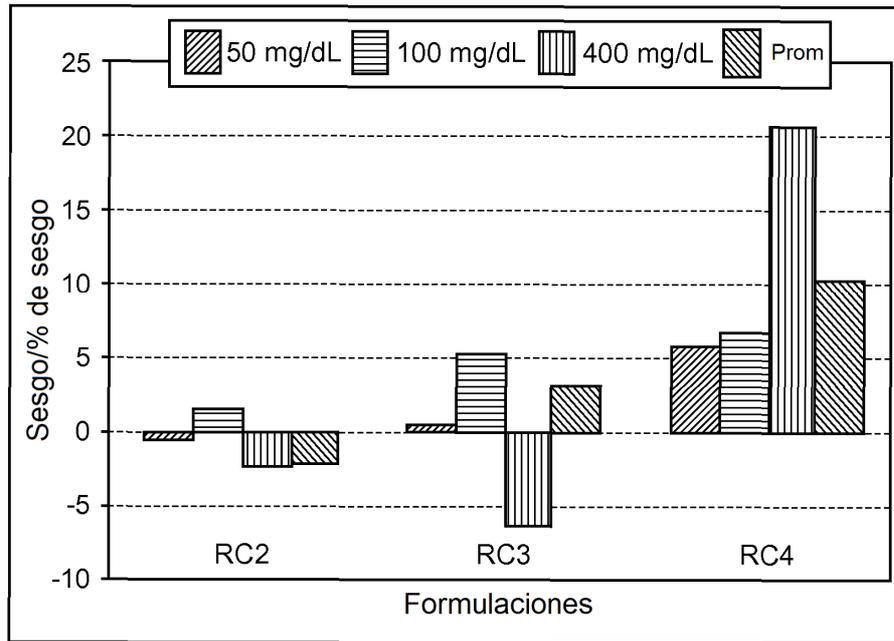


Fig.6C

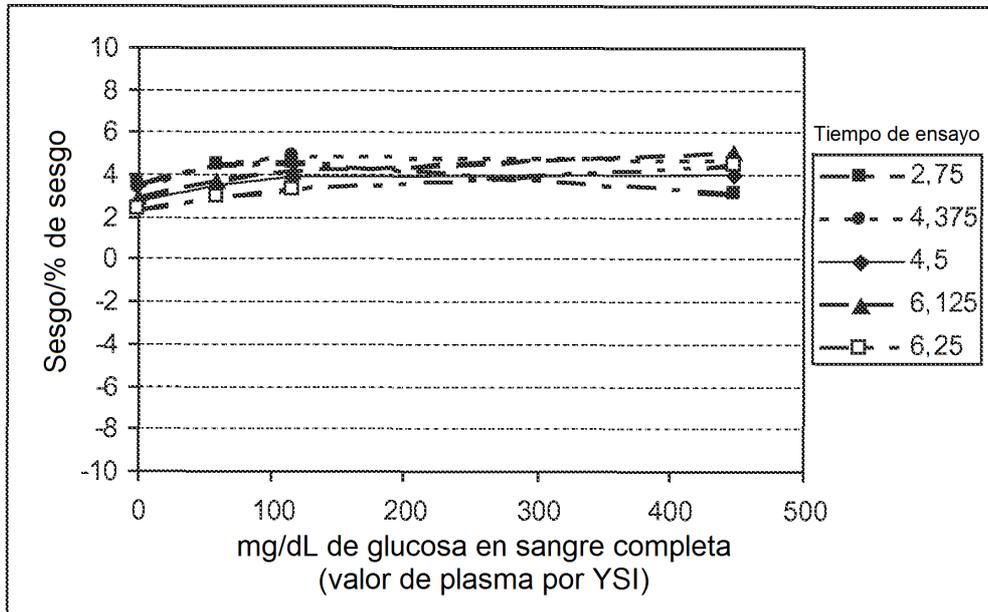


Fig.6D

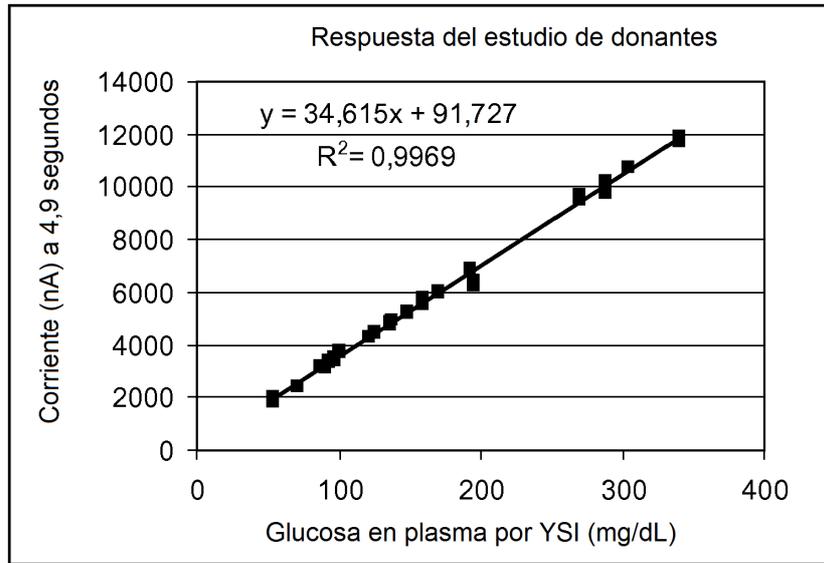


Fig.7A

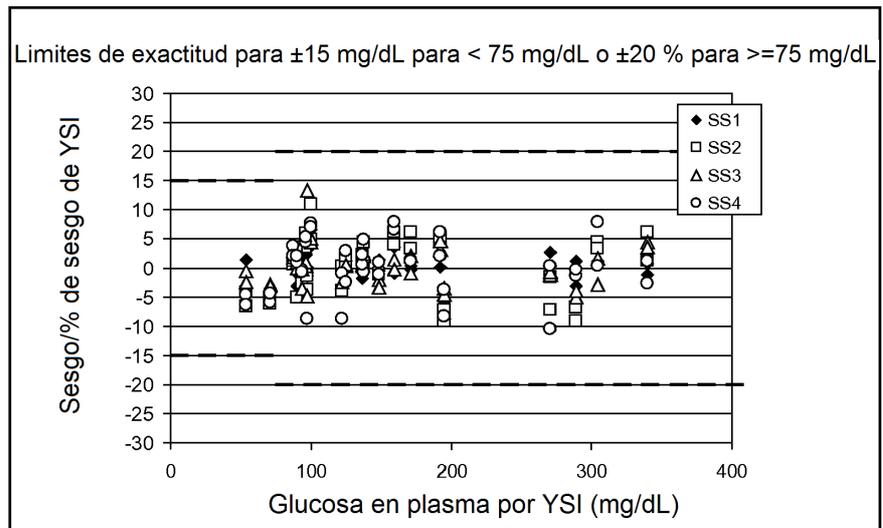


Fig.7B

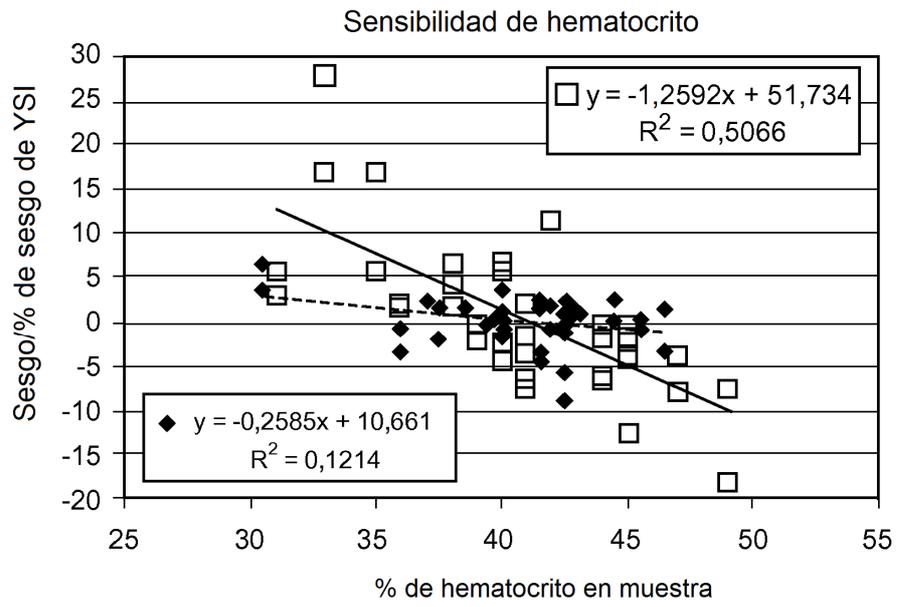


Fig.7C