

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 977**

51 Int. Cl.:

A61B 5/1486 (2006.01)

A61B 5/145 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2006 E 10188262 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 2280276**

54 Título: **Método para análisis electroquímico rápido**

30 Prioridad:

30.09.2005 US 240797

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

07.01.2021

73 Titular/es:

**LIFESCAN, INC. (100.0%)
1000 Gibraltar Drive
Milpitas, CA 95035-6312, US**

72 Inventor/es:

**GUO, SHERRY;
HODGES, ALASTAIR;
CHATELIER, RON y
ZHANG, BIN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 800 977 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

Método para análisis electroquímico rápido

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La detección de analitos en fluidos fisiológicos, por ejemplo sangre o productos derivados de la sangre, es de importancia cada vez mayor para la sociedad de hoy en día. Los ensayos de detección de analitos encuentran uso en una variedad de aplicaciones, que incluyen pruebas de laboratorio clínico, pruebas en casa, etc., donde los resultados de tales pruebas desempeñan una función importante en el diagnóstico y el tratamiento en una variedad de patologías. Los analitos de interés incluyen glucosa para el tratamiento de diabetes, cetonas, colesterol (incluyendo HDL, LDL y/o triglicéridos), hemoglobina A1C y similares. En respuesta a esta importancia creciente de detección de analitos, se ha desarrollado una variedad de protocolos de detección de analitos y dispositivos para tanto uso clínico como en casa.

Un tipo de método que se emplea para la detección de analitos es un método electroquímico. En tales métodos, una muestra de líquido acuoso se dispone dentro de una cámara de reacción de muestra en una tira reactiva, en este caso una celda electroquímica, que incluye dos electrodos, es decir, un primer y segundo electrodo, donde los electrodos tienen una impedancia, que los hace adecuados para la medición amperométrica. El componente que va a analizarse se deja reaccionar directamente con un electrodo, o directa o indirectamente con un mediador para formar una sustancia oxidable (o reducible) en una cantidad correspondiente a la concentración del componente que va a analizarse, es decir, el analito. La cantidad de sustancia oxidable (o reducible) presente se estima entonces electroquímicamente y se relaciona con la cantidad de analito presente en la muestra inicial.

Una estrategia que puede usarse para cuantificar el analito es permitir que el analito llegue a agotarse sustancialmente dentro de la celda electroquímica antes de medir electroquímicamente una sustancia oxidable (o reducible). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, este proceso puede requerir un periodo de tiempo prolongado para alcanzar el agotamiento. Otras estrategias para cuantificar el analito se basan en un periodo de espera más corto. Por ejemplo, puede medirse una corriente de oxidación (o corriente de reducción) durante un periodo de tiempo inferior al requerido para el agotamiento completo y la concentración se calcula extrapolando los datos recogidos. Aunque procedimientos de cálculo más cortos cumplen el deseo de análisis oportunos (especialmente en el caso de la monitorización de glucosa), tales métodos pueden carecer de la exactitud deseada. Por tanto, se desearía desarrollar un método para medir rápidamente y con exactitud la concentración de un analito en una celda electroquímica. Métodos electroquímicos y dispositivos para su uso en la determinación de concentraciones de analito corregidas con hematocrito se conocen del documento WO0157510A2.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método como se define por la reivindicación 1.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las novedosas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

La FIG. 1 muestra una vista en perspectiva en despiece ordenado de una tira reactiva adecuada para su uso en la presente invención;
 la FIG. 2 es una vista en planta desde abajo de la tira reactiva;
 la FIG. 3 es una vista en planta desde arriba de la tira reactiva;
 la FIG. 4 es una vista lateral en sección transversal parcial de una porción distal de la tira reactiva;
 la FIG. 5 es un esquema simplificado que muestra un medidor que se conecta eléctricamente con la tira reactiva;
 la FIG. 6 muestra un ejemplo de una forma de onda de tiempo-potencial que tiene un primer potencial eléctrico inmediatamente seguido de un segundo potencial eléctrico;
 la FIG. 7 es un transitorio de tiempo-corriente generado por un medidor que está probando una tira reactiva dosificada con una muestra fisiológica; y
 la FIG. 8 es una gráfica del sesgo que muestra la relación entre la concentración de glucosa y el sesgo para un método de referencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS DE LA INVENCION

Los métodos y dispositivos objeto son aptos para su uso en la determinación de una amplia variedad de analitos en una amplia variedad de muestras, y son particularmente aptos para su uso en la determinación de

analitos en sangre completa o derivados de la misma, en la que un analito de particular interés es la glucosa. El objeto de la invención proporciona métodos de determinación de un valor de concentración de analito en una muestra fisiológica de un modo rápido y con resultados precisos. En el presente documento se describen estructuras de una realización de tira reactiva a modo de ejemplo que pueden usarse en la medición de un valor de concentración de analito. Además, en el presente documento se describen métodos de uso de la tira reactiva en los que se mide un transitorio de tiempo-corriente y se recoge por un medidor eléctricamente conectado a la tira reactiva. Todavía más, en el presente documento se describen algoritmos que se usan para procesar el transitorio de tiempo-corriente de una manera rápida y que da como resultado valores de concentración de analito exactos.

Pueden usarse métodos objeto, en principio, con cualquier tipo de celda electroquímica que tenga separados el primer y segundo electrodos y una capa de reactivo tal como, por ejemplo, una tira reactiva electroquímica. En un aspecto, una tira reactiva electroquímica incluye dos electrodos opuestos separados por una delgada capa de espaciador, en la que estos componentes definen una cámara de reacción de muestra o zona en la que se localiza una capa de reactivo.

Las FIG. 1 a 4 muestran una vista en perspectiva en despiece ordenado, una vista desde abajo, una vista desde arriba y una vista lateral en sección transversal, respectivamente, de una tira reactiva 62 a modo de ejemplo adecuada para su uso con el método descrito en el presente documento. La tira reactiva 62 incluye una primera capa de electrodo 66, un espaciador 60, una segunda capa de electrodo 64, una porción distal 80 y una porción proximal 82. Cuando está completamente ensamblada, la tira reactiva 62 tiene una cámara de reacción de muestra 61 para recibir una muestra. En un aspecto, la cámara de reacción de muestra 61 para recibir una muestra. En un aspecto, la cámara de reacción de muestra 61 está formada por el área cortada 68 en espaciador 60, la segunda capa de electrodo 64 y la primera capa de electrodo 66. Puede administrarse fluido fisiológico a través de un puerto 70, y en una realización, hay dos puertos 70. En un aspecto, uno de los puertos 70 puede proporcionar una entrada de muestra y el otro puede actuar de ventilación.

En la realización ilustrada, la primera capa de electrodo 66 y la segunda capa de electrodo 64 están separadas en una disposición opuesta o de caras opuestas. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los electrodos pueden estar posicionados en una variedad de formas que incluyen en configuraciones coplanares y no coplanares.

Una porción de la primera capa de electrodo 66 y la segunda capa de electrodo 64 puede proporcionar electrodos 166, 164, respectivamente. Por ejemplo, la porción de la primera capa de electrodo 66 y la segunda capa de electrodo 64 expuestas dentro de la cámara de reacción 61 pueden definir el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164. Además, la primera capa de electrodo 66 puede incluir un primer contacto eléctrico 67 y una muesca en forma de U 65 como se ilustra en la FIG. 1. El primer contacto eléctrico 67, que está eléctricamente conectado al primer electrodo 166 mediante una primera pista de conexión 76, se usa para establecer una conexión eléctrica con un medidor. La segunda capa de electrodo 64 puede incluir un segundo contacto eléctrico 63 que está eléctricamente conectado con el segundo electrodo 164 mediante una segunda pista de conexión 78 como se ilustra en las FIG. 1 a 3. Al segundo contacto eléctrico puede accederse por un medidor mediante la muesca en forma de U 65 como se ilustra en la FIG. 1. Un experto en la materia apreciará que la tira reactiva 62 puede incluir una variedad de configuraciones de contacto eléctrico alternativas para la conexión eléctrica con un medidor. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.379.513 desvela medios de conexión de celda electroquímica.

En una realización, la primera y/o segunda capas de electrodo pueden ser un material conductor formado a partir de materiales tales como oro, paladio, carbono, plata, platino, óxido de estaño, iridio, indio, y combinaciones de los mismos (por ejemplo, óxido de estaño dopado con indio). Además, los electrodos pueden formarse disponiendo un material conductor sobre una hoja aislante (no mostrada) mediante un proceso de pulverización, chapado sin corriente o de impresión serigráfica. En una realización a modo de ejemplo, la segunda capa de electrodo 64 puede ser un electrodo de oro pulverizado y la primera capa de electrodo 66 puede ser un electrodo de paladio pulverizado. Materiales adecuados que pueden emplearse como hoja aislante incluyen, por ejemplo, plásticos (por ejemplo, PET, PETG, poliimida, policarbonato, poliestireno), silicona, cerámica, vidrio, y combinaciones de los mismos.

Una capa de reactivo 72 puede disponerse dentro de la cámara de reacción 61 usando un proceso tal como recubrimiento de ranura, recubrimiento dispensando líquido desde el extremo de un tubo, chorro de tinta e impresión serigráfica. Tales procesos se describen, por ejemplo, en las siguientes patentes de EE.UU. N.º 6.749.887; 6.689.411; 6.676.995; y 6.830.934. En una realización, la capa de reactivo 72 se deposita sobre el primer electrodo 166 e incluye al menos un mediador y una enzima. Un mediador puede estar en cualquiera de los dos estados redox que pueden denominarse una sustancia oxidable o una sustancia reducible. Ejemplos de mediadores adecuados incluyen ferricianuro, ferroceno, derivados de ferroceno, complejos de osmio-bipiridilo y derivados de quinona. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa (GDH) basada en un co-factor de pirroloquinolina-quinona, y GDH basado en un co-factor de nicotinamida adenina dinucleótido. Una formulación de reactivo a modo de ejemplo, que sería adecuada para hacer la capa de reactivo 72, se describe en la solicitud de EE.UU. en trámite N.º 10/242.951, titulada Method for Manufacturing a Sterilized and Calibrated Biosensor-Based Medical Device, publicada como la solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 2004/0120848.

En una realización, la cámara de reacción de muestra 61 se define por el primer electrodo 166, el segundo electrodo 164 y el espaciador 60 como se muestra en la FIG. 1 a 4. Específicamente, el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 definen la parte superior y la parte inferior de la cámara de reacción de muestra 61, mientras que la capa de espaciador define las paredes laterales de la cámara de reacción de muestra 61. Por ejemplo, el espaciador 60 puede incluir un área cortada 68 que define una cámara de reacción de muestra 61 para la tira reactiva 62.

La altura del espaciador 60 puede definir la distancia entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164. En un aspecto, la altura del espaciador 60 está en el intervalo de aproximadamente 1 micrómetro a 500 micrómetros, preferentemente entre aproximadamente 10 y 400 micrómetros, y más preferentemente entre aproximadamente 40 micrómetros y 200 micrómetros.

En una realización, la tira reactiva 62 incluye el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 posicionados de forma que estén separados solo una corta distancia. En un escenario tal, puede producirse el ciclo de redox en el que el mediador oxidado generado en el primer electrodo 166 puede difundir al segundo electrodo 164 para reducirse y posteriormente difundir de nuevo al primer electrodo 166 para oxidarse otra vez.

Cualquiera del primer electrodo 166 o el segundo electrodo 164 puede realizar la función de un electrodo de trabajo que oxida o reduce una cantidad limitante de mediador dependiendo de la polaridad aplicada del medidor. Por ejemplo, si la especie limitante de la corriente es un mediador reducido, entonces puede oxidarse en el primer electrodo 166 en tanto que se aplique un potencial suficientemente positivo con respecto al segundo electrodo 164. En una situación tal, el primer electrodo 166 realiza la función del electrodo de trabajo y el segundo electrodo 164 realiza la función de un contraelectrodo/electrodo de referencia.

Similarmente, si se aplica un potencial suficientemente negativo con respecto al segundo electrodo 164, entonces el mediador reducido puede oxidarse en el segundo electrodo 164. En una situación tal, el segundo electrodo 164 realiza la función del electrodo de trabajo y el primer electrodo 166 realiza la función del contraelectrodo/electrodo de referencia.

Una primera etapa en los métodos objeto puede incluir introducir una cantidad de la muestra fisiológica de interés en una celda electroquímica que incluye separados el primer y el segundo electrodos y una capa de reactivo. La muestra fisiológica puede variar, pero en muchas realizaciones es generalmente sangre completa o un derivado o fracción de la misma, en la que la sangre completa es de particular interés. La muestra fisiológica, por ejemplo sangre, se dosifica dentro de la cámara de reacción de muestra 61 mediante el puerto 70. En un aspecto, el puerto 70 y/o la cámara de reacción 61 están dimensionados de forma que la acción capilar haga que la muestra fisiológica llene la cámara de reacción de muestra.

La FIG. 5 proporciona un esquema simplificado que muestra un medidor 100 que conecta con el primer contacto eléctrico 67 y el segundo contacto eléctrico 63, que están en comunicación eléctrica con el primer y el segundo electrodo 166, 164, respectivamente, de la tira reactiva 62. El medidor 100 está adaptado para conectarse eléctricamente con el primer electrodo 164 y el segundo electrodo 166, mediante el contacto eléctrico 63 y el segundo contacto eléctrico 67 (como se muestra en las FIG. 2 y 5). En un aspecto, el medidor 100 hace contacto con el contacto eléctrico 63 mediante la muesca en forma de U 65.

Como se ilustra en la FIG. 5, el contacto eléctrico 67 puede comprender dos dientes, 67a, 67b. En una realización a modo de ejemplo, el medidor 100 conecta por separado los dientes 67a, 67b, de forma que cuando el medidor 100 se conecta con la tira reactiva 62 se complete un circuito. El medidor 100 puede usar el circuito cerrado a través de la capa de electrodo 66 como una señal de que la tira reactiva está en su sitio. Un experto en la materia apreciará que el medidor 100 puede usar una variedad de sensores y circuitos para determinar cuándo la tira reactiva 62 está adecuadamente colocada con respecto al medidor.

En una realización, el primer contacto eléctrico 67 y el segundo contacto eléctrico 63 se conectan con una fuente de tensión E. Cuando se realiza una prueba, a la fuente de tensión E se aplica un primer potencial eléctrico entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 durante un primer intervalo de tiempo. El primer potencial eléctrico puede aplicarse inmediatamente después de que se detecte que la muestra fisiológica está en la cámara de reacción de muestra. En un aspecto, la muestra fisiológica puede detectarse por una técnica automática en la que el medidor monitoriza un cambio en la tensión (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.193.873), corriente o capacitancia, un cambio que indica que la muestra ha sido dosificada dentro de la cámara de reacción de muestra. Alternativamente, la muestra fisiológica puede detectarse por una técnica manual en la que el usuario observa visualmente el llenado de la cámara de reacción de muestra e inicia la prueba pulsando un botón.

Después de que la muestra haya entrado en la celda, un primer potencial eléctrico, que tiene una primera polaridad, puede aplicarse a la cámara de reacción de muestra 61 y medirse una corriente resultante en función del tiempo. Al menos una porción de los datos (corriente en función del tiempo) proporciona un primer transitorio de

tiempo-corriente. El primer potencial eléctrico puede ser suficientemente negativo con respecto al segundo electrodo 164 de forma que el segundo electrodo 164 funcione como el electrodo de trabajo en el que se mide una corriente de oxidación limitante. Después de transcurrir el primer intervalo de tiempo, la fuente de tensión E aplica un segundo potencial eléctrico entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 durante un segundo intervalo de tiempo. El segundo potencial eléctrico produce una corriente que se mide en función del tiempo para producir un segundo transitorio de tiempo-corriente. En una realización, el segundo potencial tiene una segunda polaridad, que es opuesta a la primera polaridad. Por ejemplo, el segundo potencial puede ser suficientemente positivo con respecto al segundo electrodo 164 de forma que el primer electrodo 166 funcione como el electrodo de trabajo en el que se mide una corriente de oxidación limitante. En un aspecto, el primer potencial eléctrico y el segundo potencial eléctrico pueden oscilar de aproximadamente -0,6 V a aproximadamente +0,6 V. El intervalo de tiempo de los transitorios de tiempo-corriente puede, en una realización, estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 segundos a 10 segundos, y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 segundos. En otra realización, una suma del primer intervalo de tiempo y el segundo intervalo de tiempo es inferior a aproximadamente 5 segundos. Debe también observarse que el primer intervalo de tiempo no tiene que ser el mismo que el segundo intervalo de tiempo.

En una realización, el segundo potencial eléctrico se aplica inmediatamente tras la aplicación del primer potencial eléctrico. En una realización alternativa, un retardo o potencial de circuito abierto se introduce entre el primer potencial eléctrico y el segundo potencial eléctrico. En otra realización alternativa, se introduce un retardo después de que la muestra fisiológica se detecte en la cámara de reacción de muestra, pero antes de la aplicación del primer potencial eléctrico. El retardo puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 y 3 segundos, preferentemente entre 0,05 y 1 segundos, y lo más preferentemente entre 0,1 y 0,5 segundos.

La FIG. 6 muestra un ejemplo de una forma de onda de tiempo-potencial que tiene un primer potencial eléctrico de -0,3 V durante 3 segundos inmediatamente seguido de un segundo potencial eléctrico de +0,3 V durante 2 segundos. La FIG. 7 muestra la corriente medida resultante como un primer transitorio de tiempo-corriente 73 inmediatamente seguido de un segundo transitorio de tiempo-corriente 74.

En un ejemplo de la presente divulgación no de acuerdo con la invención, la concentración de analito se determina a partir de los datos de transitorio de tiempo-corriente medidos (FIG. 7). El método incluye usar el primer y segundo transitorios de tiempo-corriente, obtenidos como se ha descrito anteriormente, para determinar: (a) una variable γ ; y (b) una concentración de analito preliminar C_0 para el analito de interés en la muestra. Debe observarse que γ se define como

$$\frac{i_{ss}}{i_{pp}}$$

El término i_{pp} es la corriente promedio durante un corto periodo de tiempo cerca del fin del primer transitorio de tiempo-corriente. Por ejemplo, si el primer intervalo de tiempo dura 3 segundos, la corriente promedio puede ser la corriente promedio de 1,9 a 2,9 segundos del periodo de duración de 3 segundos.

El término i_{ss} es el valor de corriente en estado estacionario para el segundo transitorio de tiempo-corriente. Debido a que la altura del espaciador es aproximadamente inferior o igual a la altura de la capa de difusión, la corriente tiende hacia un valor estacionario. El término i_{ss} puede estimarse usando la Ecuación 2, para corrientes veces mayores que un tiempo mínimo, en las que un tiempo mínimo adecuado puede estimarse a partir de la Ecuación 1.

$$\text{Eq. 1} \quad t_{min} = \frac{-L^2 \ln 0.01}{12\pi^2 D}$$

$$\text{Eq. 2} \quad i(t) = i_{ss} \left\{ 1 + 4 \exp\left(\frac{-4\pi^2 D t}{L^2}\right) \right\}$$

en la que, i_{ss} la corriente en estado estacionario tras la aplicación del segundo potencial eléctrico; i es la corriente medida que es una función de tiempo; D es el coeficiente de difusión de la molécula activa para redox, en la que este coeficiente puede determinarse a partir de la primera ley de Fick, es decir, $J(x,t) = -D \frac{dC(x,t)}{dx}$; L es el espesor del espaciador; y t es el tiempo para la aplicación del segundo potencial eléctrico en el que $t=0$ para el comienzo del pulso.

La concentración de analito preliminar C_0 para el analito de interés en la muestra se calcula usando la

siguiente Ecuación 3

5 **Eq. 3**
$$i_{ss} = \frac{2FADC_o}{L}$$

en la que F es la constante de Faraday, es decir, $9,6485 \times 10^4$ C/mol, y A es el área del primer electrodo.

10 La Ec. 4 muestra la ecuación usada para convertir la corriente medida en una concentración de analito [C] en la que CF es el factor de corrección y Z es una constante que explica las corrientes de fondo.

Eq. 4
$$[C] = CF \times [C_o - Z]$$

15 El término CF puede ser una ecuación empírica, basada en γ y C_o , que hace que la concentración de analito [C] sea más exacta. Un ejemplo de una expresión matemática para CF se muestra en la Ec. 5 en la que b, c y d son constantes.

20 **Eq. 5**
$$CF = \frac{1}{b + \left[\frac{c \times \ln(C_o)}{C_o} \right] + [d \times \ln(\gamma)]}$$

25 Por tanto, las Ecuaciones 1 a 5 pueden usarse para calcular una concentración de analito. Sin embargo, el cálculo de C_o e i_{ss} es matemáticamente intenso y requiere un microprocesador relativamente rápido.

30 Una realización proporciona un algoritmo para medir una concentración de analito que es matemáticamente más simple y puede proporcionar una concentración de analito exacta.

El cálculo de tanto CF como C_o se evita. El solicitante ha encontrado que la concentración de analito inicial puede calcularse por integración de segundas medidas de pulsos en un pequeño intervalo de tiempo. En lugar de calcular C_o , puede sustituirse un valor de corriente integrativo.

35 Por ejemplo, para calcular CF y C_o , un primer valor de corriente integrativo I_1 y un segundo valor de corriente integrativo I_2 se calculan a partir del segundo transitorio de tiempo-corriente y un tercer valor de corriente integrativo I_3 se calcula a partir del primer transitorio de tiempo-corriente. Entonces se calcula una relación que incluye el segundo valor de corriente integrativo I_2 dividido entre el tercer valor de corriente integrativo I_3 . Esta relación proporciona el factor de corrección mientras que el primer valor integrativo I_1 proporciona un valor que puede sustituirse de la concentración inicial. Un experto en la materia apreciará que los nombres "primer", "segundo" y "tercero" se eligen por comodidad y no reflejan necesariamente el orden en el que se calculan los valores de corriente integrativos.

45 Para mejorar la exactitud de los resultados y reducir la influencia de variación de la tira reactiva pueden usarse varios parámetros empíricos. En un aspecto, I_1 puede multiplicarse por una constante a y la variable Z puede restarse del producto de multiplicación de a e I_1 , para explicar corrientes de fondo. En otro aspecto, la relación I_2 / I_3 puede establecerse para ser la potencia p.

50 La Ec. 6 ilustra las etapas de cálculo.

55 **Eq. 6**
$$[C] = \left(\frac{I_2}{I_3} \right)^p \times (a \times I_1 - z)$$

La sustitución del primer, segundo y tercer valores de corriente dentro de la Ec. 6 permite determinar concentraciones de analito exactas en un marco de tiempo relativamente corto. Se evitan el cálculo que requiere tiempo y amplios recursos de ordenador de la corriente en estado estacionario y concentración de analito inicial, produciendo análisis más simple y tiempo de prueba del ensayo reducido. En particular, como I_1 puede determinarse basándose en la integración de valores de corriente, requiere significativamente menos potencial computacional en comparación con un cálculo de C_o , que requiere un algoritmo iterativo.

65 El uso de valores de corriente integrados puede proporcionar el cálculo rápido de la concentración de analito. Por ejemplo, el método de aplicar un primer y segundo potencial eléctrico y calcular la concentración de analito puede realizarse en menos de aproximadamente 10 segundos. En otra realización, la concentración de analito

puede calcularse en menos de aproximadamente 6 segundos, y en otra realización más, la concentración de analito puede calcularse en menos de aproximadamente 5 segundos.

El primer valor de corriente integrativo I_1 y el segundo valor de corriente integrativo I_2 son, en un aspecto, una integral de valores de corriente con respecto a un intervalo de tiempo del segundo transitorio de tiempo-corriente, o un sumatorio de valores de corriente con respecto a un intervalo de tiempo del segundo transitorio de tiempo-corriente. De manera similar, el tercer valor de corriente I_3 puede ser una integral de valores de corriente con respecto a un intervalo de tiempo del primer transitorio de tiempo-corriente, o un sumatorio de valores de corriente con respecto a un intervalo de tiempo del primer transitorio de tiempo-corriente.

En un aspecto, la capa de reactivo 72 está dispuesta sobre el primer electrodo 166 y así generalmente queda próxima al primer electrodo 166 después de su disolución con muestra fisiológica. Esto produce, al menos inicialmente, que una mayor proporción de sustancia oxidable esté próxima al primer electrodo 166. Después de que haya pasado un cierto periodo de tiempo, el mediador reducido, generado en la capa de reactivo 72 mediante la reacción de glucosa, difundirá pasivamente del primer electrodo 166 al segundo electrodo 164. Durante la aplicación del primer potencial eléctrico, el segundo electrodo 164 oxida el mediador reducido a medida que difunde del primer electrodo 166. Durante este proceso, la magnitud de la concentración de mediador entre el primer electrodo 166 y el segundo electrodo 164 forma un gradiente en el que la concentración de mediador reducido es mayor en el primer electrodo 166 y menor en el segundo electrodo de trabajo 164. Una gran concentración de mediador reducido en el primer electrodo 166 hará que la magnitud del gradiente llegue a ser más inclinada. La magnitud de esta corriente de oxidación es proporcional a la magnitud de este gradiente. Por tanto, la cantidad de mediador reducido generada por la capa de reactivo 72 conduce la difusión de mediador reducido al segundo electrodo 164. La tasa de cambio de la corriente medida en los electrodos es así indicativa de la tasa de cambio de la concentración de mediador reducido en la capa de reactivo 72 y también de la reacción cinética de glucosa (es decir, la tasa de reacción de glucosa que genera mediador reducido).

La reacción cinética de glucosa depende de varios factores que incluyen la altura del espaciador 60 (como se refiere a la máxima distancia que tiene que difundir la glucosa para llegar a la capa de reactivo 72), viscosidad de la muestra fisiológica, concentración de hematocrito y la temperatura.

Un aumento en la viscosidad en la muestra fisiológica puede producirse con el aumento en el hematocrito, proteína, contenido de lípido, o combinación de los mismos. Hematocrito se refiere a la proporción de glóbulos rojos en una muestra de sangre. Normalmente, una mayor proporción de glóbulos rojos hace que la sangre sea más viscosa y haga que una mayor proporción de la glucosa total esté dentro de los glóbulos rojos. Con el fin de que la glucosa dentro de los glóbulos rojos reaccione con la capa de reactivo 72, la glucosa debe transportarse a través de la membrana de los glóbulos rojos. Bajo ciertas condiciones, este transporte puede ser relativamente lento para limitar la reacción cinética de la glucosa. Por tanto, mayor hematocrito ralentiza la reacción cinética de la glucosa. La viscosidad generalmente ralentiza el proceso de difusión general dentro de la cámara de reacción de muestra 61. Una mayor temperatura generalmente aumenta la velocidad de reacción de la glucosa con la capa de reactivo 72 dentro de la cámara de reacción de muestra 61 ya que acelera los procesos de transporte implicados.

En el método desvelado en el presente documento, la reacción cinética de la glucosa se tiene en cuenta usando transitorios de tiempo-corriente. El resultado es menos dependencia de la concentración de hematocrito y temperatura, y exactitud y precisión mejoradas en la determinación de la concentración de glucosa.

La magnitud del segundo transitorio de tiempo-corriente generalmente será mayor que la magnitud absoluta del primer transitorio de tiempo-corriente. Así, la relación I_2 / I_3 generalmente será superior a la unidad mientras que la reacción de glucosa está en progreso dentro de la cámara de reacción de muestra 61 y sería la unidad cuando se completara la reacción de la glucosa. La desviación de la relación I_2 / I_3 de la unidad será, por tanto, un factor que indica el grado de completitud de la reacción. Valores relativamente grandes de I_2 / I_3 indicarán que la reacción de glucosa está lejos de completarse, mientras que valores de I_2 / I_3 próximos a la unidad indicarán que la reacción de glucosa está casi completa. Por tanto, la relación I_2 / I_3 generalmente proporciona información sobre el progreso de la reacción de la glucosa y puede usarse para eliminar el efecto del hematocrito, viscosidad y temperatura sobre la medición de la concentración de glucosa.

Para refinar adicionalmente los cálculos, pueden usarse uno o más factores de calibración. Por ejemplo, como se muestra en la Ec. 6, la relación I_2 / I_3 se ajusta a p exponencial en la que p es un factor de calibración que puede usarse para un lote particular de tiras reactivas. El uso del exponente p se encontró mediante medios empíricos para mejorar la exactitud y permitir tiempos de prueba rápidos. En una realización de la invención, p puede oscilar de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 4 y preferentemente entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 1.

Como se muestra en la Ec. 6, puede usarse un factor de calibración a para explicar posibles variaciones en el área cortada 68 y la altura de espaciador 60. Variaciones en el área cortada 68 pueden producir un desplazamiento sistemático en la magnitud de la corriente medida. En ciertas circunstancias, los procesos de

fabricación pueden hacer que el área del electrodo varíe de un lote de tiras reactivas a otro lote de tiras reactivas. Similarmente, la altura del espaciador 60 también puede variar entre lotes. Variaciones en la altura del espaciador 60 tienen un impacto proporcional sobre la corriente medida. El cálculo de un factor de calibración a para cada lote de tira reactiva ayuda a compensar las variaciones en el área del electrodo y la altura del espaciador 60. El término a puede calcularse durante el proceso de calibración de un lote de tiras reactivas.

En una realización, como se muestra en la Ec. 6, se usa un factor de calibración Z para explicar variaciones en el fondo. Una corriente que se genera a partir de fuentes distintas de glucosa puede contribuir a la señal de fondo. Por ejemplo, si la capa de reactivo 72 fuera a contener una pequeña cantidad de sustancia oxidable como impureza antes de añadir una muestra fisiológica a la tira reactiva, entonces habría un aumento en la corriente medida (es decir, fondo) que no podría atribuirse a la concentración de glucosa. Debido a que esto produciría un sesgo constante en la corriente medida global para un lote particular de tiras reactivas, este sesgo puede corregirse para usar el factor de calibración Z . Similar a los términos p y a , Z también puede calcularse durante el proceso de calibración.

Mientras que el método desvelado en el presente documento se describe con el uso de factores de calibración p , a y Z , un experto en la materia apreciará que no se requiere su uso. Por ejemplo, en una realización, la concentración de glucosa podría calcularse sin p , a y/o Z (p y/o a podrían establecerse iguales a uno y Z podría establecerse igual a cero).

La selección del intervalo de tiempo en el que I_1 , I_2 e I_3 se calculan puede determinarse con un algoritmo de entrenamiento para un tipo de tira reactiva particular. Durante el algoritmo de entrenamiento, varias tiras reactivas se probarían durante un intervalo de condiciones que un usuario puede encontrar durante la prueba. Tales condiciones pueden incluir un intervalo de concentración de glucosa de 20 mg/dl a 600 mg/dl, un intervalo de hematocrito del 0 % al 70 %, un intervalo de temperatura de 5 °C a 45 °C, intervalo de humedad del 5 % de humedad relativa (% de HR) al 95 % de HR, e interferentes endógenos y exógenos. Ejemplos de interferentes endógenos y exógenos y su intervalo fisiológico de concentración pueden encontrarse en la publicación titulada National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline EP7-P. Wayne, Pa.:NCCLS, 1986 que se incorpora por referencia en el presente documento. Usando técnicas de minimización de errores estándar, se definió una selección optimizada de intervalos de tiempo para I_1 , I_2 e I_3 de forma que la concentración calculada de glucosa usando la Ecuación 6 fuera exacta (por ejemplo, dentro del 10 % de medición de referencia) y con precisión (por ejemplo, variación de tira a tira de aproximadamente el 2 % a 1σ). Un experto en la materia apreciará que el intervalo de tiempo elegido para el primer y el segundo valores de corriente integrativos pueden así ser iguales o diferentes, y en una realización, solo dos valores de corriente integrativos se calculan. Entonces, el primer valor de corriente integrativo se usa para I_1 e I_2 .

Después de elegir los intervalos de tiempo para I_1 , I_2 e I_3 , puede calibrarse el lote de tiras. Métodos a modo de ejemplo de calibración de lotes de tiras se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.780.645. Más particularmente, los factores de calibración a , p y/o Z pueden calcularse para un lote particular de tiras reactivas. Normalmente, se prueban un intervalo de concentraciones de glucosa en sangre de múltiples donantes usando las tiras reactivas de glucosa y también un instrumento de referencia que se sabe que es exacto y preciso. El error entre los resultados de las tiras reactivas de la presente invención y el método de referencia se minimiza por el hallazgo de la combinación óptima de a , p y/o Z . En una realización, la información de calibración puede transmitirse a un medidor de glucosa antes de usar una tira reactiva del lote de tiras reactivas.

En otra realización, los factores que controlan los valores de a , p y Z pueden controlarse de forma suficientemente estrecha durante la fabricación de tal forma que sean los mismos entre lotes de tiras. Los criterios para ser capaz de emplear satisfactoriamente esta realización es que los múltiples lotes de tiras dan una exactitud de respuesta dentro de límites especificados con los mismos valores de a , p y Z empleados en el algoritmo. Esta realización obvia la necesidad de un sistema para transmitir la información de calibración al medidor, ya que los valores predeterminados de a , p y Z pueden almacenarse en el medidor durante la fabricación. Los principales parámetros que necesitan ser estrictamente controlados para que esta realización tenga utilidad es la geometría de la celda del sensor (las áreas y separación de electrodos) y que haya un exceso suficiente de actividad de reacción de glucosa en los reactivos de forma que la velocidad de reacción de glucosa esté sustancialmente controlada por el transporte de masa en vez de controlada por la velocidad de reacción química.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los principios y la práctica de la presente invención. Numerosas realizaciones adicionales dentro del alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia.

Ejemplo 1

Se preparó un tampón que contenía citraconato 100 mM a pH 6,5, 0,1 % de antiespumante (RNA Equilibrator) y CaCl_2 4 mM. A continuación, GDH que usó un cofactor de PQQ, se añadió al tampón de manera que fuera 46 mg/ml. Entonces se añadió PQQ al tampón de manera que pudiera activar la GDH. PQQ se añadió al tampón de forma que hubiera al menos 2 moles de PQQ por mol de GDH. Después de la adición de PQQ, la

5 formulación se dejó incubar aproximadamente una hora. A continuación, se añadió ferricianuro de potasio a la mezcla de forma que fuera 800 mM. La formulación se aplicó en tiras sobre el primer electrodo 166 como se muestra en la FIG. 1 por medio de un proceso de recubrimiento de ranura que se describe en las patentes de EE.UU. N.º 6749887; 6689411; y 6676995. Tras el recubrimiento de la formulación y secarla de forma que formara la capa de reactivo 72, el espaciador 60 y el segundo electrodo 164 se ensamblan encima para formar la tira reactiva 62.

Ejemplo 2

10 Se probaron varias tiras reactivas 62 con sangre para un amplio intervalo de concentraciones de glucosa de aproximadamente 20 mg/dl a aproximadamente 600 mg/dl en sangre. Se usaron veintitrés donantes de sangre diferentes para este estudio. Las tiras reactivas 62 se probaron usando un tiempo de prueba de cinco segundos. La corriente medida se convirtió en una concentración de glucosa usando la Ec. 5. Se calculó un sesgo para cada tira reactiva contra el método de referencia. A baja concentración de glucosa (<100 mg/dl) se calculó un sesgo absoluto y a glucosa alta (≥ 100 mg/dl) se calculó un porcentaje de sesgo. La FIG. 8 muestra que el 93 % de los puntos de
15 datos tienen un sesgo inferior o igual al 10 % o 10 mg/dl.

Se aplicó un primer potencial entre los electrodos estando el electrodo recubierto de reactivo a -300 mV con respecto al otro electrodo durante 4,0 segundos, entonces se invirtió el potencial de forma que el electrodo recubierto de reactivo estuviera a +300 mV con respecto al otro electrodo durante 1 segundo. Se midieron los
20 valores de corriente a intervalos de 50 ms y se guardaron. Para realizar este análisis, el primer valor de corriente integrativo I_1 se obtuvo sumando los valores de corriente almacenados entre 4,8 y 5,0 segundos después de invertirse el potencial. I_2 se obtuvo similarmente sumando los valores de corriente entre 4,7 y 5,0 segundos después de invertirse el potencial e I_3 sumando los valores de corriente entre 1,6 y 4,0 segundos después de aplicar el potencial original. Los valores de a , p y Z se determinaron empíricamente y fueron 1,29, 0,645 y 3,64
25 respectivamente.

Como se muestra en la FIG. 8, el uso del primer, segundo y tercer valores de corriente integrativos para calcular la concentración de analito proporcionó información de concentración exacta de una manera rápida.

30 Se reconoció que las estructuras ilustradas y descritas en el presente documento pueden sustituirse con estructuras equivalentes y que la realización descrita de la invención no es la única estructura que puede emplearse para implementar la invención reivindicada. Un ejemplo de una estructura equivalente, que puede usarse para implementar la presente invención, se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.413.410. Otro ejemplo de una estructura equivalente, que puede usarse para implementar la presente invención, se describe en las patentes de
35 EE.UU. N.º 6.612.111 y 6.284.125.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para aquellos expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solo. Ahora se producirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones por aquellos expertos en la
40 materia sin apartarse de la invención. Debe entenderse que las diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden emplearse en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que así se cubran los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una concentración de analito en una muestra fisiológica, el método comprendiendo:

- 5 (a) introducir la muestra fisiológica dentro de una celda electroquímica para iniciar una reacción con un reactivo en la celda, la celda electroquímica comprendiendo el primer y el segundo electrodos en una relación separada, la capa de reactivo comprendiendo una enzima y un mediador;
- (b) aplicar un primer potencial eléctrico que tiene una primera polaridad a la celda de reacción y medir la corriente de la celda en función del tiempo para obtener un primer transitorio de tiempo-corriente;
- 10 (c) aplicar un segundo potencial eléctrico que tiene una segunda polaridad a la celda, en donde la segunda polaridad es opuesta a la primera polaridad, y medir la corriente de la celda en función del tiempo para obtener un segundo transitorio de tiempo-corriente; y
- (d) calcular un primer valor de corriente en base a una integral de valores de corriente con respecto a un primer intervalo de tiempo del segundo transitorio de tiempo-corriente y un segundo valor de corriente en base a una integral de valores de corriente con respecto a un segundo intervalo de tiempo del segundo transitorio de tiempo-corriente, y calcular un tercer valor de corriente en base a una integral de valores de corriente con respecto a un tercer intervalo de tiempo del primer transitorio de tiempo-corriente, en donde el primer, el segundo y el tercer intervalos de tiempo se determinan empíricamente de tal manera que la concentración de analito determinada sea precisa dentro del $\pm 10\%$ de una medición de referencia, y tenga variación del 2 % en 1σ ;
- 15 (e) calcular una relación que comprende el segundo valor de corriente dividido entre el tercer valor de corriente;
- (f) calcular un factor de corrección estableciendo la relación a una potencia p;
- 20 (g) multiplicar el primer valor de corriente menos un valor de fondo por el factor de corrección para derivar la concentración de analito.
- 25

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el analito comprende glucosa.

30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la muestra fisiológica comprende un material seleccionado del grupo que consiste de sangre completa, plasma, suero fluido intersticial, orina, o combinaciones de los mismos.

35

40

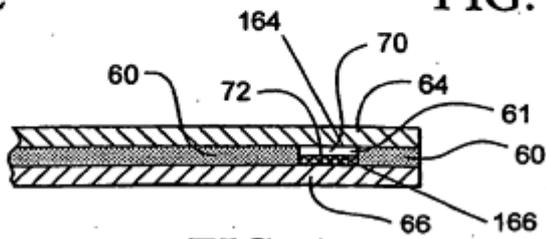
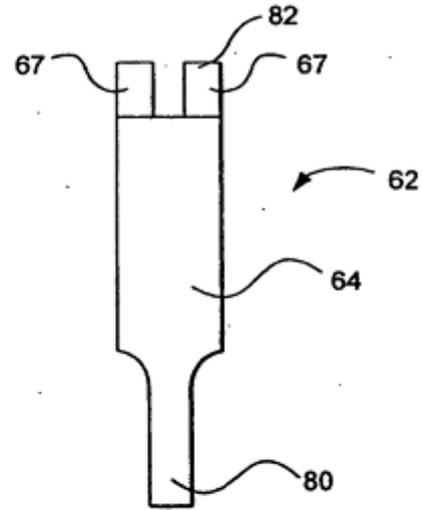
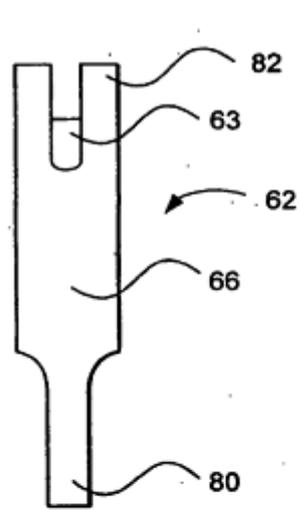
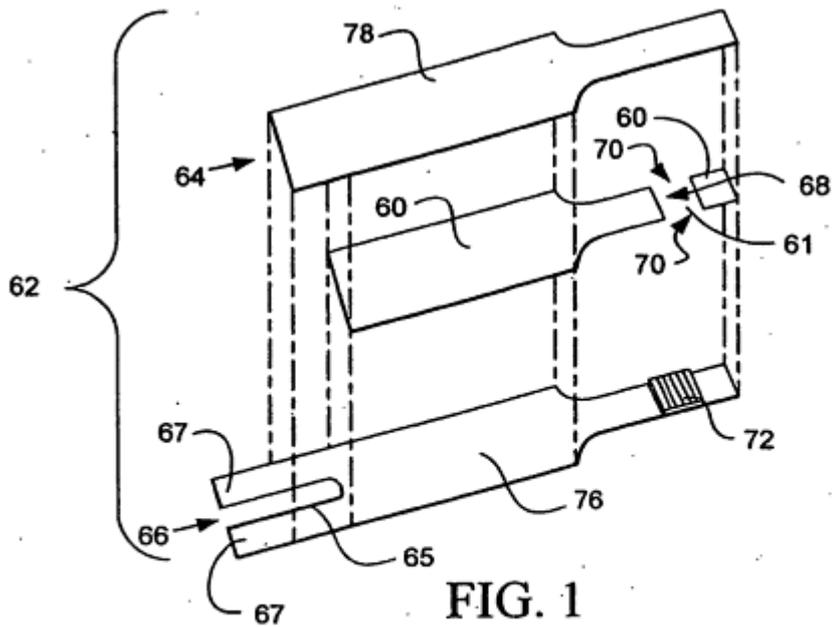
45

50

55

60

65



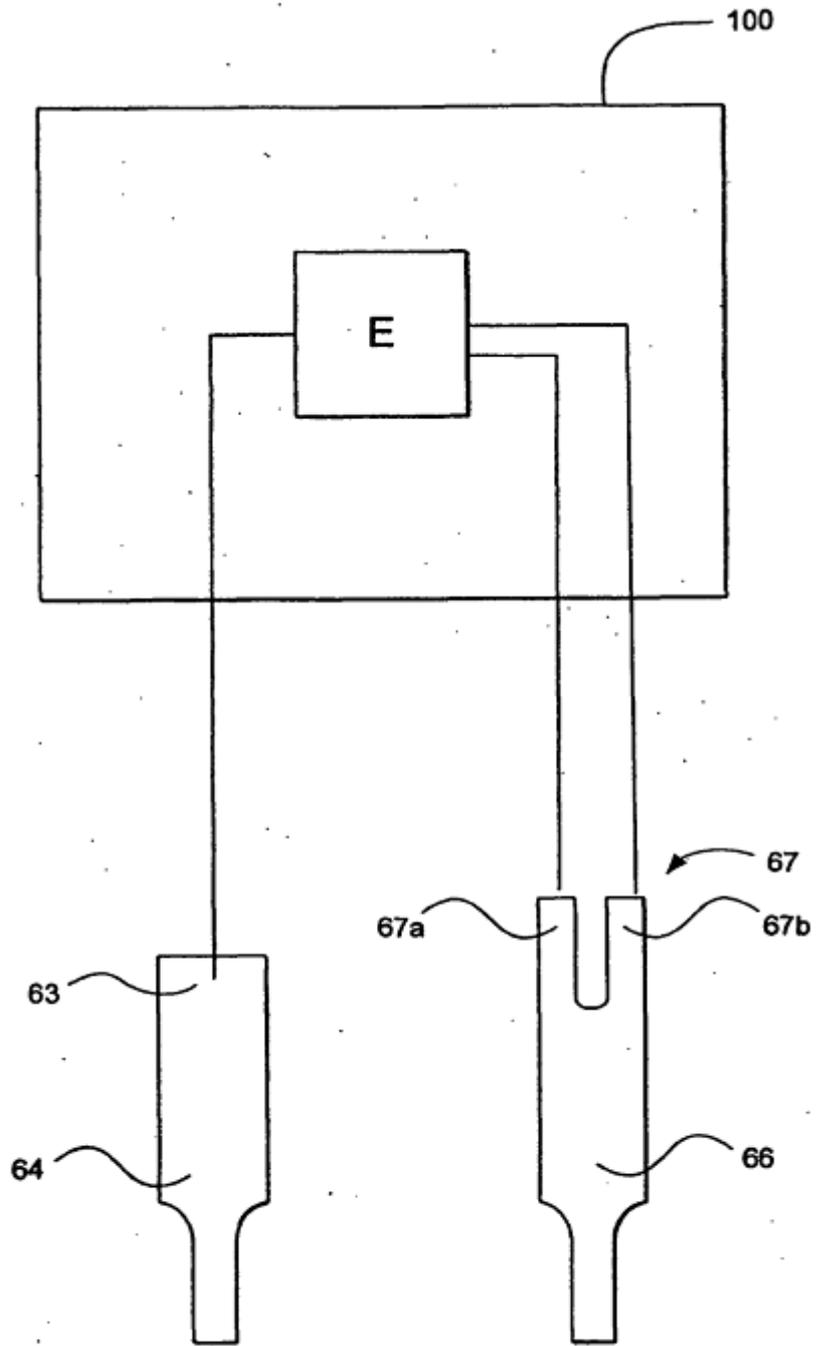


FIG. 5

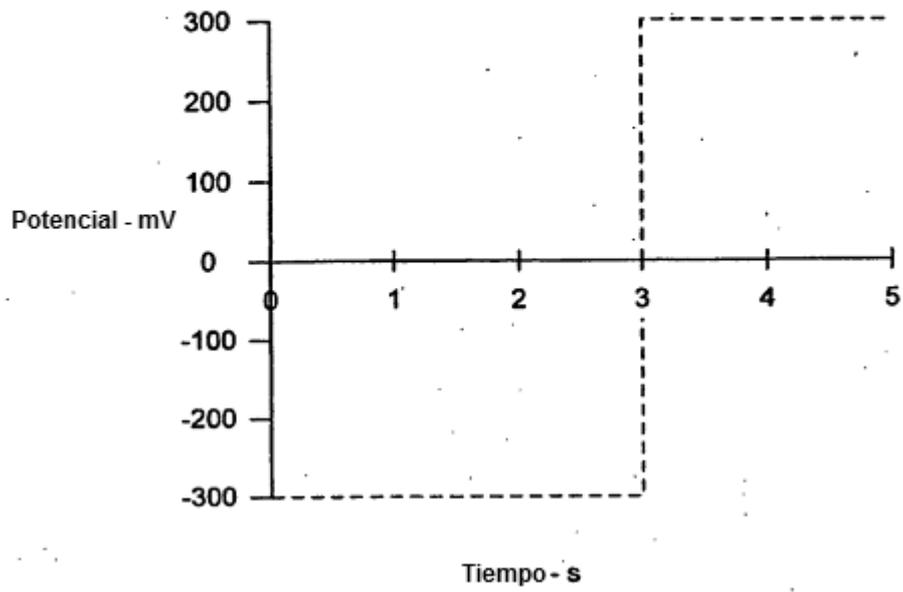


FIG. 6

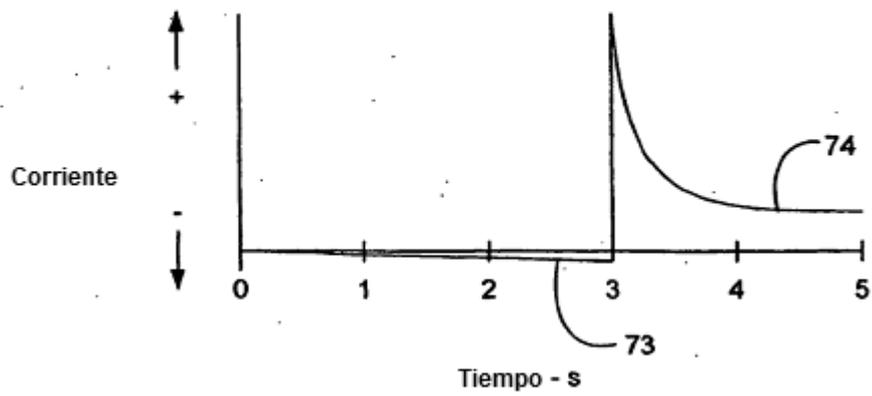
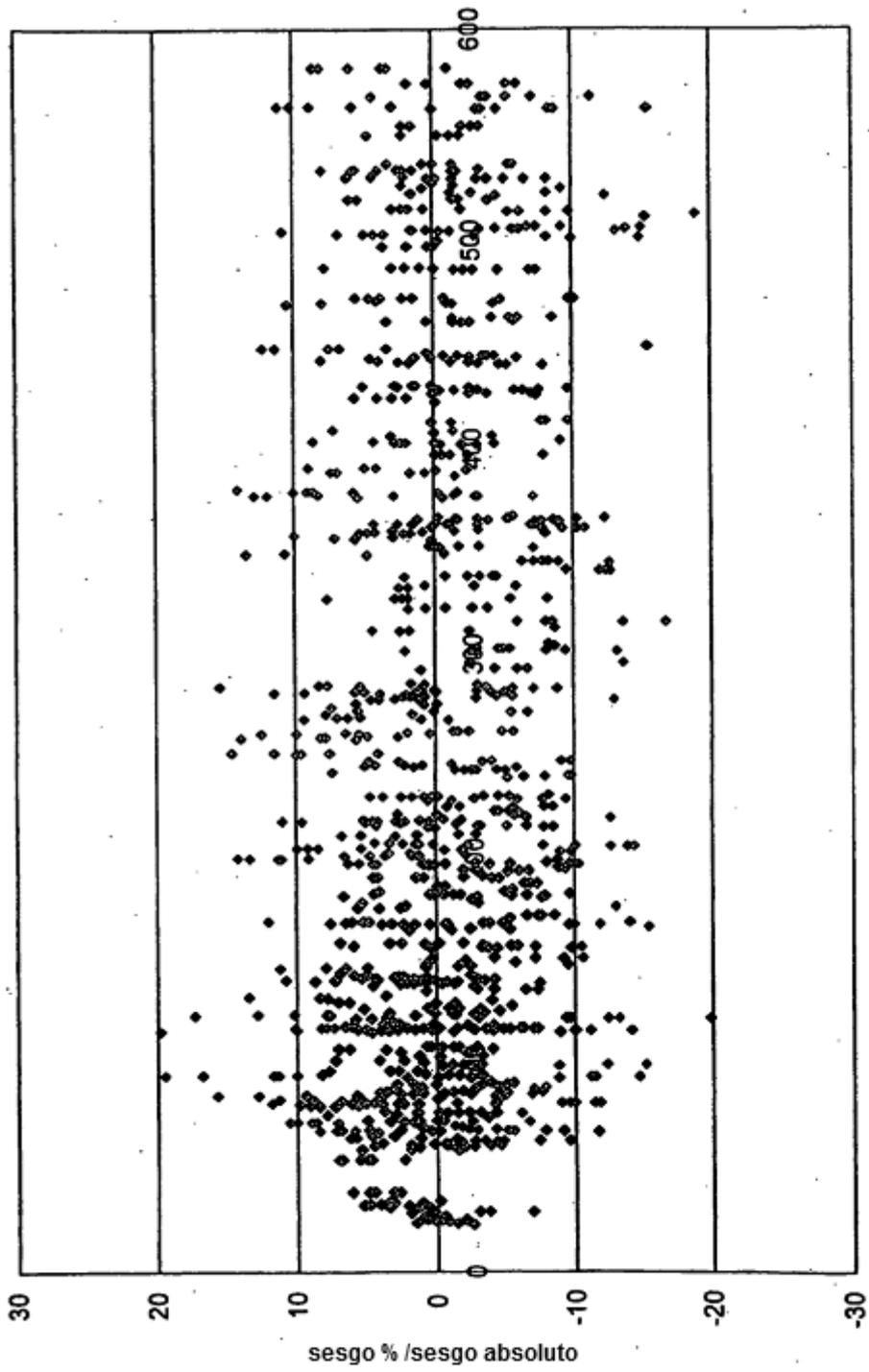


FIG. 7



YSI glucosa, mg/dL

FIG. 8