



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07.40108

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO Determinación de concentraciones en
una capa de deposición.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL G01N 27/30 C12Q

71. SOLICITANTE Bayer Healthcare LLC.

DOMICILIO NY, USA.

74. APODERADO Dolra María Rodríguez D'Almeida

22. BOGOTÁ, D. C., Abril 23/07.

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) **SOLICITUD DE:**

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2)
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAYER HEALTHCARE LLC**

Dirección: **555 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591 USA**

Nacionalidad o domicilio:
Tarrytown, NY, USA

Lugar de constitución: **NY, USA**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO Cual

Teléfono: **Fax:**
E. Mail:

3)
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN**

Dirección: **Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6
Bogotá D.C.**

Teléfono: **6181088 Fax: 6350824**
E. Mail: **info@clarkemodet.com.co**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: **41.654.882**
TP: **20824 CSJ**

4)
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **WU, Huan-Ping**

Dirección: **14374 Shoreline Dr., Granger, IN 46530, Estados Unidos**

Nacionalidad o Domicilio: **Estadounidense**

5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. **pct/us2005/036806** Fecha: **Oct. 12, 2005**

Publicación Internacional No. **WO2006/042304 A1** Fecha: **Abril 20, 2006**

6) **Título (54) DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES EN UNA CAPA DE BARRERA DE DIFUSIÓN**

7) **Clasificación Internacional: G01N 27/30 C12Q 1/00 G01N33/487**

8) **PRIORIDAD**

33) **País de Origen**

(32) **Fecha**

(31) **Número de Solicitud**

SI ☒ NO ☐

Estados Unidos

Octubre 12, 2004

60/617,889

Estados Unidos

Febrero 22, 2005

60/655,180

9) **Comprobante de pago N°**

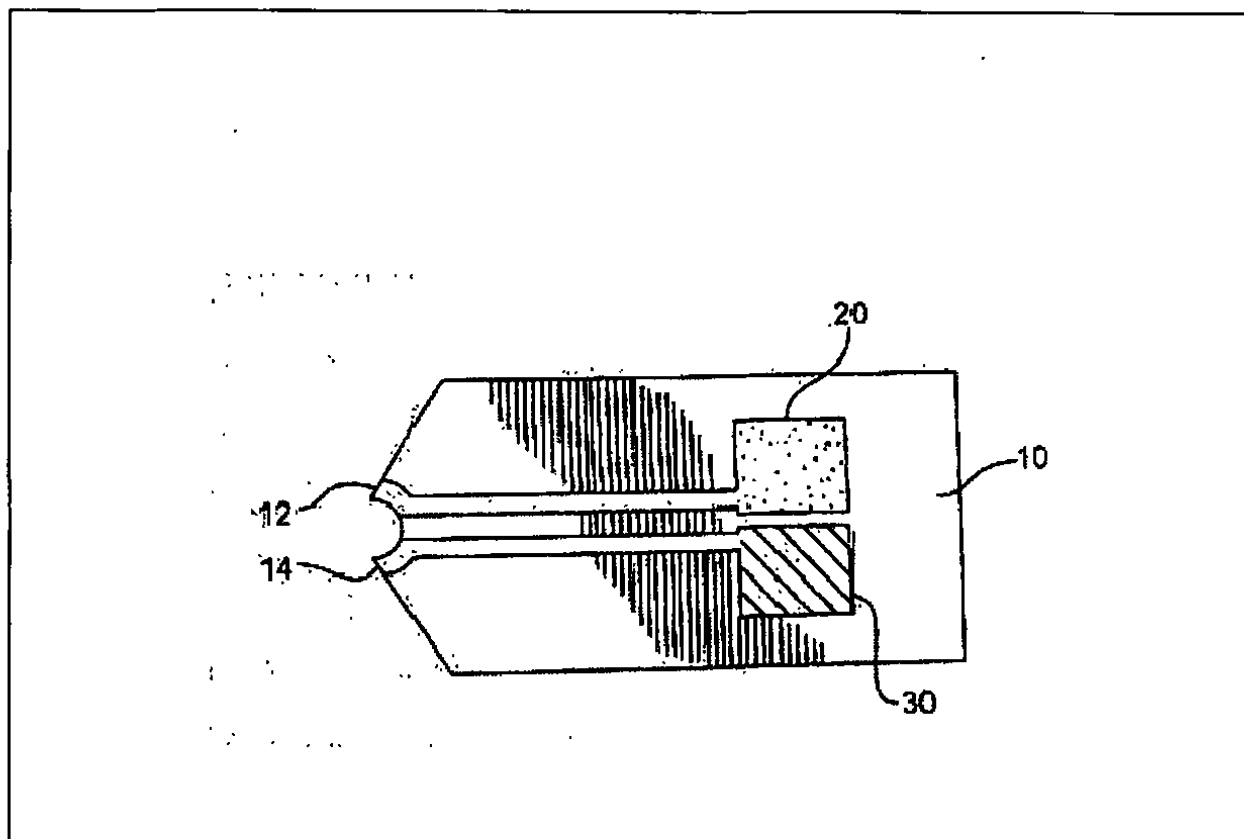
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 1. Reporte internacional de búsqueda
 2. Reporte cambio de dirección del solicitante

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

P.924 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 27,283
FECHA : ABRIL 3 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-040108- -00000-0000
Fecha: 2007-04-23 15:43:34 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE(IYII) Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63066570	03/04/2007	23,540,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



PCT

(43) International Publication Date
20 April 2006 (20.04.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/042304 A1

(51) International Patent Classification:
G01N 27/30 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/036806

(22) International Filing Date: 12 October 2005 (12.10.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/617,889 12 October 2004 (12.10.2004) US
60/655,180 22 February 2005 (22.02.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
HEALTHCARE LLC [US/US]; 1884 Miles Avenue,
Elkhart, IN 46514 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): WU, Huan-Ping
[US/US]; 14374 Shoreline Dr., Granger, IN 46530 (US).

(74) Agent: BLANCHARD, Jonathan, M.; Evan Law Group
LLC, 566 West Adams, Suite 350, Chicago, IL 60661 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AF, AG, AI, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GM, GR, GU, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

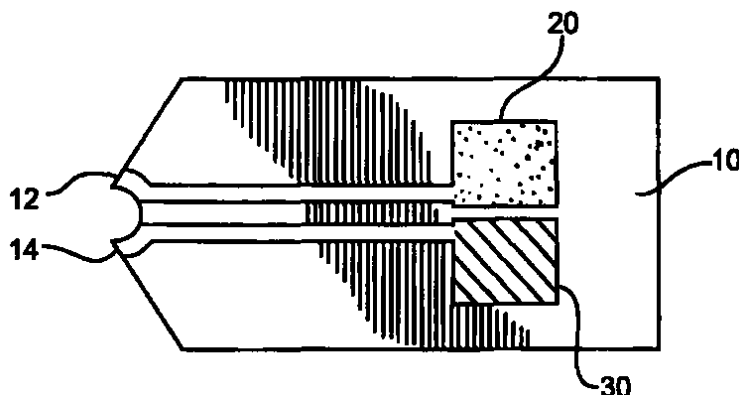
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CONCENTRATION DETERMINATION IN A DIFFUSION BARRIER LAYER



(57) Abstract: The present invention relates to improved electrochemical biosensor strips and methods for determining the con-
centration of an analyte in a sample. By selectively measuring a measurable species residing in a diffusion barrier layer, to the
substantial exclusion of the measurable species residing exterior to the diffusion barrier layer, measurement errors introduced by
sample constituents, such as red blood cells, and manufacturing variances may be reduced.

WO 2006/042304 A1

5

CONCENTRATION DETERMINATION IN A DIFFUSION BARRIER LAYER

REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/617,889 entitled "Concentration Determination in A Diffusion Barrier Layer" filed October 12, 2004 and U.S. Provisional Application No. 60/655,180 entitled "Concentration Determination in A Diffusion Barrier Layer" filed February 22, 2005, which are incorporated by reference in their entirety.

BACKGROUND

[002] In monitoring medical conditions and the response of patients to treatment efforts, it is desirable to use analytical methods that are fast, accurate, and convenient for the patient. Electrochemical methods have been useful for quantifying certain analytes in body fluids, particularly in blood samples. Typically, these biological analytes, such as glucose, undergo redox reactions when in contact with specific enzymes. The electric current generated by such redox reactions may be correlated with the concentration of the biological analyte in the sample.

[003] Tiny electrochemical cells have been developed that provide patients the freedom to monitor blood analyte concentrations without the need of a healthcare provider or clinical technician. Typical patient-operated electrochemical systems utilize a disposable sensor strip with a dedicated measurement device containing the necessary circuitry and output systems. For analysis, the measurement device is connected to the disposable

electrochemical sensor strip containing the electrodes and reagents to measure the analyte concentration in a sample that is applied to the strip.

[004] The most common of these miniature electrochemical systems are glucose sensors that provide measurements of blood glucose levels. Ideally, a miniature sensor for glucose should provide accurate readings of blood glucose levels by analyzing a single drop of whole blood, typically from 1-15 microliters (μ L).

[005] In a typical analytical electrochemical cell, the oxidation or reduction half-cell reaction involving the analyte produces or consumes electrons, respectively. This electron flow can be measured, provided the electrons can interact with a working electrode that is in contact with the sample to be analyzed. The electrical circuit is completed through a counter electrode that is also in contact with the sample. A chemical reaction also occurs at the counter electrode, and this reaction is of the opposite type (oxidation or reduction) relative to the type of reaction at the working electrode. Thus, if oxidation occurs at the working electrode, reduction occurs at the counter electrode. See, for example, *Fundamentals Of Analytical Chemistry, 4th Edition*, D.A. Skoog and D.M. West; Philadelphia: Saunders College Publishing (1982), pp 304-341.

[006] Some conventional miniaturized electrochemical systems include a true reference electrode. In these systems, the true reference electrode may be a third electrode that provides a non-variant reference potential to the system, in addition to the working and counter electrodes. While multiple reference electrode materials are known, a mixture of silver (Ag) and silver chloride (AgCl) is typical. The materials that provide the non-variant reference potential, such as a mixture of silver and silver chloride, are separated, by their insolubility or other means, from the reaction components of the analysis solution.

[007] In other miniature electrochemical systems, a combination counter/reference electrode is employed. These electrochemical sensor strips are typically two electrode systems having a working electrode and a counter/reference electrode. The combined counter/reference electrode is possible when a true reference electrode also is used as the counter electrode.

[008] Because they are true reference electrodes, counter/reference electrodes are typically mixtures of silver (Ag) and silver chloride (AgCl), which exhibit stable electrochemical properties due to the insolubility of the mixture in the aqueous environment of the analysis solution. Since the ratio of Ag to AgCl does not significantly change during transient use, the potential of the electrode is not significantly changed.

[009] An electrochemical sensor strip is typically made by coating a reagent layer onto the conductor surface of an analysis strip. To facilitate manufacturing, the reagent layer may be coated as a single layer onto all of the electrodes.

[0010] The reagent layer may include an enzyme for facilitating the oxidation or reduction reaction of the analyte, as well as any mediators or other substances that assist in the transfer of electrons between the analyte reaction and the conductor surface. The reagent layer also may include a binder that holds the enzyme and mediator together, thus allowing them to be coated onto the electrodes.

[0011] Whole blood (WB) samples contain red blood cells (RBC) and plasma. The plasma is mostly water, but contains some proteins and glucose. Hematocrit is the volume of the RBC constituent in relation to the total volume of the WB sample and is often expressed as a percentage. Whole

8

blood samples generally have hematocrit percentages ranging from 20 to 60%, with ~40% being the average.

[0012] One of the drawbacks of conventional electrochemical sensor strips utilized to measure the glucose concentration in WB is referred to as the "hematocrit effect." The hematocrit effect is caused by RBC blocking the diffusion of the mediator or other measurable species to the conductor surface for measurement. Because the measurement is taken for the same time period each time a sample is tested, blood samples having varying concentrations of RBC can cause inaccuracies in the measurement. This is true because the sensor cannot distinguish between a lower measurable species concentration and a higher measurable species concentration where the RBC interfere with diffusion of the measurable species to the conductor surface. Thus, variances in the concentration of RBC in the WB sample result in inaccuracies (the hematocrit effect) in the glucose reading.

[0013] If WB samples containing identical glucose levels, but having hematocrits of 20, 40, and 60%, are tested, three different glucose readings will be reported by a conventional system that is based on one set of calibration constants (slope and intercept, for instance). Even though the glucose concentrations are the same, the system will report that the 20% hematocrit sample contains more glucose than the 60% hematocrit sample due to the RBC interfering with diffusion of the measurable species to the conductor surface.

[0014] Conventional systems are generally configured to report glucose concentrations assuming a 40% hematocrit content for the WB sample, regardless of the actual hematocrit content in the blood sample. For these systems, any glucose measurement performed on a blood sample containing less or more than 40% hematocrit will include some inaccuracy attributable to the hematocrit effect.

[0015] Conventional methods of reducing the hematocrit effect for amperometric sensors include the use of filters, as disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,708,247 and 5,951,836; reversing the potential of the read pulse, as disclosed in WO 01/57510; and by methods that maximize the inherent resistance of the sample, as disclosed in U.S. Pat. No. 5,628,890. While each of these methods balance various advantages and disadvantages, none are ideal.

[0016] As can be seen from the above description, there is an ongoing need for improved devices and methods for determining the concentration of biological analytes, including glucose. The devices and methods of the present invention may decrease the error introduced by the hematocrit and other effects in WB samples.

SUMMARY

[0017] In one aspect, an electrochemical sensor strip is provided that includes a base and first and second electrodes on the base. The first electrode includes at least one first layer on a first conductor, where the first layer includes an oxidoreductase enzyme and a binder. The thickness of the first layer is selected so that when a read pulse is applied to the first and second electrodes during use, measurable species are substantially detected within the first layer and are not substantially detected external to the first layer.

[0018] In another aspect, a method of increasing the accuracy of quantitative analyte determination is provided. The method includes providing an electrochemical sensor strip having at least one first layer including an oxidoreductase enzyme, a mediator, and a binder. An analyte containing sample is then introduced to the electrochemical sensor strip and an electric potential is applied in the form of a read pulse. The duration of

the read pulse substantially detects the ionized form of the mediator within the first layer while substantially excluding from detection the ionized form of the mediator external to the first layer.

[0019] In one embodiment, an electrochemical sensor strip is provided, comprising: a base; a first electrode on the base, where the first electrode comprises at least one first layer on a first conductor, the first layer including a reagent layer; and a second electrode on the base, the thickness of the first layer selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during use substantially detects a measurable species within the first layer and substantially does not detect the measurable species external to the first layer.

[0020] In another embodiment, the electrochemical sensor strip further comprises a second layer between the first conductor and the first layer, the thickness of the second layer selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during use substantially detects the measurable species within the second layer and substantially does not detect the measurable species external to the second layer, including the measurable species within the first layer, where the thickness of the first layer is not selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during use substantially detects the measurable species within the first layer. The second layer may be at least 5 μm or from 8 to 25 μm thick. In another aspect, the second layer may be at least 1 μm or from 5 to 25 μm thick. The second layer may not include the oxidoreductase enzyme and/or a mediator, but may include a polymeric material.

[0021] In another embodiment, a method of increasing the accuracy of quantitative analyte determination is provided comprising: providing an electrochemical sensor strip having a base, a first conductor on the base, a second conductor on the base, and at least one first layer on at least the first

conductor, where the at least one first layer includes a reagent layer including a binder; introducing an analyte containing sample having a liquid component to the electrochemical sensor strip, where the sample provides electrical communication between the first and second conductors; applying an electric potential between the first and second conductors in the form of a read pulse, the read pulse applied for a duration that substantially detects a measurable species within the first layer and substantially does not detect the measurable species external to the first layer; measuring the read pulse to provide a quantitative value of the analyte concentration in the sample with increased accuracy in relation to an electrochemical sensor strip that substantially detects the measurable species external to the first layer. An initial pulse and a time delay may be applied before the read pulse.

[0022] In another embodiment, an electrochemical sensor strip is provided, comprising: a base; a first electrode on the base, where the first electrode comprises at least one first layer on a first conductor, the first layer including a mediator, a binder, and at least one of glucose oxidase, glucose dehydrogenase, and mixtures thereof; and a second electrode on the base comprising a soluble redox species, the soluble redox species including at least one of an organotransition metal complex, a transition metal coordination metal complex, and mixtures thereof, the thickness of the first layer selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during use substantially detects a measurable species within the first layer and substantially does not detect the measurable species external to the first layer. The second electrode of the electrochemical sensor strip may comprise a second redox species on a second conductor, where the soluble redox species is a first redox species of a redox pair including the first species and the second species, and where the molar ratio of the first redox species to the second redox species is greater than about 1.2:1.

[0023] In another embodiment, an electrochemical sensor strip is provided, comprising: a base; a lid contacting the base to define a gap; a first electrode on the base including a first conductor; a second layer on the first conductor, where a reagent layer does not reside between the first conductor and the second layer; a second electrode on the base; and a reagent layer in the gap, the thickness of the second layer selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during use substantially detects a measurable species within the second layer and substantially does not detect the measurable species external to the first layer.

[0024] In order to provide a clear and consistent understanding of the specification and claims, the following definitions are provided.

[0025] The term "system" is defined as an electrochemical sensor strip in electrical communication through its conductors with an electronic measurement device, which allows for the quantification of an analyte in a sample.

[0026] The term "measurement device" is defined as an electronic device that can apply an electric potential to the conductors of an electrochemical sensor strip and measure the subsequent electrical currents. The measurement device also may include the processing capability to determine the presence and/or concentration of one or more analytes in response to the measured electric potential.

[0027] The term "sample" is defined as a composition containing an unknown amount of the analyte of interest. Typically, a sample for electrochemical analysis is in liquid form, and preferably the sample is an aqueous mixture. A sample may be a biological sample, such as blood, urine or saliva. A sample may be a derivative of a biological sample, such as an extract, a dilution, a filtrate, or a reconstituted precipitate.

[0028] The term "analyte" is defined as one or more substances present in the sample. The measurement process determines the presence, amount, quantity, or concentration of the analyte present in the sample. An analyte may interact with an enzyme or other species that is present during the analysis.

[0029] The term "accuracy" is defined as how close the amount of analyte measured by a sensor strip corresponds to the true amount of analyte in the sample.

[0030] The term "precision" is defined as how close multiple analyte measurements are for the same sample.

[0031] The term "conductor" is defined as an electrically conductive substance that remains stationary during an electrochemical analysis. Examples of conductor materials include solid metals, metal pastes, conductive carbon, conductive carbon pastes, and conductive polymers.

[0032] The term "non-ionizing material" is defined as a material that does not ionize during the electrochemical analysis of an analyte. Examples of non-ionizing materials include carbon, gold, platinum and palladium.

[0033] The term "measurable species" is defined as any electrochemically active species that may be oxidized or reduced under an appropriate potential at the electrode surface of an electrochemical sensor strip. Examples of measurable species include an analyte, a substrate, or a mediator.

[0034] The term "steady-state" is defined as when the rate of diffusion of the measurable species into the DBL is substantially constant.

[0035] The term "oxidoreductase" is defined as any enzyme that facilitates the oxidation or reduction of a measurable species.

An oxidoreductase is a reagent. The term oxidoreductase includes "oxidases," which facilitate oxidation reactions where molecular oxygen is the electron acceptor; "reductases," which facilitate reduction reactions where the analyte is reduced and molecular oxygen is not the analyte; and "dehydrogenases," which facilitate oxidation reactions in which molecular oxygen is not the electron acceptor. See, for example, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition*, A.D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997) pp. 161, 476, 477, and 560.

[0036] The term "mediator" is defined as a substance that can be oxidized or reduced and that can transfer one or more electrons between a first substance and a second substance. A mediator is a reagent in an electrochemical analysis and is not the analyte of interest, but provides for the indirect measurement of the analyte. In a simplistic system, the mediator undergoes a redox reaction with the oxidoreductase after the oxidoreductase has been reduced or oxidized through its contact with an appropriate analyte or substrate. This oxidized or reduced mediator then undergoes the opposite reaction at the working electrode and is regenerated to its original oxidation number.

[0037] The term "electro-active organic molecule" is defined as an organic molecule that does not contain a metal and that is capable of undergoing an oxidation or reduction reaction. Electro-active organic molecules can behave as redox species and as mediators. Examples of electro-active organic molecules include coenzyme pyrroloquinoline quinone (PQQ), benzoquinones and naphthoquinones, N-oxides, nitroso compounds, hydroxylamines, oxines, flavins, phenazines, phenothiazines, indophenols, and indamines.

[0038] The term "binder" is defined as a material that is chemically compatible with the reagents utilized in the reagent layer of the working

electrode and that provides physical support to the reagents, while containing the reagents on the electrode conductor.

[0039] The term "average initial thickness" refers to the average height of a layer in its dry state prior to introduction of a liquid sample. The term average is used because the top surface of the layer is uneven, having peaks and valleys.

[0040] The term "redox reaction" is defined as a chemical reaction between two species involving the transfer of at least one electron from a first species to a second species. Thus, a redox reaction includes an oxidation and a reduction. The oxidation portion of the reaction involves the loss of at least one electron by the first species, and the reduction portion involves the addition of at least one electron to the second species. The ionic charge of a species that is oxidized is made more positive by an amount equal to the number of electrons transferred. Likewise, the ionic charge of a species that is reduced is made less positive by an amount equal to the number of electrons transferred.

[0041] The term "oxidation number" is defined as the formal ionic charge of a chemical species, such as an atom. A higher oxidation number, such as (III), is more positive, and a lower oxidation number, such as (II), is less positive. A neutral species has an ionic charge of zero (0). The oxidation of a species results in an increase in the oxidation number of that species, and reduction of a species results in a decrease in the oxidation number of that species.

[0042] The term "redox pair" is defined as two conjugate species of a chemical substance having different oxidation numbers. Reduction of the species having the higher oxidation number produces the species having the lower oxidation number. Alternatively, oxidation of the species having the

16

lower oxidation number produces the species having the higher oxidation number.

[0043] The term "oxidizable species" is defined as the species of a redox pair having the lower oxidation number, and which is thus capable of being oxidized into the species having the higher oxidation number.

Likewise, the term "reducible species" is defined as the species of a redox pair having the higher oxidation number, and which is thus capable of being reduced into the species having the lower oxidation number.

[0044] The term "soluble redox species" is defined as a substance that is capable of undergoing oxidation or reduction and that is soluble in water (pH 7, 25° C) at a level of at least 1.0 grams per Liter. Soluble redox species include electro-active organic molecules, organotransition metal complexes, and transition metal coordination complexes. The term "soluble redox species" excludes elemental metals and lone metal ions, especially those that are insoluble or sparingly soluble in water.

[0045] The term "organotransition metal complex," also referred to as "OTM complex," is defined as a complex where a transition metal is bonded to at least one carbon atom through a sigma bond (formal charge of -1 on the carbon atom sigma bonded to the transition metal) or a pi bond (formal charge of 0 on the carbon atoms pi bonded to the transition metal). For example, ferrocene is an OTM complex with two cyclopentadienyl (Cp) rings, each bonded through its five carbon atoms to an iron center by two pi bonds and one sigma bond. Another example of an OTM complex is ferricyanide (III) and its reduced ferrocyanide (II) counterpart, where six cyano ligands (formal charge of -1 on each of the 6 ligands) are sigma bonded to an iron center through the carbon atoms of the cyano groups.

[0046] The term "coordination complex" is defined as a complex having well-defined coordination geometry, such as octahedral or square planar geometry. Unlike OTM complexes, which are defined by their bonding, coordination complexes are defined by their geometry. Thus, coordination complexes may be OTM complexes (such as the previously mentioned ferricyanide), or complexes where non-metal atoms other than carbon, such as heteroatoms including nitrogen, sulfur, oxygen, and phosphorous, are datively bonded to the transition metal center. For example, ruthenium hexaamine is a coordination complex having a well-defined octahedral geometry where six NH_3 ligands (formal charge of 0 on each of the 6 ligands) are datively bonded to the ruthenium center. A more complete discussion of organotransition metal complexes, coordination complexes, and transition metal bonding may be found in Collman et al., *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry* (1987) and Miessler & Tarr, *Inorganic Chemistry* (1991).

[0047] The term "on" is defined as "above" and is relative to the orientation being described. For example, if a first element is deposited over at least a portion of a second element, the first element is said to be "deposited on" the second. In another example, if a first element is present above at least a portion of a second element, the first element is said to be "on" the second. The use of the term "on" does not exclude the presence of substances between the upper and lower elements being described. For example, a first element may have a coating over its top surface, yet a second element over at least a portion of the first element and its top coating can be described as "on" the first element. Thus, the use of the term "on" may or may not mean that the two elements being related are in physical contact with each other.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0048] The invention can be better understood with reference to the following drawings and description. The components in the figures are not necessarily to scale, emphasis instead being placed upon illustrating the principles of the invention. Moreover, in the figures, like references numerals generally designate corresponding parts throughout the different views.

[0049] FIG. 1 is a top view diagram of a sensor base containing a working electrode and a counter electrode.

[0050] FIG. 2 is an end view diagram of the sensor base of FIG. 1.

[0051] FIG. 3 is a top view diagram of a sensor base and electrodes under a dielectric layer.

[0052] FIGs. 4-6 are top views of three electrode sensor strips.

[0053] FIG. 7 is an end view diagram of the sensor base of FIG. 5 depicting the third electrode.

[0054] FIG. 8 is a perspective representation of a completely assembled sensor strip.

[0055] FIGs. 9A and 9B depict a working electrode having a conductor surface and a DBL during the application of long and short read pulses.

[0056] FIGs. 10A and 10B are graphs illustrating the improvement in measurement accuracy when a DBL is combined with a short read pulse in accord with the present invention.

[0057] FIGs. 11A and 11B are graphs establishing the improvement in accuracy arising from a reduction in the duration of the read pulse when a DBL is utilized.

[0058] FIG. 12 is a table comparing the bias results for 1 and 10 second read pulses from multiple analyses performed with multiple types of sensor strips having a diffusion barrier layer.

[0059] FIGs. 13A-13C are graphs illustrating the ability of a sensor strip having a DBL in accordance with the present invention to accurately measure the true glucose concentration of a sample utilizing a short read pulse.

[0060] FIGs. 14A-14F are graphs illustrating the decay profiles for multiple glucose concentrations when different thicknesses of a combination DBL/reagent layer were utilized with sequential 1 sec read pulses.

[0061] FIG. 14G illustrates the decay profiles for multiple glucose concentrations for a 1 to 2 μm combined DBL/reagent layer with an initial 1 second pulse followed by sequential 0.25 second read pulses.

[0062] FIG. 15 compares the precision between sensor strips having a DBL and gap volumes of 1, 3, 5, and 10 μL when read pulses of 1, 5, 10, and 15 seconds were applied.

DETAILED DESCRIPTION

[0063] Tiny electrochemical cells provide patients with the benefit of nearly instantaneous measurement of their glucose levels. One of the main reasons for errors in these measurements is the hematocrit effect. The hematocrit effect arises when red blood cells randomly affect the diffusion rate of measurable species to the conductor surface of the working electrode.

[0064] By measuring a measurable species residing in a diffusion barrier layer (DBL), to the substantial exclusion of the measurable species residing exterior to the DBL, measurement errors introduced by the hematocrit effect and manufacturing variances may be reduced. Substantial exclusion of the measurable species external to the DBL may be achieved by

selecting the thickness of the DBL on the basis of the read pulse duration or by selecting the duration of the read pulse on the basis of the thickness of the DBL.

[0065] FIG. 1 is a top view diagram of a sensor base 10 having conductors 12 and 14 that contains a working electrode 20 and a counter electrode 30. FIG. 2 is an end view diagram of the sensor base 10, depicting the working electrode 20 and the counter electrode 30. The working electrode 20 may include a first main conductor 22, while the counter electrode 30 may include a second main conductor 32. Optionally, surface conductors 24 and 34 may reside on the main conductors 22 and 32, respectively. A diffusion barrier layer (DBL) 28 also may reside on the main conductor 22 of the working electrode 20.

[0066] In one aspect, the main conductors 22 and 32 may include metal foil that is contiguous with the surface conductors 24 and 34 that include one or more layers of conductive carbon powder. The working electrode 20 may include a first reagent layer 26 residing on the first main conductor 22, while the counter electrode 30 may include a second reagent layer 36 residing on the second main conductor 32. In another aspect, the counter electrode 30 may be a counter/reference electrode or a counter electrode coated with a soluble redox species having a known oxidation or reduction potential. The sensor base 10 may have other configurations, including those with fewer or additional components as is known in the art. For additional sensor designs, see, for example, U.S. Pat. Nos. 5,120,420 and 5,798,031, both of which are incorporated by reference.

[0067] The sensor base 10 is preferably an electrical insulator that may isolate the electrochemical system from its surroundings. In use, the working electrode 20 and the counter electrode 30 are in electrical communication with a measurement device (not shown) through the conductors 12 and 14,

respectively. The measurement device may apply an electrical potential between the working electrode 20 and the counter electrode 30. The measurement device then may quantify the electrical current flowing between the working electrode 20, a sample (not shown), and the counter electrode 30. The sample may establish electrical communication between the electrodes 20, 30.

[0068] The main conductors 22 and 32 and the optional surface conductors 24 and 34 of electrodes 20 and 30 may contain any electrically conductive substance, including metals, conductive polymers, and conductive carbon. Examples of electrically conductive substances include a thin layer of a metal, such as gold, silver, platinum, palladium, copper, or tungsten, as well as a thin layer of conductive carbon powder. Preferably, conductors that are in contact with the sample during the use of the sensor are made of inert materials, such that the conductor does not undergo a net oxidation or a net reduction during the analysis. More preferably, electrodes that are in contact with the sample during the use of the sensor are made of non-ionizing materials, such as carbon, gold, platinum, and palladium.

[0069] Metals may be deposited on the base 10 by deposition of a metal foil, by chemical vapor deposition, or by deposition of a slurry of the metal. Conductive carbon may be deposited on the base 10, for example, by pyrolysis of a carbon-containing material or by deposition of a slurry of carbon powder. The slurry may contain more than one type of electrically conductive substance. For example, the slurry may contain both palladium and carbon powder. In the case of slurry deposition, the fluid mixture may be applied as an ink to the base material, as described in U.S. Pat. No. 5,798,031.

[0070] When the surface conductors 24 and 34 are deposited on the main conductors 22 and 32, it is preferred that the substance from which the

surface conductors are made is a non-ionizing conductive material. When the main conductors 22 and 32 are utilized without the distinct surface conductors 24 and 34, it is preferred that the conductive material from which the main conductors are made is non-ionizing. More preferably, the portion of the counter electrode 30 in contact with the second reagent layer 36 (either the main conductor 32 or the surface conductor 34) is a non-ionizing material.

[0071] A DBL may be integral to the reagent layer 26 or it may be a distinct layer 28 as depicted in FIG. 2. Thus, the DBL may be formed as a combination reagent/diffusion barrier layer on the conductor surface, as a distinct layer on the conductor surface, as a distinct layer on the conductor surface on which the reagent layer resides, or as a distinct layer on the reagent layer.

[0072] The DBL provides a porous space having an internal volume where a measurable species may reside. The pores of the DBL are selected so that the measurable species may diffuse into the DBL, while physically larger sample constituents, such as RBC, are substantially excluded. Although conventional sensor strips have used various materials to filter RBC from the working electrode, the DBL of the present invention additionally provides an internal porous space to contain and isolate a portion of the measurable species from the sample volume.

[0073] By controlling the length of the measurement reaction at the conductor surface, the sensor strip may measure the measurable species internal to the DBL, while substantially excluding from measurement the measurable species external to the DBL. In relation to the conductor surface, the internal volume of the DBL alters the physical parameter of the diffusion rate of the measurable species it contains in relation to the diffusion rate of the measurable species outside of the DBL.

23 24

[0074] Because the measurable species internal to the DBL diffuses at a different rate to the conductor surface than the measurable species external to the DBL, the length of the measurement reaction at the working electrode selects which measurable species is preferentially measured. While identical from a molecular standpoint, the different diffusion rates of the measurable species internal and external to the DBL allow their substantial differentiation.

[0075] Because the reagent layer 26 of the working electrode 20 may include a binder, any portion of the binder that does not solubilize into the sample prior to the application of a read pulse can function as the DBL. When the reagents are combined with the binder material to provide both support to the reagents and to provide the DBL, the binder material is preferably a polymeric material that is at least partially water soluble. In this manner, a portion of the binder material can solubilize, while the remainder of the binder material may remain on the main conductor 22 to function as the DBL.

[0076] Suitable partially water soluble polymeric materials include, but are not limited to, poly(ethylene oxide) (PEO), carboxy methyl cellulose (CMC), polyvinyl alcohol (PVA), hydroxyethylene cellulose (HEC), hydroxypropyl cellulose (HPC), methyl cellulose, ethyl cellulose, ethyl hydroxyethyl cellulose, carboxymethyl ethyl cellulose, polyvinyl pyrrolidone (PVP), polyamino acids such as polylysine, polystyrene sulfonate, gelatin, acrylic acid, methacrylic acid, starch, and maleic anhydride salts thereof, derivatives thereof, and combinations thereof. Among the above, PEO, PVA, CMC, and HEC are preferred at present, with CMC and PEO being especially preferred at present.

[0077] Materials that were conventionally used to form filters for the exclusion of RBC from the working electrode also may be used in the DBL. This may be achieved by increasing the thickness of the material or by

reducing the length of the measurement reaction at the working electrode in relation to when the material was used as filter. It also may be accomplished by forming the material in a manner that modifies its viscosity, such as through the introduction of salts like sodium or potassium chloride.

[0078] In another aspect, the DBL may be the distinct DBL 28. The distinct layer 28 may have an average initial thickness of at least 5 μm , preferably, from 8 to 25 μm , and more preferably from 8 to 15 μm . In another aspect, the distinct layer 28 may have an average initial thickness of at least 1 μm or preferably from 5 to 25 μm . When the DBL is a distinct layer, it may be made from a partially soluble polymeric material, such as the same material utilized as a binder in the reagent layer 26, but lacking the reagents. The distinct layer 28 may be any material that provides the desired pore space, but that is partially or slowly soluble in water during use of the sensor.

[0079] Although not shown in the figures, when the DBL is the distinct layer 28 the reagent layer 26 may not reside on the distinct layer 28. Instead, the reagent layer 26 may reside on any portion of the sensor strip that allows the reagent to solubilize in the sample. For example, the reagent layer 26 may reside on the sensor base 10 or on a lid 50, as discussed below with regard to FIG. 8.

[0080] In one aspect, the first and second reagent layers may include the same constituents and may reside on both the first and second main conductors 22, 32. When the reagent layers 26 and 36 for the working and counter electrodes, 20 and 30 respectively, have different compositions, the reagent layer for each electrode may be separately optimized. Thus, the first reagent layer 26 may contain ingredients that facilitate the reaction of the analyte and the communication of the results of this reaction to the first main conductor 22.

[0081] Similarly, the second reagent layer 36 may contain ingredients that facilitate the free flow of electrons between the sample being analyzed and the second main conductor 32. For example, a soluble redox species incorporated into the second reagent layer 36 may undergo an opposite redox reaction to the analyte. Even though the redox species is being consumed (i.e. converted into its counterpart species) during use, it may be present in a high enough concentration in the second reagent layer 36 to provide a relatively constant linear relationship between the measured current and the analyte concentration for the time scale of the analysis. Thus, improved performance may be obtained by separately optimizing the reagent layers 26 and 36 in comparison to sensor strips utilizing the same reagent layer for both electrodes.

[0082] A large molar ratio of the soluble redox species placed on the counter electrode 30 may increase the shelf life of the sensor strip. A small degree of spontaneous conversion of the soluble redox species into its counterpart species can occur during the time between the manufacture of the strip and its use with a sample. Since the relative concentration will remain high due to the excess soluble redox species, the sensor may produce accurate results after storage.

[0083] The first reagent layer 26 residing on the first main conductor 22 may include an oxidoreductase. The oxidoreductase may be specific for the analyte of interest. The oxidoreductase may be specific for a substrate such that the reaction of the oxidoreductase and its substrate is affected by the presence or amount of the analyte of interest. While in a formal sense a substrate is affected by the amount of the analyte, unless stated otherwise, the term analyte is intended to include an actual analyte present in the sample or its substrate in this description and the appended claims.

[0084] Examples of oxidoreductases and their specific analytes are given below in Table I.

Oxidoreductase (reagent layer)	Substrate / analyte
Glucose dehydrogenase	β -glucose
Glucose oxidase	β -glucose
Cholesterol esterase; cholesterol oxidase	Cholesterol
Lipoprotein lipase; glycerol kinase; glycerol-3-phosphate oxidase	Triglycerides
Lactate oxidase; lactate dehydrogenase; diaphorase	Lactate
Pyruvate oxidase	Pyruvate
Alcohol oxidase	Alcohol
Bilirubin oxidase	Bilirubin
Uricase	Uric acid
Glutathione reductase	NAD(P)H
Carbon monoxide oxidoreductase	Carbon monoxide

Table I

[0085] For example, an alcohol oxidase can be used in a reagent layer to provide a sensor that is sensitive to the presence of alcohol in a sample. Such a system could be useful in measuring blood alcohol concentrations. In another example, glucose dehydrogenase or glucose oxidase can be used in the reagent layer to provide a sensor that is sensitive to the presence of glucose in a sample. This system could be useful in measuring blood glucose concentrations, for example in patients known or suspected to have diabetes. If the concentrations of two different substances are linked through a known relationship, then the measurement of one of the substances through its

27 27

interaction with the oxidoreductase can provide for the calculation of the concentration of the other substance. For example, an oxidoreductase may provide a sensor that is sensitive to a particular substrate, and the measured concentration of this substrate can then be used to calculate the concentration of the analyte of interest.

[0086] The first reagent layer 26 may include a mediator. Without wishing to be bound by any theory of interpretation, it is believed that mediators may act either as a redox cofactor in the initial enzymatic reaction or as a redox collector to accept electrons from or donate electrons to the enzyme or other species after the reaction with the analyte has occurred. In the situation of a redox cofactor, the mediator is believed to be the species that balances the redox reaction of the analyte. Thus if the analyte is reduced, the mediator is oxidized. In the situation of a redox collector, another species may have been oxidized or reduced initially to balance the redox reaction of the analyte. This species may be the oxidoreductase itself, or it may be another species such as a redox cofactor.

[0087] Mediators in enzymatic electrochemical cells are described in U.S. Pat. No. 5,653,863, for example, which is incorporated herein by reference. In some cases, the mediator may function to regenerate the oxidoreductase. In one aspect, if the enzyme oxidizes an analyte, the enzyme itself is reduced. Interaction of this enzyme with a mediator can result in reduction of the mediator, together with oxidation of the enzyme to its original, unreacted state. Interaction of the mediator with the working electrode 20 at an appropriate electrical potential can result in a release of one or more electrons to the electrode together with oxidation of the mediator to its original, unreacted state.

[0088] Examples of mediators include OTM and coordination complexes, including ferrocene compounds, such as 1,1'-dimethyl ferrocene;

and including complexes described in U.S. Pat. No. 5,653,863, such as ferrocyanide and ferricyanide. Examples of mediators also include electro-active organic molecules including coenzymes such as coenzyme pyrroloquinoline quinone (PQQ); the substituted benzoquinones and naphthoquinones disclosed in U.S. Pat. No. 4,746,607, which is incorporated herein by reference; the N-oxides, nitroso compounds, hydroxylamines and oxines specifically disclosed in EP 0 354 441, which is incorporated herein by reference; the flavins, phenazines, phenothiazines, indophenols, substituted 1,4-benzoquinones and indamines disclosed in EP 0 330 517, which is incorporated herein by reference; and the phenazinium and phenoxazinium salts disclosed in U.S. Pat. No. 3,791,988, which is incorporated herein by reference. A review of electrochemical mediators of biological redox systems can be found in *Analytica Clinica Acta*. 140 (1982), pages 1-18. Examples of electro-active organic molecule mediators also include those described in U.S. Patent No. 5,520,786, which is incorporated herein by reference, including 3-phenylimino-3H-phenothiazine (PIPT), and 3-phenylimino-3H-phenoxazine (PIPO).

[0089] The second reagent layer 36 may include a soluble redox species. The soluble redox species undergoes the opposite redox reaction relative to the reaction of the analyte of the oxidoreductase, and in so doing is converted into its counterpart species of the redox pair. For example, if the analyte is reduced, the soluble redox species is oxidized; and if the analyte is oxidized, the soluble redox species is reduced. The counterpart species of the redox pair may also be present in the layer, but it is preferably present in a concentration lower than the concentration of the primary redox species. More preferably, the redox species in the reagent layer on the counter electrode is exclusively the soluble redox species that undergoes the opposite reaction relative to the reaction of the substrate of the oxidoreductase.

[0090] A soluble redox species may be an electro-active organic molecule, an organotransition metal complex, a transition metal coordination complex, or a combination thereof. Suitable electro-active organic molecules may include coenzyme pyrroloquinoline quinone (PQQ), substituted benzoquinones and naphthoquinones, N-oxides, nitroso compounds, hydroxylamines, oxines, flavins, phenazines, phenothiazines, indophenols, indamines, phenazinium salts, and phenoxazinium salts.

[0091] Suitable soluble redox species may also be OTM complexes or transition metal coordination complexes. Many transition metals occur naturally as compounds with hydrogen, oxygen, sulfur, or other transition metals, and these transition metals are generally observed in one or more oxidation states. For example iron, chromium, and cobalt are typically found in oxidation states of +2 (i.e. II) or +3 (i.e. III). Thus, iron (II) and iron (III) are two species of a redox pair. Many elemental metals or metal ions are only sparingly soluble in aqueous environments. This lack of solubility limits their utility as redox species in balancing the redox reactions in an electrochemical analysis system. The solubility of the otherwise sparingly soluble metals or metal ions may be improved through bonding or coordination with ligands.

[0092] Typically, the metal in an organotransition metal complex or a transition metal coordination complex is the moiety in the complex that is actually reduced or oxidized during use of the sensor strip. For example, the iron center in ferrocene $[\text{Fe(II)}(\text{C}_5\text{H}_6)_2]$ and in the ferrocyanide ion $[\text{Fe(II)}(\text{CN})_6]^{4-}$ is in the +2 formal oxidation state, while the ferricyanide ion $[\text{Fe(III)}(\text{CN})_6]^{3-}$ contains iron in its +3 formal oxidation state. Together, ferrocyanide and ferricyanide together form a redox pair. Depending on the type of oxidoreductase present in the reagent layer of the working electrode, either metal complex can function as the soluble redox species in the reagent

layer on the counter electrode. An example of a redox pair containing transition metal coordination complexes is the combination of two species of ruthenium hexaamine, $[\text{Ru(III)(NH}_3)_6]^{3+}$ and $[\text{Ru(II)(NH}_3)_6]^{2+}$.

[0093] The soluble redox species is capable of forming a redox pair during use of the electrochemical sensor strip. The species of this redox pair that is present in the reagent layer 36 on the counter electrode 30, referred to as the first species, is preferably present in a greater molar amount than its counterpart species (i.e. the second species) of the same redox pair. Preferably, the molar ratio of the first species to the second species is at least 1.2:1. More preferably, the molar ratio of the first species to the second species is at least 2:1. Still more preferably, the molar ratio of the first species to the second species is at least 10:1 or at least 100:1. In an aspect especially preferred at present, the second species of the redox pair is present in an amount of at most 1 part per thousand (ppt) or at most 1 part per million (ppm), prior to the use of the sensor strip in an analysis.

[0094] Preferably, the soluble redox species is solubilized in the sample and mixes with the analyte and other sample constituents. The soluble redox species will, over time, mix with the enzyme and the mediator, although this may not occur to any measurable degree over the course of the analysis. The soluble redox species is not separated from the liquid sample by a mechanical barrier, nor is it separate from the liquid sample by virtue of its existence in a separate phase that is distinct from the liquid sample.

[0095] In a preferred embodiment, a soluble redox species is chosen having a standard reduction potential of +0.24 volts or greater, versus the standard hydrogen electrode (SHE). In another preferred embodiment, a soluble redox species is chosen having a standard reduction potential of +0.35 volts or greater, versus SHE. In yet another preferred embodiment, a

redox species having a reduction potential of about +0.48 volts versus SHE (in 0.01 M HCl) is chosen.

[0096] Thus, a wide variety of combinations of oxidoreductases, mediators, and soluble redox species can be used to prepare an electrochemical analytical sensor. The use of soluble redox species having higher or lower oxidation numbers relative to their counterpart species in the redox pair is dictated by the type of reaction to be performed at the working electrode.

[0097] In one example, the analyte undergoes oxidation by interaction with an oxidase or a dehydrogenase. In this case, the more concentrated redox species on the counter electrode has the higher oxidation number. A specific example of this situation is the analysis of glucose using glucose oxidase or glucose dehydrogenase. In another example, the analyte undergoes reduction by interaction with a reductase. In this case, the more concentrated redox species on the counter electrode has the lower oxidation number. In either of these examples, the mediator may be the same substance as the more concentrated redox species on the counter electrode or the redox species of another redox pair.

[0098] FIG. 3 is a top view diagram of the sensor base 10, including the conductors 12 and 14 under a dielectric layer 40, and the electrodes 20 and 30. The dielectric layer 40 may partially cover the electrodes 20 and 30 and may be made from any suitable dielectric layer, such as an insulating polymer. The dielectric layer 40 may isolate the portions of the electrodes that are in contact with the first and second reagent layers 26 and 36 from the portions of the electrodes that are in contact with the conductors 12 and 14. The dielectric layer 40, if present, may be deposited on the sensor base 10 before, during, or after the coating of the electrodes 20 and 30 with the reagent layers 26 and 36, respectively.

[0099] The electrodes 20, 30 may be coated with the reagent layers 26, 36 by any convenient means, such as printing, liquid deposition, or ink-jet deposition. In one aspect, the reagent layer is deposited on the electrodes 20, 30 by printing. With other factors being equal, the angle of the printing blade may inversely affect the thickness of the reagent layer residing on the electrodes 20, 30. For example, when the blade is moved at an approximately 82° angle to the sensor base 10, the resulting reagent layer or layers may have a thickness of approximately 10 μm . Similarly, when a blade angle of approximately 62° to the sensor base 10 is utilized, a thicker 30 μm layer may be produced. In this aspect, lower blade angles may provide thicker reagent layers. In addition to blade angle, other factors affect the resulting thickness of the reagent layers 26, 36, including the thickness of the material making up the reagent layer.

[00100] FIGs. 4-6 are top views of three electrode sensor strips, each having the sensor base 10, the working electrode 20, the counter electrode 30, the conductors 12 and 14, a conductor 13, and a third electrode 70. The third electrode 70 may be in electrical communication with the measurement device (not shown) through the conductor 13.

[00101] The measurement device may measure an electric potential flowing between the working electrode 20, the third electrode 70, and a sample (not shown) that establishes electrical communication between the electrodes. In another aspect, the measurement device may apply and measure an electrical potential provided to the working electrode 20, the third electrode 70, and the sample. The sensor base 10 may have other configurations including those with fewer or additional components as is known in the art.

[00102] FIG. 7 is an end view diagram of the sensor base 10 of FIG. 5 depicting the optional third electrode 70. In one aspect, the optional third

electrode 70 may be a true reference electrode. In another aspect, the third electrode 70 may be coated with a third reagent layer 76 including a soluble redox species. An optional third electrode surface conductor 74 may reside on a third main conductor 72. In one aspect, the third main conductor 72 includes metal foil while the surface conductor 74 includes one or more layers of conductive carbon powder. The third reagent layer 76 and the second reagent layer 36 may include the same constituents or have different constituents depending on the intended use. In one aspect, the third reagent layer 76 is a portion of the second reagent layer 36, which is deposited on the main conductors 32 and 72.

[00103] When the surface conductor 74 is deposited on the main conductor 72, it is preferred that the substance from which the surface conductor is made is a non-ionizing conductive material. When the main conductor 72 is utilized without the distinct surface conductor layer 74, it is preferred that the conductive material from which the main conductor is made is non-ionizing. More preferably, the portion of the third electrode 70 in contact with the third reagent layer 76 (either the main conductor 72 or the surface conductor 74) is a non-ionizing material. The third reagent layer 76 may include the same constituents as the first and second reagent layers 26 (not shown) and 36. In another aspect, the third reagent layer 76 may include the same constituents as the second reagent layer 36. In yet another aspect, the third reagent layer 76 may include ingredients that are specifically tailored to improve the free flow of electrons between the sample being analyzed and the third main conductor 72.

[00104] The reagent layer 76 may contain a soluble redox species as described above with regard to FIG. 2. Preferably the reagent layer 76 of the third electrode 70 is identical in composition to the reagent layer 36 of the counter electrode 30. If the reagent layers on the third and counter

electrodes are identical, then it may be desirable to coat both electrodes with a single portion of the reagent layer composition.

[00105] The use of the third electrode 70 may be desirable for some applications. Increased accuracy in the applied voltage can provide for better accuracy in the measurement of the analyte. When using the third electrode 70, it may also be possible to reduce the size of the counter electrode 30 or to apply a smaller amount of the redox species to the counter electrode. If the third electrode 70 is positioned upstream of the counter electrode 30, as illustrated in FIG. 6, then it may be possible to detect when insufficient sample has been applied to the strip, a situation referred to as "under-fill." Under-fill detection may occur when there is sufficient sample to complete the circuit between the working electrode 20 and the third electrode 70, but not to cover the counter electrode 30. The lack of electrical current in the cell can be converted electronically into a signal to the user, instructing the user to add additional sample to the strip.

[00106] FIG. 8 is a perspective representation of an assembled sensor strip 800 including the sensor base 10, at least partially covered by a lid 50 that includes a vent 54, a concave area 52, and an input end opening 60. Preferably, the lid 50 covers, but does not contact, the reagent layers 26 and 36 (not shown), thus providing a gap 56 between the lid 50 and the electrodes.

[00107] A biological sample may be transferred to the electrodes by introducing the liquid sample to the opening 60 of the sensor strip 800. The liquid fills the gap 56 while expelling the air previously contained by the gap 56 through the vent 54. In this manner, the sample provides electrical communication between the electrodes. The gap 56 may contain a substance (not shown) that assists in retaining the liquid sample in the gap by immobilizing the sample and its contents in the area above the electrodes.

35 47

Examples of such substances include water-swellaable polymers, such as carboxymethyl cellulose and polyethylene glycol; and porous polymer matrices, such as dextran and polyacrylamide.

[00108] If a sample introduced through the opening 60 contains an analyte for the oxidoreductase, the redox reaction between the analyte and the enzyme can begin once the reagent layers and the sample are in contact. The electrons produced or consumed from the resultant redox reaction can be quantified by applying an electrical potential (i.e. voltage) between the working electrode and the counter electrode, and measuring the current. This current measurement may be correlated with the concentration of the analyte in the sample, provided the system has been calibrated with similar samples containing known amounts of the analyte.

[00109] Alternatively, the third electrode 70 (FIGs. 4-7) may be used to monitor the applied voltage. Any drift in the intended value of the electrical potential may provide feedback to the circuitry through the third electrode, so that the voltage can be adjusted appropriately. A measurement device preferably contains the necessary circuitry and microprocessors to provide useful information, such as the concentration of the analyte in the sample, the concentration of the analyte in the body of the patient, or the relevant concentration of another substance that is related to the measured analyte.

[00110] Once the sample is introduced through the opening 60, the sample begins to solubilize and react with the reagent layers 26, 36, and optionally 76. It may be beneficial to provide an "incubation period" during which the reagents convert a portion of the analyte into a measurable species prior to the application of an electrical potential. While a longer incubation period may be utilized, preferably, a voltage is initially applied to the sensor strip 800 at the same time as, or immediately after, the introduction of the

sample through the opening 60. A more in-depth treatment of incubation periods may be found in U.S. Pat. Nos. 5,620,579 and 5,653,863.

[00111] The initially applied voltage may be maintained for a set time period, such as about 10 seconds for a conventional sensor strip, and then stopped. Then no voltage may be applied for a set delay time period, such as about 10 seconds for a conventional sensor strip. After this delay time, a constant potential or a "read pulse" may be applied across the working and counter electrodes of the sensor strip to measure the concentration of the analyte. For conventional amperometric sensors, this read pulse is applied while the current is monitored for a read time of from 5 to 10 seconds. Considering the sample volume contained by the gap 56, a read pulse of from 5 to 10 seconds is relatively long.

[00112] In contrast to the conventional 5 to 10 second read pulse, when the working electrode 20 (FIG. 2) is configured with the DBL of the present invention, shorter read times are preferred. FIGs. 9A and 9B depict a working electrode 900 having a conductor surface 930 and a DBL 905 during the application of long and short read pulses. A sample (not shown) is applied to the working electrode 900 and includes RBC 920 residing on the DBL 905, external measurable species 910 residing in the sample, and internal measurable species 915 residing within the DBL 905.

[00113] As shown in FIG. 9A, when a long, 10 second read pulse is applied to the working electrode 900, both the external and internal measurable species 910 and 915 are measured at the surface of the conductor surface 930 by a change in oxidation state. During this measurement process, the external measurable species 910 diffuses through the sample region where the RBC 920 reside and through the DBL 905 to be measured at the surface 930. As previously discussed, this diffusion of the external

measurable species 910 through the RBC 920 during measurement introduces the hematocrit effect.

[00114] Furthermore, a long read pulse applied to a strip having a DBL, as depicted in FIG. 9a, performs similarly to a short read pulse applied to a strip lacking a DBL. The similarity arises because measurable species diffuse through the RBC before being measured at the conductor surface during the read pulse. In either instance, a substantial portion of the species measured during the read pulse originated in the test sample.

[00115] Unlike FIG. 9A, FIG. 9B represents the situation where a short read pulse is applied to the sensor strip 900 having the DBL 905 in accord with the present invention. Here, the internal measurable species 915 present in the DBL 905 undergoes a change in oxidation state at the surface 930. Substantially all of the measurable species 910 residing external to the DBL 905 either remains external to the DBL or does not substantially diffuse through the DBL 905 to reach the conductor surface 930 during the read pulse. Thus, the present invention substantially excludes the external measurable species 910 from measurement, instead measuring the measurable species 915 that is internal to the DBL 905.

[00116] FIGs. 10A and 10B are graphs illustrating the improvement in measurement accuracy when a DBL is combined with a short read pulse in accord with the present invention. Whole blood samples were combined with ferrocyanide in a 5:1 dilution ratio to represent an underlying glucose concentration and measured with a 1 second read pulse. Thus, the initial 20%, 40% and 60% hematocrit WB samples were diluted to 16%, 32% and 48% hematocrit (a 20% reduction of all three hematocrit values). The 20%, 40%, and 60% lines represent the current measured for the blood samples containing 16%, 32%, and 48% hematocrit, respectively.

[00117] FIG. 10A shows the inaccuracies introduced by the hematocrit and other effects from a bare conductor sensor strip lacking a DBL.

The inaccuracy is represented as the difference between the 20% and 60% hematocrit lines (the total hematocrit bias span) and represents the maximum measurement inaccuracy attributable to the hematocrit effect. Smaller bias values represent a more accurate result. Similar performance was observed when a DBL was used with a longer read pulse as discussed above with regard to FIG. 9A.

[00118] Conversely, FIG. 10B shows a marked decrease in the distance between the 20% and 60% calibration lines when a DBL in accordance with the present invention is combined with a 1 second read pulse. A distinct DBL of PEO polymer and 10% KCl (without reagents) was printed on a conductor surface as used for FIG. 10A above. Surprisingly, the total bias hematocrit span with the DBL/short read pulse was nearly two-thirds less than the total bias span without the DBL. Thus, the present invention significantly increased measurement accuracy in comparison to the conventional, bare conductor electrode.

[00119] While not wishing to be bound by any particular theory, it is presently believed that by limiting the length of the read time with respect to the thickness of the DBL, the present invention may exploit the phenomenon that the rate of diffusion of the measurable species into the pores of the DBL is varying, while the diffusion rate of the measurable species from the internal volume of the DBL to the surface of the conductor surface is constant. The varying degree of diffusion into the DBL caused by the WB matrix is believed to give rise to the hematocrit effect. Thus, measurement errors (bias) introduced by the sample constituents, including RBC, may be reduced by substantially limiting measurement to the measurable species present in the

internal volume of the DBL, which are believed to have a relatively constant diffusion rate.

[00120] FIGs. 11A and 11B are graphs establishing the improvement in accuracy arising from a reduction in the duration of the read pulse when a DBL is utilized. FIG. 11A shows that without a DBL, the bias with read pulses of 0.9, 5, 10, and 15 seconds are nearly identical. Regardless of the length of the read pulse, the total bias span values are ~40% and higher (50% on average), because the ability of the mediator to reach the surface of the conductor is affected by the sample constituents, including RBC. However, as illustrated in FIG. 11B, when a DBL is utilized, the bias for the 0.9 second read pulse is generally less than half of the bias observed for the 5 second read pulse and can be as much as 2.5 times less than the bias observed for a conventional 10 second read pulse, depending on the ferrocyanide concentration.

[00121] When combined with a DBL, read pulses of less than 5 seconds are preferred and read pulses of less than 3 seconds are more preferred. In another aspect, read pulses from 0.1 to 2.8 or from 0.5 to 2.4 seconds are preferred. In yet another aspect, read pulses from 0.05 to 2.8 or from 0.1 to 2.0 seconds are preferred. At present, read pulses from 0.8 to 2.2 or from 0.8 to 1.2 seconds are more preferred, while read pulses from 0.1 to 1.5 or from 0.125 to 0.8 seconds are especially preferred. The thickness of the DBL present during application of the read pulse may be selected so that during the pulse, the measurable species external to the DBL is substantially prevented from diffusing to the surface of the conductor.

[00122] FIG. 12 is a table comparing the bias results for 1 and 10 second read pulses from multiple analyses performed with multiple types of sensor strips having a DBL. The table shows the total bias span values for WB samples containing 50, 100, 200, and 400 mg/dL glucose. Absolute bias

40 ~~23~~

values are listed for the 50 mg/dL samples, while % bias is shown for the 100, 200, and 400 mg/dL samples. The bias values for the varying glucose concentrations were averaged for both the 10 second and the 1 second read pulses. The shorter 1 second read pulse provided a substantial reduction in the bias values when compared with the conventional 10 second read pulse, with reductions from about 21% to about 90%. For the 36 trials performed, the overall average bias reduction was about 50%. Thus, the combination of a DBL with a short read pulse in accord with the present invention significantly increased measurement accuracy.

[00123] FIGs. 13A-13C are graphs illustrating the ability of a sensor strip having a DBL to accurately measure the true glucose concentration of a sample utilizing a short read pulse. The data underlying the figures was collected by measuring the current in WB and plasma solutions containing ferrocyanide as the measurable species. Because the plasma samples lack RBC, the plasma measurements lack inaccuracies introduced by the hematocrit effect. Conversely, measurements taken in the WB samples included inaccuracies introduced by the hematocrit effect.

[00124] FIG. 13A correlates plasma and WB measurements collected with a 1 second read pulse for a bare conductor sensor strip. The slope of the resulting correlation plot is only 0.43, indicating that on average only 43% of the measurable species present in the WB samples was measured. In comparison, FIG. 13B correlates plasma and WB measurements collected with a 1 second read pulse for a sensor strip having a DBL. The slope of the resulting correlation plot is a substantially higher 0.86, indicating that about 86% of the measurable species present in the WB samples was measured. Thus, when compared with a bare conductor, a short read pulse combined with a DBL in accordance with the present invention may provide a 100%

improvement in the measured versus actual analyte concentration in WB samples.

[00125] FIG. 13C illustrates that decreased duration read pulses enhance measurement performance for sensor strips equipped with a DBL in accord with the present invention. The graph shows the correlation plots for 1, 5, and 10 second read pulse measurements taken in the WB and plasma samples previously described with respect to FIGs. 13A and 13B. The 1, 5, and 10 second pulses have correlation plot slopes of 0.86, 0.78 and 0.71, respectively. Thus, decreases in read pulse duration reduced measurement inaccuracies.

[00126] When a combination DBL/reagent layer is used, the length of the initial pulse and the delay affect the thickness of the DBL during the later applied read pulse. As previously discussed, combination DBL/reagent layers rely on a water soluble binder material that is partially solubilized into the sample prior to application of the read pulse. The reagent containing binder material remaining during the read pulse serves as the DBL.

[00127] Because solubilization of the binder material begins as soon as the sample is introduced through the opening 60 (FIG.8), the time that passes during the initial pulse and delay periods affects how much of the combined layer remains on the conductor surface during the read pulse. Thus, shorter initial pulses and delay times may be preferred to ensure that sufficient binder material remains on the conductor to serve as an effective DBL.

[00128] However, depending on the duration of the read pulse, a preferable upper limit exists for the DBL thickness because an increased DBL thickness may result in a failure of the sensor system to reach "steady-state" before application of the read pulse. Before the sensor system reaches steady-state, the concentration of the measurable species in the DBL does not

accurately represent the concentration of the measurable species in the sample. In one aspect, this discrepancy between the concentrations of the measurable species in the DBL and the sample may be attributed to the changing rehydration state of the DBL.

[00129] Thus, if read pulses are applied and recorded before the steady-state condition is reached, the concentration of the measurable species measured may not correlate with that in the sample. This lack of correlation between the measurable species concentration in the DBL and the sample may introduce inaccuracies into the measurement, thereby offsetting the accuracy improvement otherwise obtained by excluding the measurable species external to the DBL from measurement.

[00130] FIGs. 14A through 14F present the results obtained for multiple glucose concentrations when different initial thicknesses of a combination DBL/reagent layer were utilized with sequential 1 sec read pulses. The data was obtained utilizing multiple 200 mV read pulses, each of 1 second duration, separated by 0.5 second waits. Table II below lists the approximate average DBL/reagent layer thickness and the approximate time to reach steady state for each figure. The approximate beginning of the steady-state condition may be observed when the last in time data point obtained for an individual read pulse represents the greatest current value of the last in time data points acquired for any individual read pulse.

[00131] Thus, for FIG. 14F, the last in time (rightmost) ~ 1750 nA data point for the read pulse initiated at ~ 1.5 seconds establishes that steady-state was reached at about 2.5 seconds at the 674.8 mg/dL glucose concentration.

Figure	Approximate DBL/reagent layer average thickness in μm .	Approximate time to reach steady state in seconds.
14A	30	> 10
14B	23	5.5
14C	16	4
14D	14	2.5
14E	12	2.5
14F	11	2.5
14G	1 to 2	1

Table II

[00132] The data in Table II establish that for a 1 second read pulse preceded by a 0.5 second delay, the average initial thickness of a combination DBL/reagent layer is preferably less than 30 or 23 micrometers (μm) and more preferably less than 16 μm . Preferred average initial thicknesses of a combination DBL/reagent layer for use with a 0.5 to 5 second delay and a 0.5 to 1.2 second read pulse are from 5 to 15 μm or from 11 to 14 μm . More preferred average initial thicknesses of a combination DBL/reagent layer for use with a 0.5 to 5 second delay and a 0.05 to 2.8 second read pulse are from 1 to 15 μm or from 2 to 5 μm . Thus, for a 0.8 to 1.2 second read pulse, these thicknesses substantially exclude measurable species from the conductor surface during the read pulse, while allowing the sensor system to reach a steady-state.

44

[00133] While the preferred initial thickness of the reagent layer applied to the conductor is dependent on the initial pulse length, the delay time, and the duration of the read pulse, for read pulse durations of less than five seconds, reagent layer thicknesses of from 5 to 30 μm or from 11 to 20 μm are preferred. Furthermore, for read pulses of 1.5 seconds or less in duration, reagent layer thicknesses of from 1 to 10 μm or from 2 to 5 μm are preferred. The desired average initial thickness of a combination DBL/reagent layer may be selected for a specific read pulse length, such as for the 1 second read pulse of Table II, on the basis of when steady-state is reached.

[00134] In one aspect, initial pulse and delay times of less than 6 seconds are preferred. Initial pulse times of from 1 to 4 seconds and delay times of from 0.5 to 5 seconds are more preferred. In a preferred aspect, the initial pulse and delay times are selected so that at least 50% of the average initial thickness of the combined DBL/reagent layer remains on the conductor surface when the read pulse is applied. In another aspect, from 60 to 85% or from 70 to 80% of the average initial thickness of the combined layer remains on the conductor surface when the read pulse is applied.

[00135] The preferred thickness of the DBL for a specific read pulse length also may depend on the nature of the DBL. The slower the measurable species moves through the DBL during measurement, the thinner the DBL required. However, if diffusion of the measurable species through the DBL is too slow, it may be difficult to obtain the desired steady-state condition. The rate at which a measurable species diffuses through the DBL also may be altered with additives that affect the ionic strength of the test sample and/or of the pore interiors of the DBL. In one aspect, the additive may be a salt, such as sodium or potassium chloride, which is present in the deposition solution/paste at a 1 to 2 Molar concentration. Other salts and

compositions that affect the ionic strength of the test sample as known to those of ordinary skill in the art of chemistry also may be used.

[00136] Another advantage of measuring the measurable species in the DBL with a less than 3 second read pulse is the reduction of measurement imprecision from varying sample volumes present in the gap 56 of the sensor strip 800 (FIG. 8). If a read pulse continues past the time when substantially all of the measurable species present in the gap 56 has been measured, the measurement no longer represents the concentration of measurable species in the sample, but is instead measuring the amount of measurable species in the gap 56; a very different measurement. As the read pulse becomes long relative the volume of the gap 56, the current measurement will depend on the volume of the gap 56, not the underlying analyte concentration. Thus, longer read pulses can result in measurements that are highly inaccurate with regard to analyte concentration if the pulse length "overshoots" the measurable species present in the gap 56.

[00137] Hence, any variance in the volume of the gap 56 present in the electrochemical sensor strip may lead to measurement imprecision because the electronics in the measurement device apply the same potential and perform the same calculations for each test. Thus, for the same sample, a conventional sensor strip having a larger gap volume will show a higher analyte concentration than a sensor strip having a smaller gap volume if the read pulse overshoots the gap volume. By substantially limiting measurement to the measurable species present in the DBL, the present invention may reduce the imprecision introduced by sensor strips having different gap volumes. In this manner, the effect that manufacturing variability in the sensor strips would otherwise have on the measurement results may be reduced.

[00138] FIG. 15 compares the precision between sensor strips having a DBL and gap volumes of 1, 3, 5, and 10 mL when read pulses of 1, 5, 10, and 15 seconds were applied. Table A presents the data collected when a 2 second pre-pulse and a 4 second delay was followed by read pulses of 1, 5, 10, and 15 seconds. Table B presents the data collected when a 4 second pre-pulse and a 2 second delay was followed by read pulses of 1, 5, 10, and 15 seconds. Variances between slopes and intercepts of the calibration lines for each combination of gap volume and read pulse duration are expressed as %-CV. The %-CV values from tables A and B show that as the duration of the read pulse increases so does the imprecision in the measurements due to the variation in the gap volume. For both pulse sequences, the deviation between the gap volumes is least for the ~1 second read pulse, and largest for the 15 second read pulse. These results further establish the benefit of utilizing a DBL with a short pulse length in accord with the present invention.

[00139] In addition to the hematocrit effect and variances in gap volumes, when the measurable species present in the gap 56 (FIG. 8) is measured, positive errors in the analyte reading may be introduced if the liquid sample moves during the measurement. This movement of the sample can introduce fresh analyte to the region around the working electrode where a constant diffusion pattern was already in place, thus skewing the measurement. By measuring the measurable species internal to the DBL, which has a relatively constant diffusion rate, with a short read pulse, while substantially excluding from measurement the varying diffusion rate measurable species external to the DBL, the present invention may further reduce measurement errors introduced by movement of the sample.

[00140] While various embodiments of the invention have been described, it will be apparent to those of ordinary skill in the art that other embodiments and implementations are possible within the scope of the

47

invention. Accordingly, the invention is not to be restricted except in light of the attached claims and their equivalents.

CLAIMS:

1. An electrochemical sensor strip, comprising:
a base;
a first electrode on the base, where the first electrode comprises at least one first layer on a first conductor, the first layer including a reagent layer; and
a second electrode on the base,
the thickness of the first layer selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during an analyte analysis substantially detects a measurable species within the first layer and substantially does not detect the measurable species external to the first layer.
2. The electrochemical sensor strip of claim 1, where the reagent layer includes an oxidoreductase enzyme and a binder.
3. The electrochemical sensor strip of any one of the preceding claims, where the second electrode comprises the first layer on a second conductor.
4. The electrochemical sensor strip of any one of the preceding claims, where the duration of the read pulse is less than 5 seconds.
5. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 3, where the duration of the read pulse is less than 3 seconds.
6. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 3, where the duration of the read pulse is from 0.05 second to 2.8 seconds.
7. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 3, where the duration of the read pulse is from 0.1 second to 1.5 seconds.
8. The electrochemical sensor strip of any one of the preceding claims, where the average initial thickness of the first layer is at least 1 μm .
9. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 7, where the average initial thickness of the first layer is less than 30 μm .

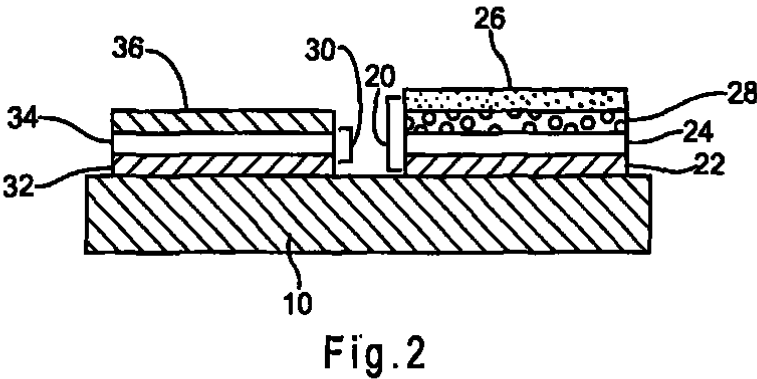
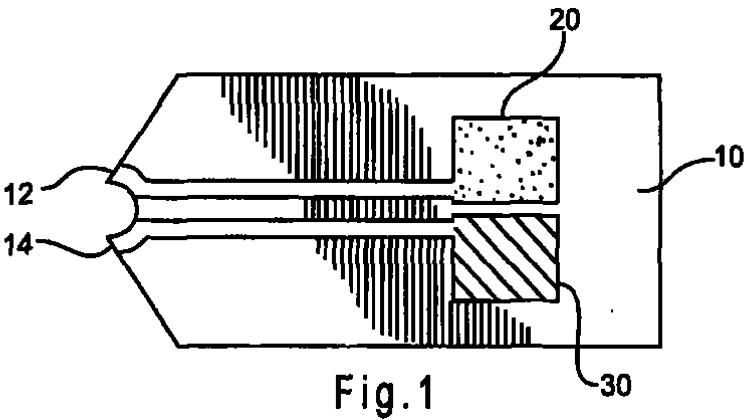
10. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 7, where the average initial thickness of the first layer is from 1 to 30 μm .
11. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 7, where the average initial thickness of the first layer is from 5 to 25 μm .
12. The electrochemical sensor strip of any one of the preceding claims, where the average initial thickness of the first layer on the first conductor is further selected so that at least 50% of the thickness remains on the conductor when the read pulse is applied.
13. The electrochemical sensor strip of any one of claims 1 through 11, where the average initial thickness of the first layer on the first conductor is further selected so that from 70 to 80% of the thickness remains on the conductor when the read pulse is applied.
14. An electrochemical sensor strip, comprising:
a base;
a first electrode on the base, where the first electrode comprises at least one first layer on a first conductor, the first layer including a reagent layer and a second layer between the first conductor and the first layer; and
a second electrode on the base, the thickness of the second layer selected so that a read pulse applied to the first and second electrodes during an analyte analysis substantially detects a measurable species within the second layer and substantially does not detect the measurable species external to the second layer.
15. The electrochemical sensor strip of claim 14, where the average initial thickness of the second layer is at least 1 μm .
16. The electrochemical sensor strip of claim 14, where the average initial thickness of the second layer is from 5 to 25 μm .

17. The electrochemical sensor strip of any one of claims 14 through 16, where the second layer does not include a substantial amount of at least one of the oxidoreductase enzyme and a mediator.
18. The electrochemical sensor strip of any one of claims 14 through 17, where the second layer includes a polymeric material.
19. The electrochemical sensor strip of claim 18, where the polymeric material includes at least one of poly(ethylene oxide), carboxy methyl cellulose, hydroxyethylene cellulose, hydroxypropyl cellulose, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, derivatives thereof, and combinations thereof.
20. The electrochemical sensor strip of claim 18, where the polymeric material is partially water soluble.
21. A method of increasing the accuracy of quantitative analyte determination comprising:
- introducing an analyte containing sample having a liquid component to an electrochemical sensor strip, the strip having a base, a first conductor on the base, a second conductor on the base, and at least one first layer on at least the first conductor, where the at least one first layer includes a reagent layer including a binder and the sample provides electrical communication between the first and second conductors;
 - applying an electric potential between the first and second conductors in the form of a read pulse, the read pulse applied for a duration that substantially detects a measurable species within the first layer and substantially does not detect the measurable species external to the first layer;
 - measuring the read pulse to provide a quantitative value of the analyte concentration in the sample with increased accuracy in relation to an electrochemical sensor strip that substantially detects the

measurable species external to the first layer.

22. The method of claim 21, where the increased accuracy results at least in part from a reduction in the inaccuracy introduced to analyte concentration determination by the liquid movement effect.
23. The method of any one of claims 21 through 22, further comprising improving the precision of the quantitative values of the analyte concentration between a plurality of electrochemical sensor strips, where the sample resides in a gap formed between the base and a lid of each sensor strip, the gap having a volume that varies between the individual electrochemical sensor strips of the plurality.
24. The method of any one of claims 21 through 23, further comprising applying an initial pulse and a time delay before the read pulse.
25. The method of claim 24, where the initial pulse is from 1 to 4 seconds.
26. The method of claim 24, where the time delay is from 2 to 4 seconds.

1/14



2/14

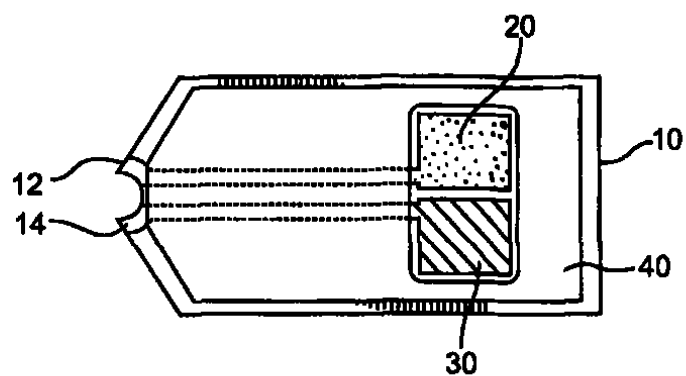


Fig. 3

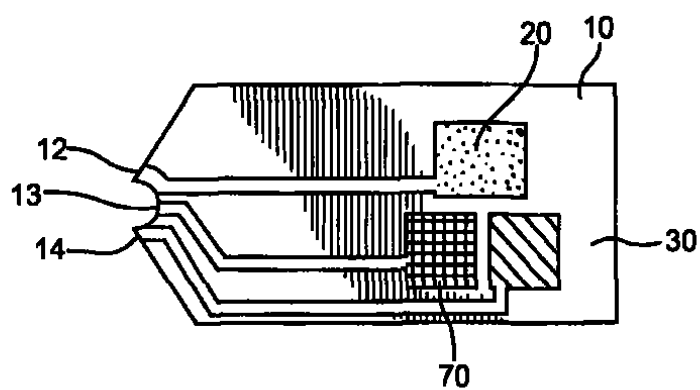


Fig. 4

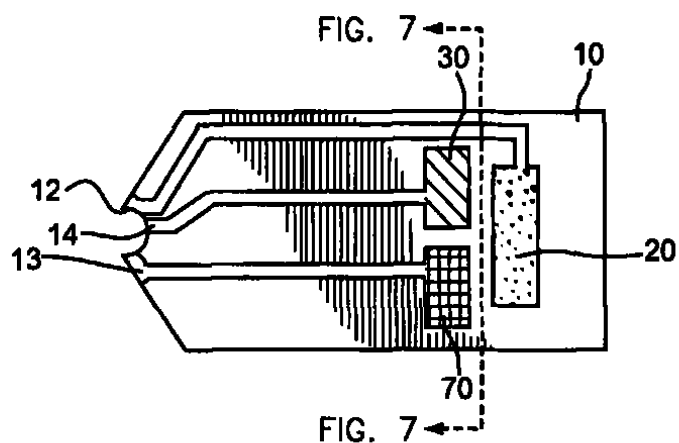


Fig. 5

54

3/14

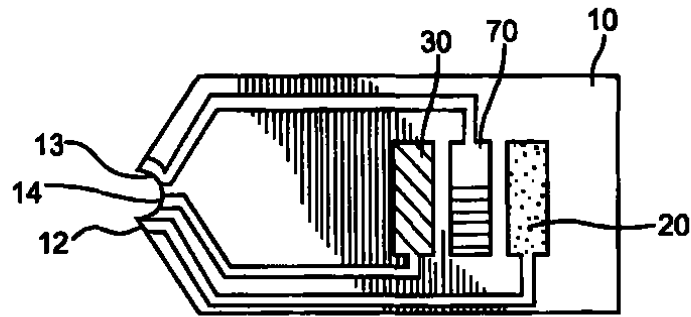


Fig. 6

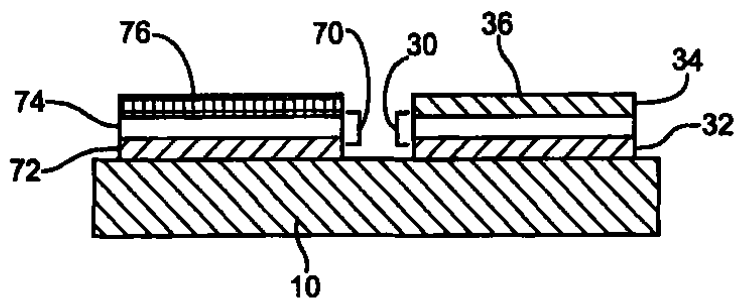


Fig. 7

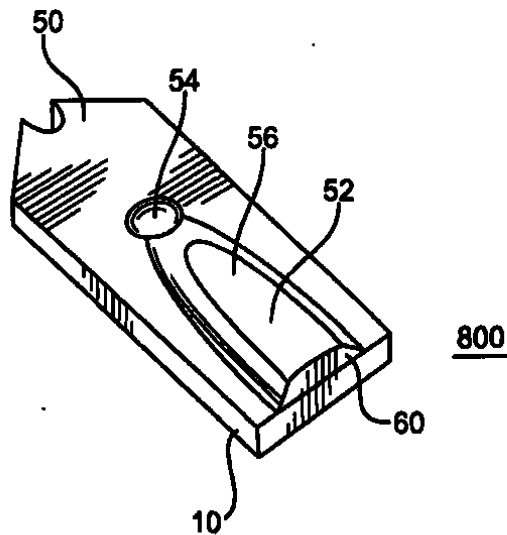


Fig. 8

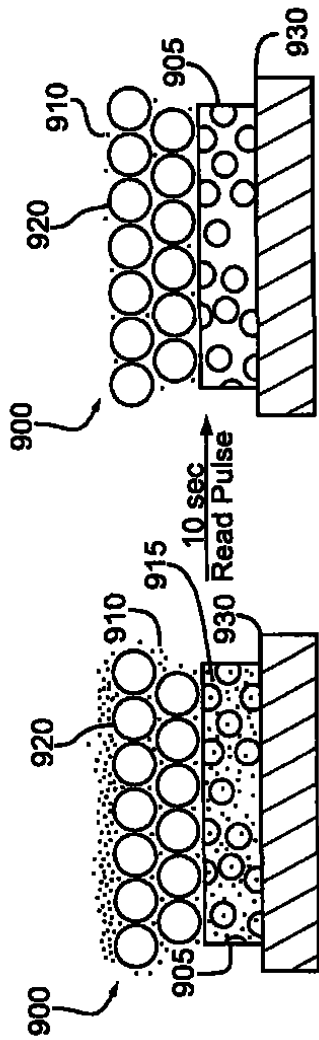


Fig. 9A

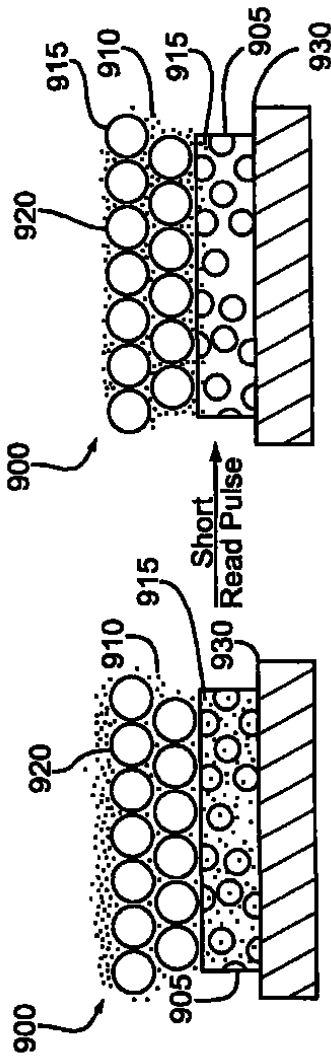


Fig. 9B

5/14

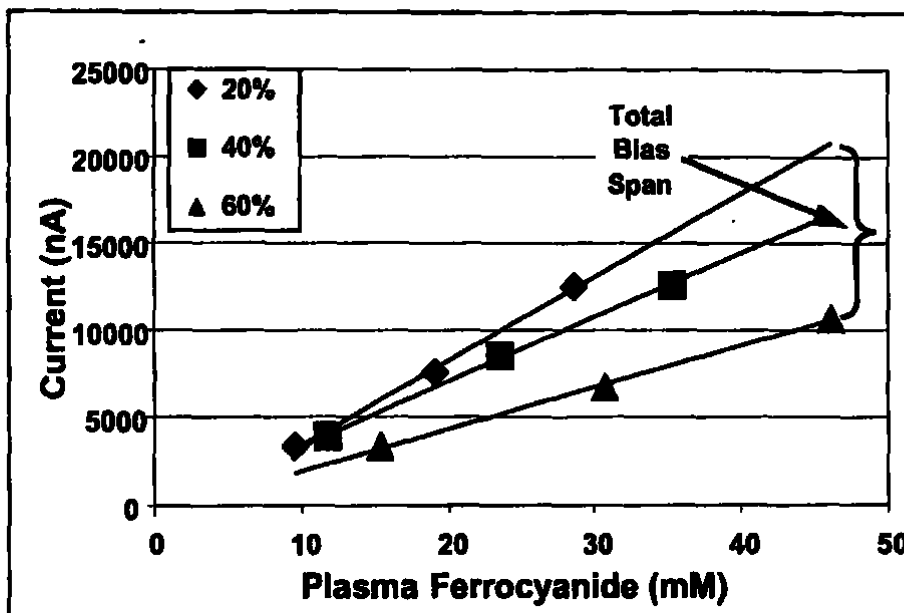


Fig.10A

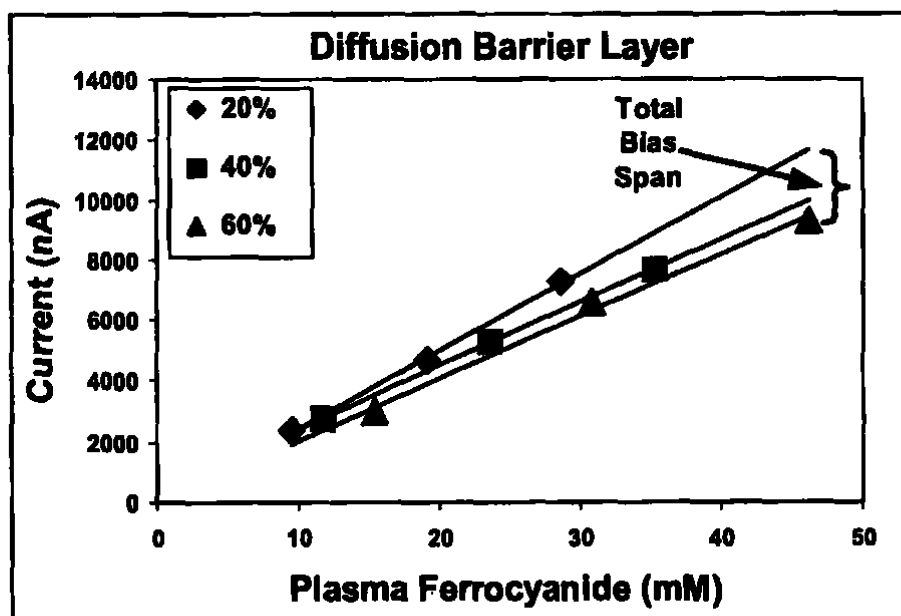


Fig.10B

6/14

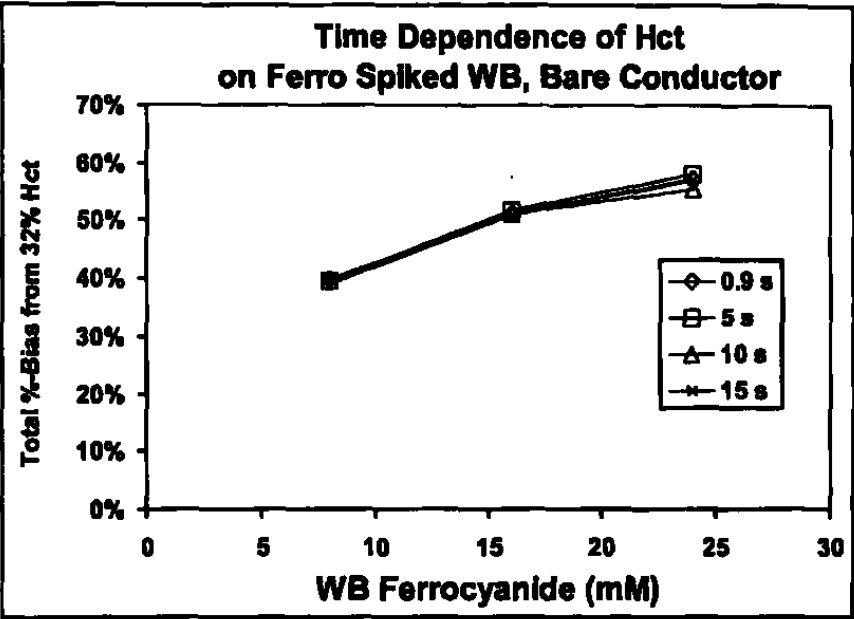


Fig.11A

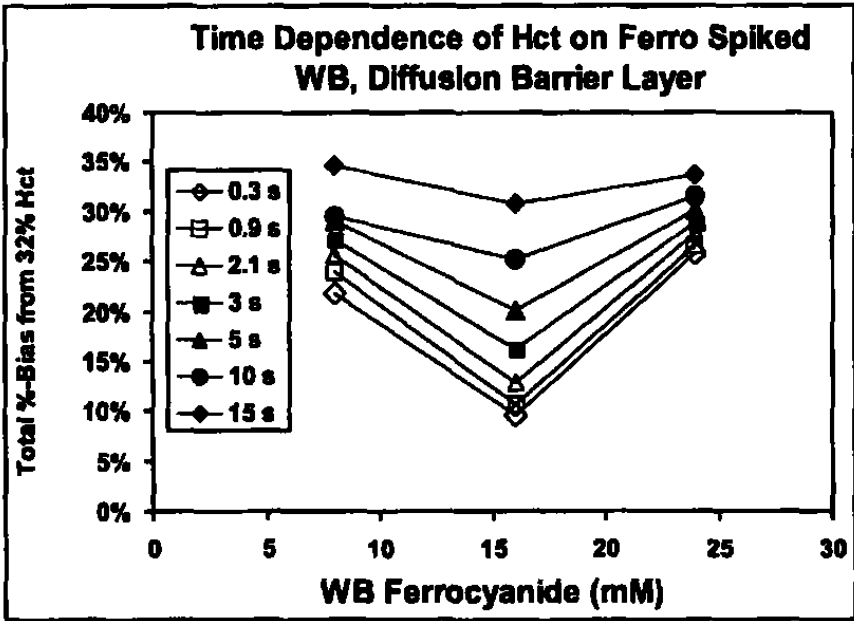


Fig.11B

7/14

	10 second Read Pulse					1 second Read Pulse					Bias Reduction (%)
	50	100	200	400	Avg Bias	50	100	200	400	Avg Bias	
1	18.6	37.5		53.46	36.53	-2.4	15		23.06	11.9	67.44
2	2.6	6.8		42.85	17.4	-15.3	-4.9		41.6	7.1	58.96
3	26.2	35.3		34.6	32	9.3	11.2		28.8	16.4	48.63
4	19.8	33		32.2	28.4	-0.1	16		15.8	10.6	62.74
5	6.93	30.92		38.43	25.42	-15.27	17.2		5.27	2.4	90.57
6	26.02	51.79		72.36	50.05	3.45	26.54		44.06	24.68	50.69
7	28.84	46.97		73.86	49.89	10.69	30.08		55.69	32.15	35.56
8	6.42	35.02	54.5	57.55	38.37	-15.19	16.03	35.16	10.23	11.56	69.88
9	30.83	45.52	44.49	44.02	41.22	24.58	44.38	35.2	22.4	31.64	23.24
10	27.69	26.57	34.69	39.19	32.04	0.62	-12.9	22.03	28.54	9.57	70.12
11	47.81	50.62	61.12	59.21	54.69	11.94	15.76	31	40.58	24.82	54.62
12	43.04	71.63	71.02	65.64	62.83	18.2	33.74	36.35	44.89	33.29	47.01
13	16.08	13.19	47.69	52.52	32.37	-12.6	9.33	25.79	40.02	15.64	51.69
14	7.12	32.24	44.75	51.21	33.83	-11.46	9.08	30.96	40.68	17.32	48.82
15	-0.48	9.2	42.8	45.63	24.29	-11.84	2.46	38.14	38.79	16.89	30.47
16	16.65	32.87	40.72	30.68	30.23	0.88	12.18	21.8	33.71	17.14	43.3
17	-1.18	38.75	51.86	70.02	39.86	-27.27	12.67	24.16	47.27	14.21	64.36
18	56.88	93.75	78.6	77.14	76.59	23.36	45.99	42.02	46.07	39.36	48.61
19	23.79	35.17	47.23	57.69	40.97	-5.07	5.6	30.47	34.25	16.31	60.18
20	20.72	33.07	53.1	55.28	40.54	-14.11	5.56	31.84	39.14	15.61	61.5
21	18.19	21.19	33.42	39.41	28.05	-6.16	-1.94	18.72	36.75	11.84	57.78
22	22.31	22.09	37.74	39.99	30.53	-8.59	-7.56	33.71	54.01	17.89	41.39
23	56.53	51.14	33.52	30.27	42.87	26.7	15.94	37.49	56.05	34.05	20.58
24	38.63	57	56.52	56.57	52.18	13.35	13.92	30	37.49	23.69	54.6
25	-7.53	17.23	39.26	53.24	25.55	-29.85	3.52	29.79	46.04	12.38	51.57
26	38.26	53.5	57.71	56.42	51.47	7.58	18.87	28.72	34.02	22.3	56.68
27	-2.43	27.72	50.71	53.16	32.29	-15.9	3.56	35.95	42.93	16.63	48.48
28	40.41	55.55	46.16	51.23	48.34	6.35	15.17	25.73	41.91	22.29	53.89
29	17.1	32.74	58.15	67.64	43.91	-23.8	-0.67	44.21	55.16	18.72	57.35
30	8.92	30.32	32.7	48.09	30.01	-6.61	16.28	35.8	48.81	23.57	21.46
31	5.75	31.54	44.94	57.71	34.98	-29.54	30.31	42.45	56.01	24.81	29.09
32	0.25	5.7	11.11	26.79	10.96	-4.4	-1.72	1.69	27.09	5.66	48.33
33	1.19	2.87	5.66	10.87	5.15	-5.32	-0.28	-2.92	14.71	1.55	69.99
34	10.01	34.95	60.03	54.07	39.76	-2.53	17.58	46.25	41.26	25.64	35.51
35	27.66	38.11	80.72	84.21	57.67	12.68	15.69	57.99	61.93	37.08	35.72
36	7.88	7.51	43.07	38.97	24.36	0.1	-3.91	34.85	29.6	15.16	37.76
Ave											50.24

Fig.12

8/14

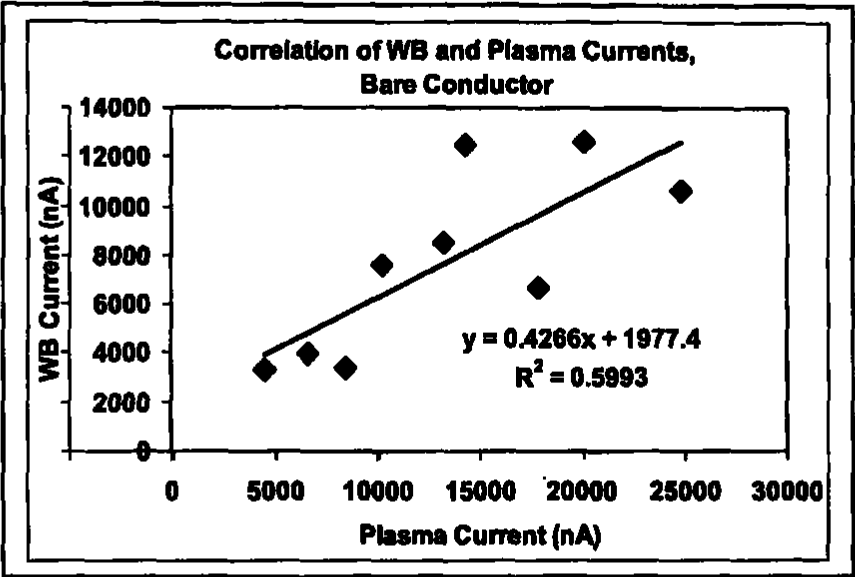


Fig.13A

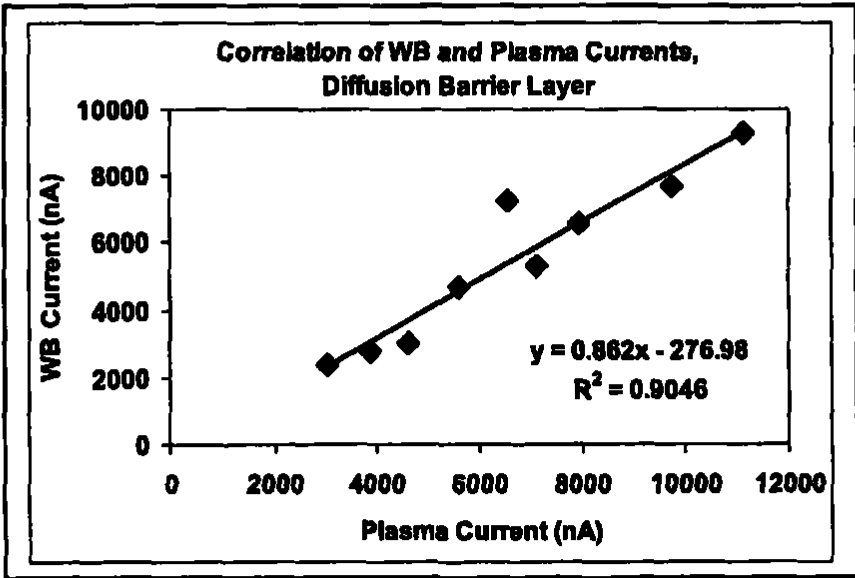


Fig.13B

9/14

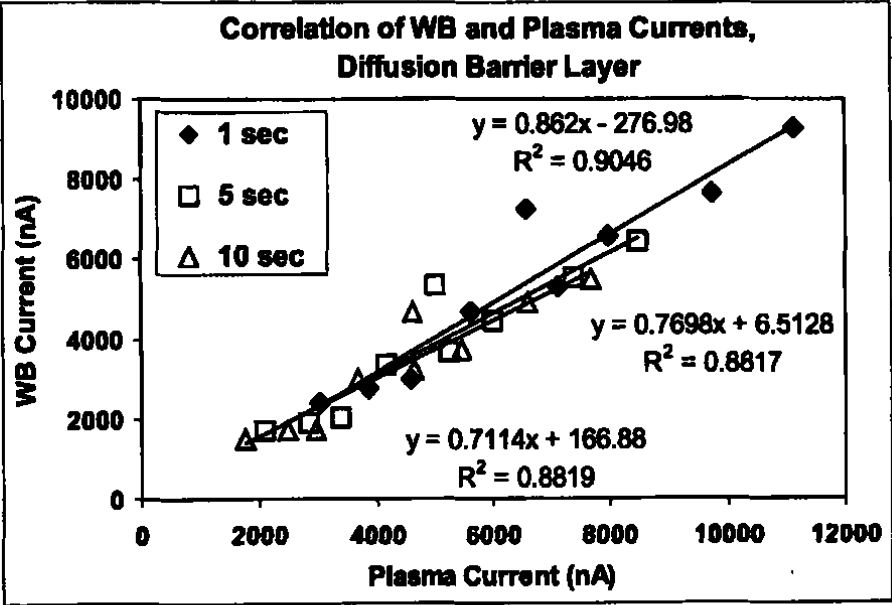


Fig.13C

10/14

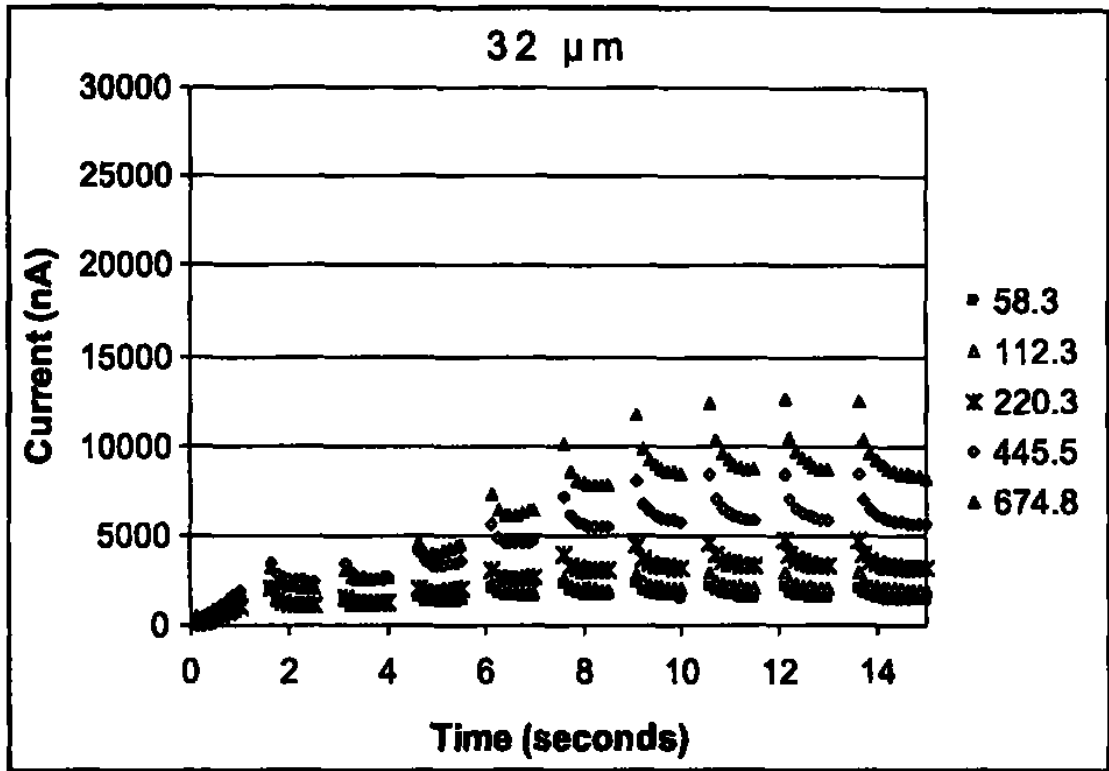


Fig.14A

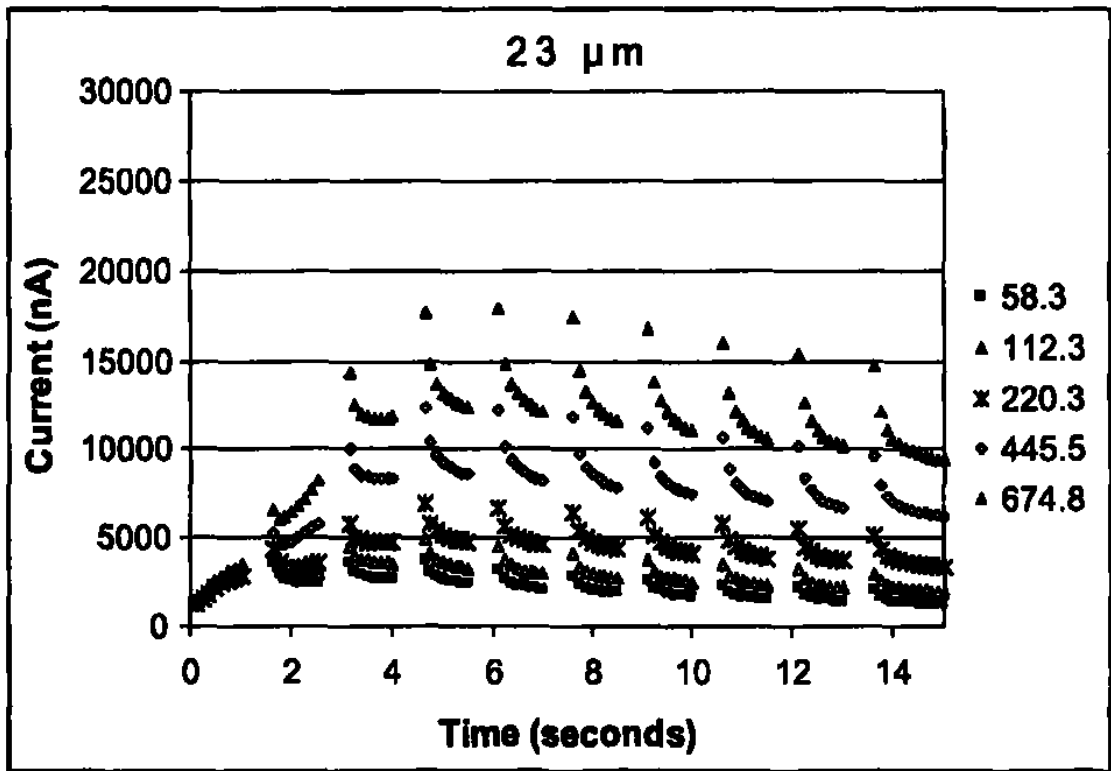


Fig.14B

11/14

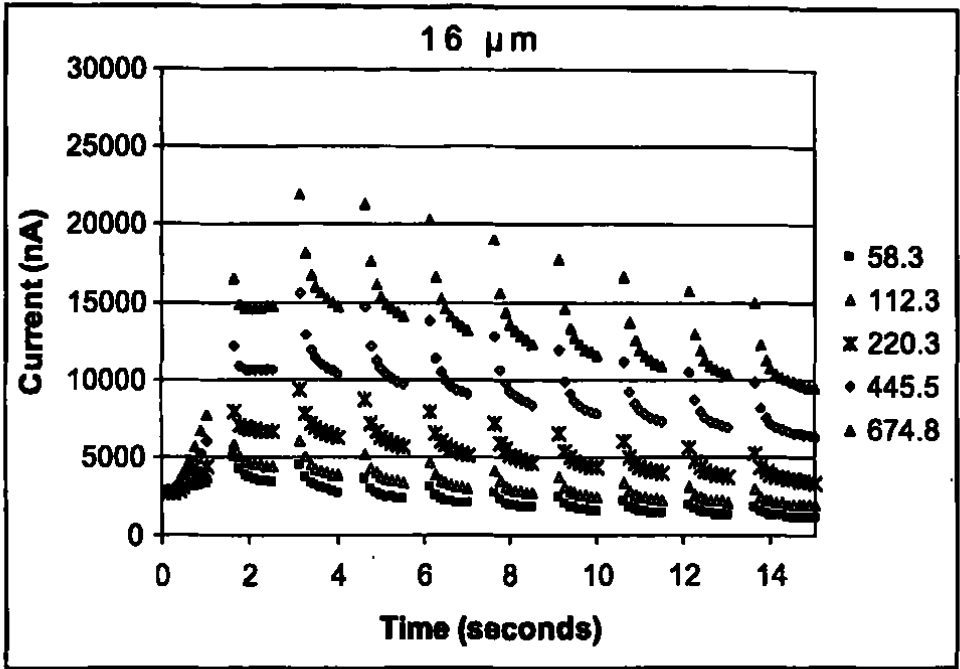


Fig.14C

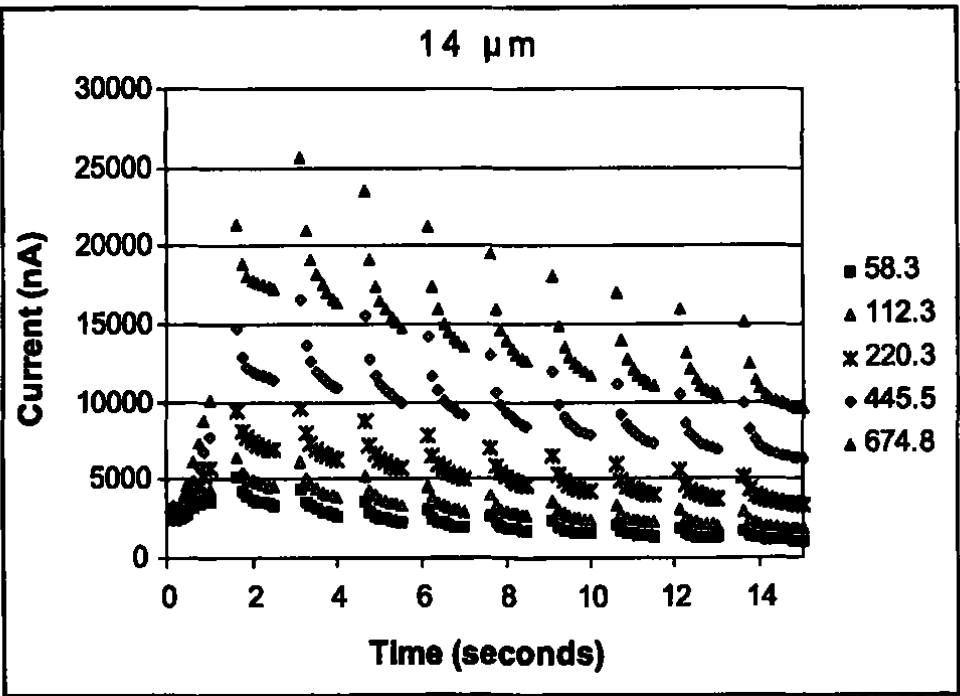


Fig.14D

12/14

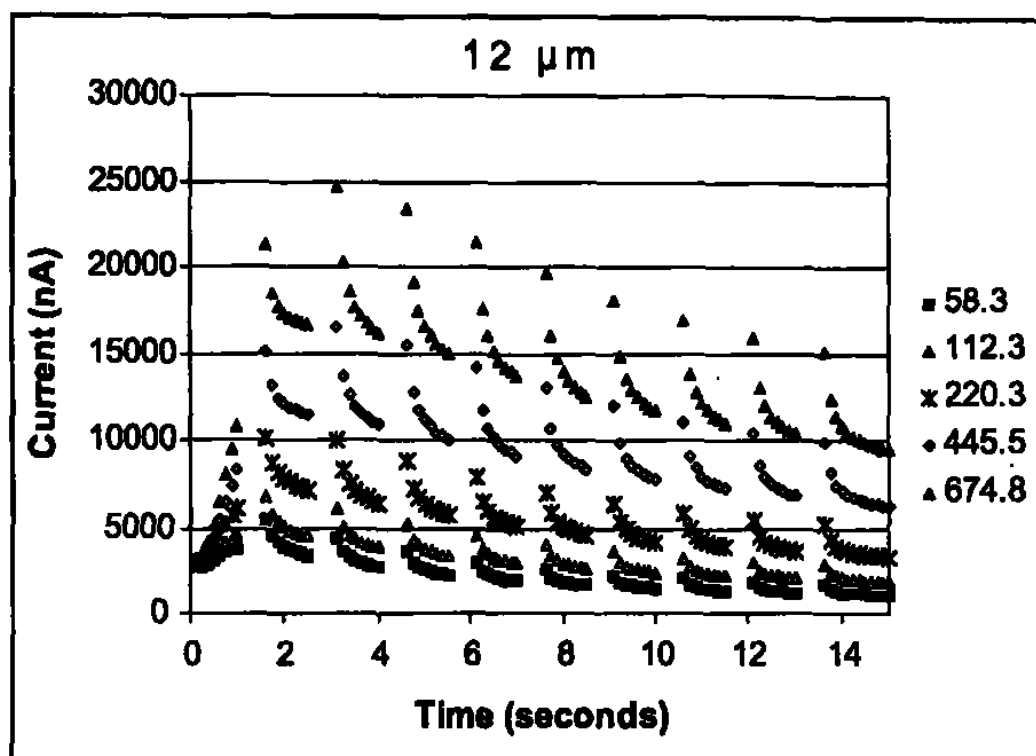


Fig.14E

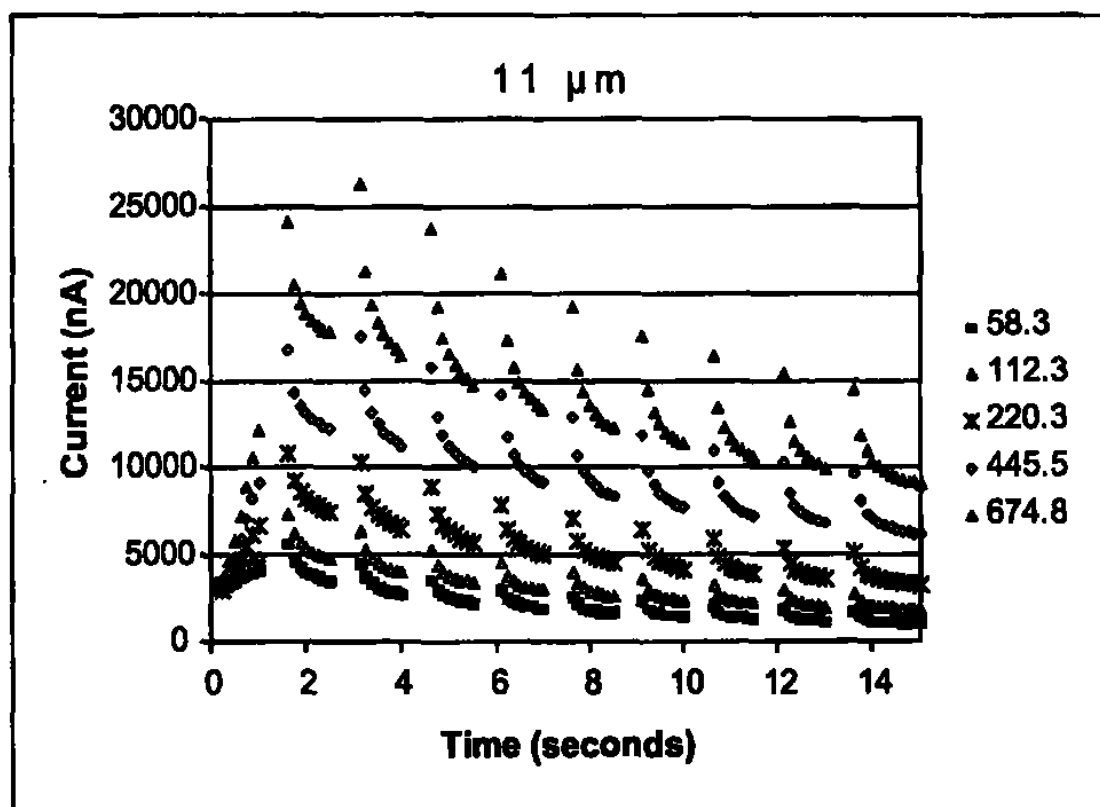


Fig.14F

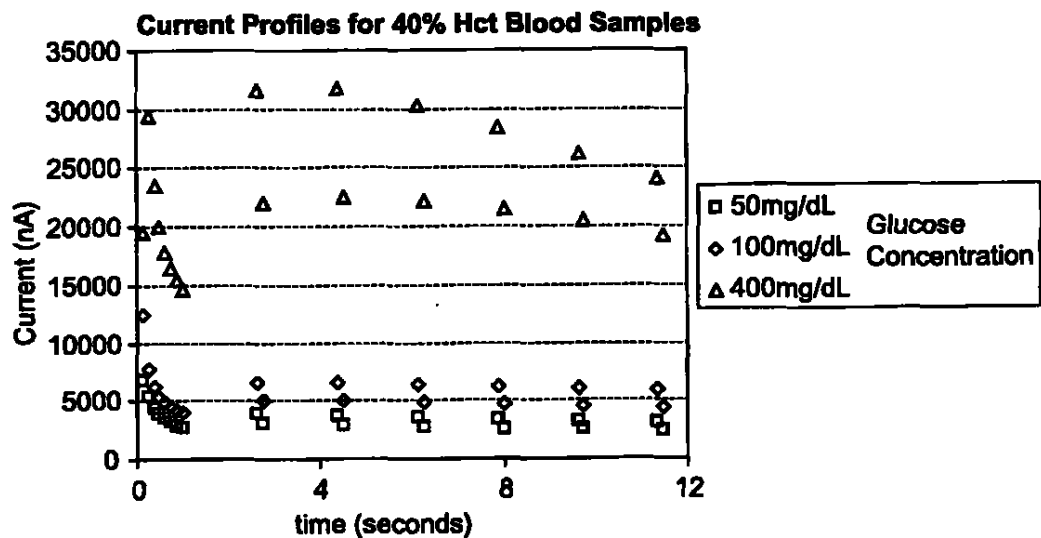


Fig.14G

5.

14/14

Precision Comparison

A	Slope					Intercept			
	1 sec	5 sec	10 sec	15 sec		1 sec	5 sec	10 sec	15 sec
2-4-x									
1 mil	17.625	11.696	9.521	8.042	1 mil	2426	1282.3	963.34	814.11
3 mil	17.835	11.965	10.013	8.8584	3 mil	2374.5	1226	894.65	751.68
5 mil	17.408	12.07	10.334	9.267	5 mil	2268	1147.5	779	613.64
10 nil	17.789	12.282	10.406	9.3369	10 nil	2527	1243.5	835.45	646.3
Ave	17.66	12.00	10.07	8.88		2398.88	1224.83	868.11	706.43
StDev	0.19	0.24	0.40	0.59		107.82	56.66	79.12	92.86
%-CV	1.09	2.03	4.00	6.70		4.49	4.63	9.11	13.14

B	Slope					Intercept			
	1 sec	5 sec	10 sec	15 sec		1 sec	5 sec	10 sec	15 sec
4-2-x									
1 mil	14.318	10.541	8.6459	7.4083	1 mil	1600	922.18	704.06	617.93
3 mil	14.487	10.887	9.4164	8.2635	3 mil	1490.4	815.49	511.94	458.89
5 mil	14.457	10.949	9.7811	8.9251	5 mil	1551.3	813.45	401.4	279.92
10 nil	13.882	10.785	9.6788	8.8721	10 nil	1650.1	828.27	413.41	274.49
Ave	14.29	10.79	9.38	8.37		1572.95	844.85	507.70	407.76
StDev	0.28	0.18	0.51	0.71		68.23	51.97	139.96	164.18
%-CV	1.95	1.66	5.47	8.44		4.34	6.15	27.57	40.27

Fig.15

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES EN UNA CAPA DE BARRERA DE DIFUSIÓN

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisoria de los Estados Unidos No. 60/617.889 titulada "Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer (Determinación de concentraciones en una capa de barrera de difusión)", presentada el 12 de octubre de 2004 y de la Solicitud de Patente Provisoria de los Estados Unidos No. 60/655.180 titulada "Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer (Determinación de concentraciones en una capa de barrera de difusión)", presentada el 22 de febrero de 2005, cada una de las cuales se incorpora por completo a modo de referencia.

ANTECEDENTES

[002] Para el monitoreo de condiciones médicas y de la respuesta de los pacientes a las intervenciones terapéuticas, resulta deseable usar métodos analíticos que sean rápidos, exactos y cómodos para el paciente. Los métodos electroquímicos han sido de utilidad para cuantificar determinados analitos en fluidos del organismo, en particular en muestras de sangre. Típicamente, estos analitos biológicos, como la glucosa, sufren reacciones redox al ponerse en contacto con enzimas específicas. La corriente eléctrica generada por dichas reacciones redox se puede correlacionar con la concentración del analito biológico en la muestra.

[003] Se han desarrollado minúsculas celdas electroquímicas que ofrecen a los pacientes la libertad de monitorear las concentraciones del analito en sangre sin necesitar un profesional o un técnico de la salud. Los sistemas

electroquímicos típicos operados por el paciente utilizan una tira reactiva desechable con un instrumento de medición dedicado que contiene la circuitería y los sistemas de salida necesarios. Para el análisis, el dispositivo de medición se conecta a la tira reactiva electroquímica desechable que contiene los electrodos y los reactivos para medir la concentración del analito en una muestra que se aplica en la tira.

[004] Los más comunes de estos sistemas electroquímicos en miniatura son los sensores de glucosa, que proporcionan mediciones de las concentraciones de glucosa en sangre. Idealmente, un sensor de glucosa en miniatura debe proporcionar lecturas exactas de las concentraciones de glucosa mediante el análisis de una sola gota de sangre entera, típicamente entre 1-15 microlitros (μl).

[005] En una celda analítica electroquímica típica, la semirreacción de oxidación o de reducción que involucra al analito cede o acepta electrones, respectivamente. Este flujo de electrones se puede medir, siempre que los electrones puedan interactuar con un electrodo de trabajo que esté en contacto con la muestra a ser analizada. El circuito eléctrico se cierra a través de un contraelectrodo que también está en contacto con la muestra. En el contraelectrodo también se produce una reacción química, que es del tipo opuesto (oxidación o reducción) al tipo de reacción que ocurre en el electrodo de trabajo. De este modo, si en el electrodo de trabajo se produce una oxidación, en el contraelectrodo habrá una reducción. Ver, por ejemplo, *Fundamentals Of Analytical Chemistry, 4th Edition*, D.A. Skoog and D.M. West; Philadelphia: Saunders College Publishing (1982), pp 304-341.

[006] Ciertos sistemas electroquímicos miniaturizados convencionales incluyen un electrodo de referencia verdadero. En estos sistemas, el electrodo de referencia verdadero puede ser un tercer electrodo que suministra al sistema un potencial de referencia invariable, además del electrodo de trabajo y del contraelectrodo. Si bien se conocen muchos materiales para electrodos de referencia, una combinación típica es la de plata (Ag) con cloruro de plata (AgCl). Los materiales que suministran el potencial de referencia no variable, como una mezcla de plata y cloruro de plata, están separados, por su insolubilidad o por otros medios, de los componentes de la reacción de la solución de análisis.

[007] En otros sistemas electroquímicos en miniatura se emplea una combinación de contraelectrodo/electrodo de referencia. Estas tiras reactivas electroquímicas típicamente son sistemas de dos electrodos, que tienen un electrodo de trabajo y un contraelectrodo/electrodo de referencia. La combinación contraelectrodo/electrodo de referencia es posible cuando un electrodo de referencia verdadero también se usa como contraelectrodo.

[008] Como son electrodos de referencia verdaderos, los contraelectrodos/electrodos de referencia típicamente son mezclas de plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl) que exhiben propiedades electroquímicas estables debido a la insolubilidad de la mezcla en el medio acuoso de la solución de análisis. Como durante el uso transitorio la relación entre Ag y AgCl no se modifica significativamente, el potencial del electrodo tampoco resulta modificado significativamente.

[009] Una tira reactiva electroquímica se fabrica típicamente revistiendo la superficie conductora de una tira de análisis con una capa de reactivo. Para

facilitar la fabricación, la capa de reactivo se puede aplicar en una única capa sobre la totalidad de los electrodos.

[0010] La capa de reactivo puede incluir una enzima para facilitar la reacción de oxidación o reducción del analito, así como cualquier mediador u otro tipo de sustancia que ayude a transferir electrones entre la reacción del analito y la superficie del conductor. La capa de reactivo también puede incluir un ligante para mantener unidos la enzima y el mediador, permitiendo de este modo su aplicación sobre los electrodos.

[0011] Las muestras de sangre entera (WB) contienen glóbulos rojos (RBC) y plasma. El plasma está formado en su mayor parte por agua, pero también contiene algunas proteínas y glucosa. El hematocrito es el volumen del componente de glóbulos rojos en relación al volumen total de la muestra de sangre entera, que a menudo se expresa como porcentaje. Las muestras de sangre entera generalmente tienen porcentajes de hematocrito entre el 20 y el 60%, con un promedio del ~40%.

[0012] Una de las desventajas de las tiras reactivas electroquímicas convencionales utilizadas para medir la concentración de glucosa en sangre entera es el denominado "efecto hematocrito". La causa del efecto hematocrito es el bloqueo de la difusión del mediador u otras especies medibles hacia la superficie del conductor para la medición provocado por los glóbulos rojos. Como cada vez que se hace la determinación en una muestra el tiempo que dura la medición es mismo, las variaciones de la concentración de glóbulos rojos en las muestras de sangre pueden dar lugar a inexactitudes en los valores medidos. Estas inexactitudes se deben a que cuando los glóbulos rojos interfieren con la difusión de la especie medible hacia la superficie del

conductor, el sensor no puede diferenciar entre una concentración de una especie medible más baja y una concentración más alta. De este modo, las variaciones de la concentración de glóbulos rojos en la muestra de sangre entera tienen como consecuencia inexactitudes (el efecto hematocrito) en la lectura de la glucosa.

[0013] Si se hacen determinaciones en muestras de sangre entera que contienen niveles idénticos de glucosa pero cuyos valores de hematocrito son 20, 40 y 60%, un sistema convencional basado en un conjunto de constantes de calibración (pendiente e intercepto, por ejemplo) informará tres lecturas diferentes de la glucosa. Aun cuando las concentraciones de glucosa sean las mismas, el sistema informará que la muestra con un hematocrito del 20% contiene más glucosa que la muestra con un hematocrito del 60% debido a que los glóbulos rojos interfieren con la difusión de la especie medible a la superficie del conductor.

[0014] Los sistemas convencionales están configurados generalmente para informar concentraciones de glucosa asumiendo un hematocrito del 40% en la muestra de sangre entera, sin tomar en cuenta el hematocrito real de la muestra de sangre. En estos sistemas, toda medición de la glucosa efectuada en una muestra de sangre que tenga un hematocrito inferior o superior al 40% conllevará cierto grado de inexactitud atribuible al efecto hematocrito.

[0015] Los sistemas convencionales para reducir el efecto hematocrito en sensores amperométricos incluyen el uso de filtros, como se describe en la Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.708.247 y 5.951.836; la inversión del potencial del impulso de lectura, como se describe en la WO 01/57510; y el uso de métodos que maximizan la resistencia inherente de la muestra, como se

dentro de la primera capa, en tanto que excluye sustancialmente de la detección la forma ionizada del mediador por fuera de la primera capa.

[0019] En una realización, se proporciona una tira reactiva electroquímica que comprende: una base; un primer electrodo en la base, donde el primer electrodo comprende al menos una primera capa en un primer conductor y donde la primera capa incluye una capa de reactivo; y un segundo electrodo en la base, donde el espesor de la primera capa se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el uso sustancialmente detecta una especie medible dentro de la primera capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la primera capa.

[0020] En otra realización, la tira reactiva electroquímica comprende además una segunda capa entre el primer conductor y la primera capa, donde el espesor de la segunda capa se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el uso sustancialmente detecta las especies medibles dentro de la segunda capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la segunda capa, incluidas las especies medibles dentro de la primera capa, y donde el espesor de la primera capa no se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el uso sustancialmente detecte las especies medibles dentro de la primera capa. La segunda capa puede tener un espesor de por lo menos 5 μm o entre 8 y 25 μm . En otro aspecto, la segunda capa puede tener un espesor de por lo menos 1 μm o entre 5 y 25 μm . La segunda capa puede no incluir la enzima oxidorreductasa y/o un mediador, pero puede incluir un material polimérico.

[0021] En otra realización, se proporciona un método para aumentar la exactitud de la determinación cuantitativa del analito, que comprende: proporcionar una tira reactiva electroquímica que tiene una base, un primer conductor en la base, un segundo conductor en la base, y al menos una primera capa en por lo menos el primer conductor, donde dicha al menos una primera capa incluye una capa de reactivo que incluye un ligante; introducir una muestra que contiene un analito que tiene un componente líquido en la tira reactiva electroquímica, donde la muestra suministra comunicación eléctrica entre el primer conductor y el segundo conductor; aplicar un potencial eléctrico entre el primer conductor y el segundo conductor en forma de un impulso de lectura, donde el impulso de lectura se aplica durante un tiempo que sustancialmente detecta una especie medible dentro de la primera capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la primera capa; medir el impulso de lectura para suministrar un valor cuantitativo de la concentración del analito en la muestra con exactitud aumentada en relación con una tira reactiva electroquímica que sustancialmente detecta las especies medibles por fuera de la primera capa. Antes del impulso de lectura se puede aplicar un impulso inicial y establecer un tiempo de un retardo.

[0022] En otra realización, se proporciona una tira reactiva electroquímica que comprende: una base; un primer electrodo en la base, donde el primer electrodo comprende al menos una primera capa en un primer conductor, la primera capa incluye un mediador, un ligante, y al menos una enzima entre glucosa oxidasa, glucosa dehidrogenasa y sus mezclas; y un segundo electrodo en la base que comprende una especie redox soluble, donde la especie redox soluble incluye por lo menos uno entre un complejo

organometálico de transición, un complejo metálico de coordinación con metal de transición, y sus mezclas, donde el espesor de la primera capa se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el uso sustancialmente detecta una especie medible dentro de la primera capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la primera capa. El segundo electrodo de la tira reactiva electroquímica puede comprender una segunda especie redox en un segundo conductor, donde la especie redox soluble es una primera especie redox de un par redox que incluye la primera especie y la segunda especie, y donde la relación molar entre la primera especie redox y la segunda especie redox es superior a aproximadamente 1,2:1.

[0023] En otra realización, se proporciona una tira reactiva electroquímica, que comprende: una base; una cubierta en contacto con la base que define un espacio; un primer electrodo en la base que incluye un primer conductor; una segunda capa en el primer conductor, donde una capa de reactivo no se encuentra entre el primer conductor y la segunda capa; un segundo electrodo en la base; y una capa de reactivo en el espacio, donde el espesor de la segunda capa se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el uso sustancialmente detecta una especie medible dentro de la segunda capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la primera capa.

[0024] Para facilitar una comprensión clara y uniforme de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se ofrecen las siguientes definiciones:

[0025] El término "sistema" se define como una tira reactiva 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.

[0026] El término "dispositivo de medición" se define como un dispositivo electrónico que puede aplicar un potencial eléctrico a los conductores de una tira reactiva electroquímica y medir las posteriores corrientes eléctricas. El dispositivo de medición puede incluir también la capacidad de procesamiento para determinar la presencia y/o la concentración de uno o más analitos en respuesta al potencial eléctrico medido.

[0027] El término "muestra" se define como una composición que contiene una cantidad desconocida del analito de interés. Típicamente, una muestra para análisis electroquímico está en forma líquida, y preferiblemente la muestra es una mezcla acuosa. Una muestra puede ser una muestra biológica, tal como sangre, orina o saliva. Una muestra puede ser un derivado de una muestra biológica, tal como un extracto, una dilución, un filtrado o un precipitado reconstituido.

[0028] El término "analito" se define como una o más sustancias presentes en la muestra. El proceso de medición determina la presencia, la cantidad o la concentración del analito que está en la muestra. Un analito puede interactuar con una enzima u otra especie que esté presente durante el análisis.

[0029] El término "exactitud" se define como el grado en que la cantidad del analito medida por una tira reactiva se corresponde con la verdadera cantidad de analito en la muestra.

[0030] El término "precisión" se define como el grado en que se aproximan entre sí múltiples lecturas del analito de una misma muestra.



[0031] El término "conductor" se define como una sustancia conductora de electricidad que permanece estacionaria durante un análisis electroquímico. Ejemplos de materiales conductores incluyen metales sólidos, pastas metálicas, carbón conductor, pastas de carbón conductor y polímeros conductores.

[0032] El término "material no ionizante" se define como un material que no ioniza durante el análisis electroquímico de un analito. Ejemplos de materiales no ionizantes incluyen carbón, oro, platino y paladio.

[0033] El término "especie medible" se define como toda especie con actividad electroquímica que se puede oxidar o reducir por efecto de un potencial adecuado en la superficie del electrodo de una tira reactiva electroquímica. Ejemplos de especies medibles incluyen un analito, un sustrato o un mediador.

[0034] El término "estado estacionario" se define como el estado en que la velocidad de difusión de la especie medible en la DBL (capa de barrera de difusión) es sustancialmente constante.

[0035] El término "oxidorreductasa" se define como toda enzima que facilita la oxidación o reducción de una especie medible. Una oxidorreductasa es un reactivo. El término oxidorreductasa incluye "oxidases," que facilitan las reacciones de oxidación, donde el oxígeno molecular es el aceptor de electrones; "reductases," que facilitan las reacciones de reducción, donde el analito se reduce y el oxígeno molecular no es el analito; y "dehidrogenasas", que facilitan las reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular no es el aceptor de electrones. Ver, por ejemplo, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition*, A.D. Smith, Ed., New York: Oxford University Press (1997) páginas 161, 476, 477 y 560.

[0036] El término "mediador" se define como una sustancia que puede ser oxidada o reducida y que puede transferir uno o más electrones entre una primera sustancia y una segunda sustancia. Un mediador es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés, pero permite la medición indirecta del analito. En un sistema simplificado, el mediador sufre una reacción redox con la oxidorreductasa una vez que la oxidorreductasa fue reducida u oxidada por efecto de su contacto con un analito u otro sustrato apropiado. Este mediador oxidado o reducido sufre luego la reacción opuesta en el electrodo de trabajo, regenerándose a su número de oxidación original.

[0037] El término "molécula orgánica electroactiva" se define como una molécula orgánica que no contiene un metal y es capaz de sufrir una reacción de oxidación o reducción. Las moléculas orgánicas electroactivas se pueden comportar como especies redox y como mediadores. Ejemplos de moléculas orgánicas electroactivas incluyen la coenzima pirroloquinolina quinona (PQQ), las benzoquinonas y naftoquinonas, N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenazinas, fenotiazinas, indofenoles e indaminas.

[0038] El término "ligante" se define como un material que es químicamente compatible con los reactivos utilizados en la capa de reactivo del electrodo de trabajo y que suministra soporte físico a los reactivos mientras contiene los reactivos en el electrodo conductor.

[0039] El término "espesor promedio inicial" se refiere a la altura promedio de una capa en estado seco antes de la introducción de una muestra líquida. Se usa el término promedio porque la superficie superior de la capa es despareja, presentando picos y valles.

[0040] El término "reacción redox" se define como una reacción química entre dos especies, que incluye la transferencia de al menos un electrón de una primera especie a una segunda especie. Por lo tanto, una reacción redox incluye una oxidación y una reducción. La porción de oxidación de la reacción involucra la pérdida de por lo menos un electrón de la primera especie y la porción de reducción involucra el agregado de por lo menos un electrón a la segunda especie. La carga iónica de una especie que resulta oxidada se hace más positiva, en una cantidad igual al número de electrones transferidos. Del mismo modo, la carga iónica de una especie que resulta reducida se hace menos positiva, en una cantidad igual al número de electrones transferidos.

[0041] El término "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 resulta en un aumento del número de oxidación de dicha especie, y la reducción de una especie resulta en una disminución del número de oxidación de dicha especie.

[0042] El término "par redox" se define como dos especies conjugadas de una sustancia química que tienen números de oxidación diferentes. La reducción de la especie que tiene el número de oxidación más alto produce la especie que tiene el número de oxidación más bajo. A la inversa, la oxidación de la especie que tiene el número de oxidación más bajo produce la especie que tiene el número de oxidación más alto.

[0043] El término "especie oxidable" se define como la especie de un par redox que tiene el número de oxidación más bajo y que, por lo tanto, tiene capacidad

de ser oxidada a la especie que tiene el número de oxidación más alto. Del mismo modo, el término "especie reducible" se define como la especie de un par redox que tiene el número de oxidación más alto y que, por lo tanto, tiene capacidad de ser reducida a la especie que tiene el número de oxidación más bajo.

[0044] El término "especie redox soluble" se define como una sustancia que es capaz de sufrir oxidación o reducción y que es soluble en agua (pH 7, 25° C) en una concentración de por lo menos 1,0 gramo por litro. Las especies redox solubles incluyen moléculas orgánicas electroactivas, complejos organometálicos de transición y complejos metálicos de coordinación con metal de transición. El término "especie redox soluble" excluye metales elementales y iones metálicos aislados, especialmente los insolubles o escasamente solubles en agua.

[0045] El término "complejo organometálico de transición", también denominado "complejo OTM", se define como un complejo en el que un metal de transición está unido a por lo menos a un átomo de carbono por medio de un enlace sigma (carga formal de -1 en el átomo de carbono unido por enlace sigma al metal de transición) o un enlace pi (carga formal de 0 en los átomos de carbono unidos por enlace pi al metal de transición). Por ejemplo, el ferroceno es un complejo OTM con dos anillos ciclopentadienilo (Cp), cada uno de ellos unido por sus cinco átomos de carbono a un hierro central por dos enlaces pi y un enlace sigma. Otro ejemplo de un complejo OTM es el ferricianuro (III) y su contraparte ferrocianuro reducido (II), donde seis ligandos ciano (carga formal de -1 en cada uno de los 6 ligandos) está unidos por

enlaces sigma a un hierro central por los átomos de carbono de los grupos ciano.

[0046] El término "complejo de coordinación" se define como un complejo que tiene una geometría de coordinación bien definida, tal como una geometría octaédrica o cuadrada plana. A diferencia de los complejos OTM, que se definen por sus enlaces, los complejos de coordinación se definen por su geometría. De este modo, los complejos de coordinación pueden ser complejos OTM (como el ferricianuro ya mencionado), o complejos donde átomos no metálicos que no son carbono, tales como heteroátomos que incluyen nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, están unidos por enlaces de tipo dativo al metal de transición central. Por ejemplo, rutenio hexaamina es un complejo de coordinación que tiene una geometría octaédrica bien definida en la que seis ligandos NH_3 (carga formal de 0 en cada uno de los 6 ligandos) están unidos por enlaces de tipo dativo al rutenio central. Se puede ver un tratamiento más completo de los complejos organometálicos de transición, los complejos de coordinación y los enlaces con metales de transición en Collman et al., *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry* (1987) y Miessler & Tarr, *Inorganic Chemistry* (1991).

[0047] El término "en" se define como "sobre" y tiene relación con la orientación que se describe. Por ejemplo, si un primer elemento se deposita encima de al menos una porción de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está "depositado en" el segundo. En otro ejemplo, si un primer elemento está sobre por lo menos una porción de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está "en" el segundo. El uso del término "en" no excluye la presencia de sustancias entre el elemento superior y el inferior que se están describiendo.

Por ejemplo, un primer elemento puede tener un recubrimiento sobre su superficie superior y un segundo elemento sobre por lo menos una porción del primer elemento, y su recubrimiento superior se puede decir que está "en" el primer elemento. Por lo tanto, el uso del término "en" puede significar o no que los dos elementos cuya relación se describe están en contacto físico entre sí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0048] La invención se puede comprender mejor haciendo referencia a las figuras y descripciones siguientes. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, buscándose en cambio resaltar la ilustración de los principios de la invención. Asimismo, en las figuras los números de referencia iguales designan las mismas partes en las diferentes vistas.

[0049] La FIG. 1 es el diagrama de una vista superior de la base de un sensor que contiene un electrodo de trabajo y un contraelectrodo.

[0050] La FIG. 2 es el diagrama de una vista inferior de la base del sensor de la FIG. 1.

[0051] La FIG. 3 es el diagrama de una vista superior de la base de un sensor y los electrodos debajo de una capa dieléctrica.

[0052] Las FIGS. 4-6 son vistas superiores de tres tiras reactivas con electrodos.

[0053] La FIG. 7 es el diagrama de una vista inferior de la base del sensor de la FIG. 5 que muestra el tercer electrodo.

[0054] La FIG. 8 es una vista en perspectiva de una tira reactiva completamente armada.

[0055] Las FIGS. 9A y 9B muestran un electrodo de trabajo que tiene una superficie conductora y una DBL durante la aplicación de un impulso de lectura largo y uno corto.

[0056] Las FIGS. 10A y 10B son gráficos que ilustran el aumento de la exactitud de la medición cuando se combina una DBL con un impulso de lectura corto de acuerdo con la presente invención.

[0057] Las FIGS. 11A y 11B son gráficos que muestran el aumento de la exactitud que se produce por la reducción de la duración del impulso de lectura cuando se utiliza una DBL.

[0058] La FIG. 12 es una tabla donde se comparan los resultados del sesgo para impulsos de lectura de 1 y 10 segundos a partir de análisis múltiples con múltiples tipos de tiras reactivas que tienen una capa de barrera de difusión.

[0059] Las FIGS. 13A-13C son gráficos que ilustran la capacidad de una tira reactiva que tiene una DBL de acuerdo con la presente invención para medir con exactitud la verdadera concentración de glucosa de una muestra utilizando un impulso de lectura corto.

[0060] Las FIGS. 14A-14F son gráficos que ilustran los perfiles de caída para múltiples concentraciones de glucosa al utilizar diferentes espesores de una combinación DBL/capa de reactivo con impulsos de lectura sucesivos de 1 seg.

[0061] La FIG. 14G ilustra los perfiles de caída para múltiples concentraciones de glucosa para una combinación DBL/capa de reactivo de 1 a 2 μm con un impulso inicial de 1 segundo seguido por impulsos de lectura sucesivos de 0,25 segundos.

[0062] La FIG. 15 compara la precisión entre tiras reactivas que tienen una DBL y espacios con un volumen de 1, 3, 5 y 10 ml al aplicar impulsos de lectura de 1, 5, 10 y 15 segundos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0063] Diminutas celdas electroquímicas brindan a los pacientes el beneficio de la medición casi instantánea de sus concentraciones de glucosa. Una de las causas principales de error en estas mediciones es el efecto hematocrito. El efecto hematocrito se produce cuando los glóbulos rojos afectan al azar la velocidad de difusión de las especies medibles hacia la superficie conductora del electrodo de trabajo.

[0064] Al medir una especie medible que se encuentra en una capa de barrera de difusión (DBL), con la exclusión sustancial de las especies medibles que se encuentran en el exterior de la DBL, se pueden reducir los errores de medición introducidos por el efecto hematocrito y por las variaciones de fabricación. La exclusión sustancial de las especies medibles externas a la DBL se puede obtener seleccionando el espesor de la DBL en base a la duración del impulso de lectura o seleccionando la duración del impulso de lectura en base al espesor de la DBL.

[0065] La FIG. 1 es el diagrama de una vista superior de la base de un sensor **10** que tiene conductores **12** y **14** y que contiene un electrodo de trabajo **20** y un contraelectrodo **30**. La FIG. 2 es el diagrama de una vista inferior de la base del sensor **10**, que muestra el electrodo de trabajo **20** y el contraelectrodo **30**. El electrodo de trabajo **20** incluir un primer conductor principal **22**, en tanto que el contraelectrodo **30** puede incluir un segundo conductor principal **32**. Optativamente, puede haber superficies conductoras **24** y **34** colocadas en los

conductores principales **22** y **32**, respectivamente. Una capa de barrera de difusión (DBL) **28** también puede estar colocada en el conductor principal **22** del electrodo de trabajo **20**.

[0066] En un aspecto, los conductores principales **22** y **32** pueden incluir lámina metálica que está en contigüidad con las superficies conductoras **24** y **34** y que incluye una o más capas de polvo de carbón conductor. El electrodo de trabajo **20** puede incluir una primera capa de reactivo **26** que se encuentra en el primer conductor principal **22**, mientras que el contraelectrodo **30** puede incluir una segunda capa de reactivo **36** que se encuentra en el segundo conductor principal **32**. En otro aspecto, el contraelectrodo **30** puede ser un contraelectrodo/electrodo de referencia o un contraelectrodo recubierto con una especie redox soluble que tiene un potencial de oxidación o de reducción conocido. La base del sensor **10** puede tener otras configuraciones, incluidas aquellas con menor o mayor número de componentes adicionales, tal como se conoce en la técnica. Se pueden ver otros diseños de sensores, por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.120.420 y 5.798.031, cada una de las cuales se incorpora por completo a modo de referencia.

[0067] La base del sensor **10** es preferiblemente un aislante eléctrico que puede aislar el sistema electroquímico de sus vecindades. En uso, el electrodo de trabajo **20** y el contraelectrodo **30** están en comunicación eléctrica con un dispositivo de medición (no se muestra) a través de los conductores **12** y **14**, respectivamente. El dispositivo de medición puede aplicar un potencial eléctrico entre el electrodo de trabajo **20** y el contraelectrodo **30**. El dispositivo de medición después puede cuantificar la corriente eléctrica que circula entre el electrodo de trabajo **20**, una muestra (no se muestra), y el contraelectrodo **30**.

La muestra puede establecer comunicación eléctrica entre los electrodos **20**, **30**.

[0068] Los conductores principales **22** y **32** y las superficies conductoras optativas **24** y **34** de los electrodos **20** y **30** pueden contener cualquier sustancia conductora de la electricidad, incluyendo metales, polímeros conductores y carbón conductor. Ejemplos de sustancias conductoras eléctricas incluyen una capa delgada de un metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre o tungsteno, así como una capa delgada de polvo de carbón conductor. Preferiblemente, los conductores que están en contacto con la muestra durante el uso del sensor están fabricados en materiales inertes, a fin de que el conductor no sufra una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis. Más preferiblemente, los electrodos que están en contacto con la muestra durante el uso del sensor están fabricados en materiales no ionizantes, tales como carbón, oro, platino y paladio.

[0069] Los metales se pueden depositar en la base **10** por deposición de una lámina de metal, por deposición química en fase vapor o por deposición de una suspensión del metal. El carbón conductor se puede depositar en la base **10**, por ejemplo, por pirólisis de un material que contiene carbón o por deposición de una suspensión de polvo de carbón. La suspensión puede contener más de un tipo de sustancia conductora de la electricidad. Por ejemplo, la suspensión puede contener paladio y polvo de carbón. En el caso de la deposición de una suspensión, la mezcla fluida se puede aplicar al material de la base como una tinta, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5.798.031.

[0070] Cuando las superficies conductoras **24** y **34** son depositadas en los conductores principales **22** y **32**, se prefiere que la sustancia en la que están

fabricadas las superficies conductoras sea un material conductor no ionizante. Cuando los conductores principales **22** y **32** se utilizan sin las superficies conductoras **24** y **34** diferenciadas, se prefiere que el material conductor en el que están fabricados los conductores principales sea no ionizante. Más preferiblemente, la porción del contraelectrodo **30** en contacto con la segunda capa de reactivo **36** (sea el conductor principal **32** o la superficie conductora **34**) es un material no ionizante.

[0071] Una DBL puede estar integrada con la capa de reactivo **26** o puede ser una capa diferente **28**, como se muestra en la FIG. 2. De este modo, la DBL se puede conformar como una combinación reactivo/capa de barrera de difusión en la superficie conductora, como una capa diferente en la superficie conductora, como una capa diferente en la superficie conductora donde se encuentra la capa de reactivo, o como una capa diferente en la capa de reactivo.

[0072] La DBL provee un espacio poroso que tiene un volumen interno donde puede estar contenida una especie medible. Los poros de la DBL se seleccionan de modo que las especies medibles puedan difundirse hacia la DBL, mientras que los componentes de mayor tamaño físico de la muestra, como los glóbulos rojos, quedan sustancialmente excluidos. Si bien las tiras reactivas convencionales han empleado diversos materiales para filtrar glóbulos rojos del electrodo de trabajo, la DBL de la presente invención proporciona además un espacio poroso interno para contener y aislar una porción de la especie medible del volumen de la muestra.

[0073] Al controlar la duración de la reacción de medición en la superficie conductora, la tira reactiva puede medir la especie medible interna en la DBL, a

la vez que excluye sustancialmente de la medición las especies medibles externas a la DBL. En relación con la superficie conductora, el volumen interno de la DBL modifica el parámetro físico de la velocidad de difusión de la especie medible que contiene, en relación con la velocidad de difusión de las especies medibles externas a la DBL.

[0074] Como la especie medible interna en la DBL se difunde hacia la superficie de la superficie conductora a una velocidad diferente que las especies medibles externas a la DBL, la duración de la reacción de medición en el electrodo de trabajo selecciona cuál es la especie medible que se mide preferentemente. Aunque idénticas desde el punto de vista molecular, las diferentes velocidades de difusión de las especies medibles internas y externas a la DBL permiten su diferenciación sustancial.

[0075] Como la capa de reactivo **26** del electrodo de trabajo **20** puede incluir un ligante, toda porción del ligante que no se solubiliza en la muestra antes de la aplicación de un impulso de lectura puede funcionar como la DBL. Cuando los reactivos están combinados con el material del ligante que proporciona soporte para los reactivos y también la DBL, el material del ligante es preferiblemente un material polimérico que es por lo menos parcialmente hidrosoluble. De esta manera, una porción del material del ligante se puede solubilizar, mientras que el resto del material del ligante puede permanecer en el conductor principal **22** para funcionar como la DBL.

[0076] Los materiales poliméricos parcialmente hidrosolubles incluyen, sin limitación, poli(etilén óxido) (PEO), carboxi metil celulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), hidroxietil celulosa (HEC), hidroxipropil celulosa (HPC), metil celulosa, etil celulosa, etil hidroxietil celulosa, carboximetil etil celulosa, polivinil

pirrolidona (PVP), poliamino ácidos tal como polilisina, poliestireno sulfonato, gelatina, ácido acrílico, ácido metacrílico, almidón y sus sales de anhídrido maleico, sus derivados y sus combinaciones. Entre los mencionados, se prefieren en la presente el PEO, PVA, CMC y HEC, prefiriéndose especialmente en la presente CMC y PEO.

[0077] Materiales que se empleaban convencionalmente para formar filtros para excluir glóbulos rojos del electrodo de trabajo también se pueden emplear en la DBL. Dicho empleo se puede lograr aumentando el espesor del material o reduciendo la duración de la reacción de medición en el electrodo de trabajo en comparación con el material utilizado como filtro. También se puede lograr conformando el material de manera tal de modificar su viscosidad, tal como mediante la introducción de sales como cloruro de sodio o de potasio.

[0078] En otro aspecto, la DBL puede ser la DBL separada **28**. La capa separada **28** puede tener un espesor promedio inicial de por lo menos 5 μm , preferiblemente entre 8 y 25 μm , y más preferiblemente entre 8 y 15 μm . En otro aspecto, la capa separada **28** puede tener un espesor promedio inicial de por lo menos 1 μm o, preferiblemente, entre 5 y 25 μm . Cuando la DBL es una capa separada, puede estar fabricada en un material polimérico parcialmente soluble, tal como el mismo material utilizado como ligante en la capa de reactivo **26**, pero sin los reactivos. La capa separada **28** puede ser cualquier material que ofrezca el espacio poroso deseado, pero que durante el uso del sensor se solubilice en agua en forma parcial o lentamente.

[0079] Aunque no se muestra en las figuras, cuando la DBL es la capa separada **28**, la capa de reactivo **26** puede no estar colocada en la capa separada **28**. En este caso, la capa de reactivo **26** puede estar colocada en

cualquier porción de la tira reactiva que permita que el reactivo se disuelva en la muestra. Por ejemplo, la capa de reactivo **26** puede estar en la base del sensor **10** o en una cubierta **50**, como se trata más adelante en relación con la FIG. 8.

[0080] En un aspecto, las capas de reactivo primera y segunda pueden incluir los mismos componentes y estar colocadas en el primero y en el segundo conductor principal **22**, **32**. Cuando las capas de reactivo **26** y **36** para el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, **20** y **30** respectivamente, tienen composiciones diferentes, la capa de reactivo para cada electrodo se puede optimizar por separado. De este modo, la primera capa de reactivo **26** puede contener ingredientes que facilitan la reacción del analito y la transmisión de los resultados de esta reacción al primer conductor principal **22**.

[0081] En forma similar, la segunda capa de reactivo **36** puede contener ingredientes que facilitan el libre flujo de electrones entre la muestra que se está analizando y el segundo conductor principal **32**. Por ejemplo, una especie redox soluble incorporada en la segunda capa de reactivo **36** puede sufrir una reacción redox opuesta a la del analito. Aun cuando durante el uso la especie redox se consume (es decir, se convierte en su especie de contraparte), puede estar presente en la segunda capa de reactivo **36** en una concentración suficientemente alta para suministrar una relación lineal relativamente constante entre la corriente medida y la concentración del analito en el período de tiempo del análisis. Por lo tanto, el funcionamiento que se puede obtener optimizando por separado las capas de reactivo **26** y **36** es superior al de las tiras reactivas que utilizan la misma capa de reactivo para ambos electrodos.

90 \$

[0082] Una relación molar elevada de la especie redox soluble colocada en el contraelectrodo 30 puede aumentar el tiempo útil de almacenamiento de la tira reactiva. Entre el momento de la fabricación de la tira y su uso con una muestra puede producirse un pequeño grado de conversión espontánea de la especie redox soluble en su especie de contraparte. Como la concentración relativa permanecerá elevada debido al exceso de la especie redox soluble, después del almacenamiento los resultados provistos por el sensor podrán ser exactos.

[0083] La primera capa de reactivo 26 que se encuentra en el primer conductor principal 22 puede incluir una oxidorreductasa. La oxidorreductasa puede ser específica para el analito de interés. La oxidorreductasa puede ser específica para un sustrato, de modo que la reacción de la oxidorreductasa y su sustrato resulte afectada por la presencia o la cantidad del analito de interés. Si bien en un sentido formal un sustrato se ve afectado por la cantidad del analito, a menos que se indique de otro modo en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, el término analito incluye un analito efectivamente presente en la muestra o su sustrato.

[0084] En la siguiente Tabla I figuran ejemplos de oxidorreductasas y sus analitos específicos.

Oxidorreductasa (capa de reactivo)	Sustrato / analito
Glucosa dehidrogenasa	β-glucosa
Glucosa oxidasa	β-glucosa
Colesterol estearasa; colesterol oxidasa	Colesterol

Lipoproteína lipasa; glicerol quinasa; glicerol-3-fosfato oxidasa	Triglicéridos
Lactato oxidasa; lactato dehidrogenasa; diaforasa	Lactato
Piruvato oxidasa	Piruvato
Alcohol oxidasa	Alcohol
Bilirrubina oxidasa	Bilirrubina
Uricasa	Ácido úrico
Glutación reductasa	NAD(P)H
Monóxido de carbono oxidorreductasa	Monóxido de carbono

Tabla I

[0085] Por ejemplo, se puede usar una alcohol oxidasa en una capa de reactivo para suministrar un sensor que sea sensible a la presencia de alcohol en una muestra. Un sistema así podría ser útil para medir concentraciones de alcohol en la sangre. En otro ejemplo, se puede usar glucosa dehidrogenasa o glucosa oxidasa en la capa de reactivo para suministrar un sensor sensible a la presencia de glucosa en una muestra. Este sistema podría ser útil para medir concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo en pacientes con diabetes diagnosticada o en los que se sospeche diabetes. Si las concentraciones de dos sustancias diferentes están vinculadas mediante una relación conocida, la medición de una de las sustancias a través de su interacción con la oxidorreductasa puede permitir calcular la concentración de la otra sustancia. Por ejemplo, una oxidorreductasa puede proporcionar un sensor que es

sensible a un sustrato en particular y la concentración medida de este sustrato se puede usar luego para calcular la concentración del analito de interés.

[0086] La primera capa de reactivo **26** puede incluir un mediador. Sin que implique adherir a teoría alguna de la interpretación, se piensa que los mediadores pueden actuar bien como un cofactor redox en la reacción enzimática inicial o como un colector redox para aceptar electrones de la enzima u otra especie, o cederlos, una vez producida la reacción con el analito. En el caso de un cofactor redox, se piensa que el mediador es la especie que equilibra la reacción redox del analito. De este modo, si el analito resulta reducido, el mediador se oxida. En el caso de un colector redox, puede haber otra especie inicialmente oxidada o reducida para equilibrar la reacción redox del analito. Esta especie puede ser la propia oxidorreductasa o puede ser otra especie, tal como un cofactor redox.

[0087] Mediadores en celdas electroquímicas enzimáticas se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5.653.863, que se incorpora a la presente a modo de referencia. En ciertos casos, el mediador puede funcionar para regenerar la oxidorreductasa. En un aspecto, si la enzima oxida un analito, la enzima resulta reducida. La interacción de esta enzima con un mediador puede resultar en la reducción del mediador, junto con la oxidación de la enzima a su estado original, previo a la reacción. La interacción del mediador con el electrodo de trabajo **20** en presencia de un potencial eléctrico apropiado puede resultar en la liberación de uno o más electrones al electrodo, junto con la oxidación del mediador a su estado original previo a la reacción.

[0088] Ejemplos de mediadores incluyen OTM y complejos de coordinación, incluyendo compuestos de ferroceno, tal como el 1,1'-dimetil ferroceno; e

incluyendo complejos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.653.863, tales como ferrocianuro y ferricianuro. Ejemplos de mediadores incluyen también moléculas orgánicas electroactivas, incluyendo coenzimas tales como la coenzima pirroloquinolina quinona (PQQ); las benzoquinonas y naftoquinonas sustituidas descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 4.746.607, que se incorpora a la presente a modo de referencia; los N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas y oxinas descritos específicamente en la EP 0 354 441, que se incorpora a la presente a modo de referencia; las flavinas, fenazinas, fenotiazinas, indofenoles, 1,4-benzoquinonas sustituidas e indaminas descritas en la EP 0 330 517, que se incorpora a la presente a modo de referencia; y el fenazinio y las sales de fenazinio que se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 3.791.988, que se incorpora a la presente a modo de referencia. Se puede encontrar una revisión de los mediadores electroquímicos de sistemas redox biológicos en *Analytica Clinica Acta*. 140 (1982), páginas 1-18. Ejemplos de mediadores de molécula orgánica electroactiva también incluyen los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.520.786, que se incorpora a la presente a modo de referencia, incluyendo la 3-fenilimino-3H-fenotiazina (PIPT) y la 3-fenilimino-3H-fenoxazina (PIPO).

[0089] La segunda capa de reactivo 36 puede incluir una especie redox soluble. La especie redox soluble sufre la reacción redox opuesta a la reacción del analito de la oxidorreductasa, y de este modo se convierte en su especie de contraparte del par redox. Por ejemplo, si el analito se reduce, la especie redox soluble se oxida y si el analito se oxida, la especie redox soluble se reduce. La especie de contraparte del par redox también puede estar presente en la capa,

pero preferiblemente está presente en una concentración inferior a la concentración de la especie redox primaria. Más preferiblemente, la especie redox en la capa de reactivo en el contraelectrodo es exclusivamente la especie redox soluble que sufre la reacción opuesta a la reacción que sufre el sustrato de la oxidorreductasa.

[0090] Una especie redox soluble puede ser una molécula orgánica electroactiva, un complejo organometálico de transición, un complejo de coordinación con metal de transición o una combinación de estos elementos. Las moléculas orgánicas electroactivas adecuadas pueden incluir coenzima pirroloquinolina quinona (PQQ), benzoquinonas y naftoquinonas sustituidas, N-óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenazinas, fenotiazinas, indofenoles, indaminas, sales de fenazinio y sales de fenoxazinio.

[0091] Especies redox solubles adecuadas también pueden ser complejos OTM o complejos de coordinación con metal de transición. Muchos metales de transición existen naturalmente en forma de compuestos con hidrógeno, oxígeno, azufre o con otros metales de transición, y estos metales de transición se observan generalmente en uno o más estados de oxidación. Por ejemplo, el hierro, cromo y el cobalto se encuentran típicamente en estados de oxidación de +2 (es decir, II) o +3 (es decir, III). Por lo tanto, hierro (II) y hierro (III) son dos especies de un par redox. Muchos metales elementales o iones metálicos son apenas solubles en medios acuosos. Esta falta de solubilidad limita su utilidad como especie redox para equilibrar las reacciones redox en un sistema de análisis electroquímico. La solubilidad de los metales o iones metálicos escasamente solubles se puede aumentar mediante puentes o coordinación con ligandos.

[0092] Típicamente, el metal en un complejo organometálico de transición o un complejo de coordinación con metal de transición es la fracción del complejo que resulta efectivamente reducida u oxidada durante el uso de la tira reactiva. Por ejemplo, el hierro central en el ferroceno $[\text{Fe}(\text{II})(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$ y en el ferrocianuro iónico $[\text{Fe}(\text{II})(\text{CN})_6]^{4-}$ está en el estado formal de oxidación +2, en tanto que el ferricianuro iónico $[\text{Fe}(\text{III})(\text{CN})_6]^{3-}$ contiene hierro en su estado formal de oxidación +3. En conjunto, el ferrocianuro y el ferricianuro forman un par redox. Según el tipo de oxidorreductasa presente en la capa de reactivo del electrodo de trabajo, cualquiera de los dos complejos metálicos puede funcionar como la especie redox soluble en la capa de reactivo en el contraelectrodo. Un ejemplo de par redox que contiene complejos de coordinación con metal de transición es la combinación de las dos especies de rutenio hexamina, $[\text{Ru}(\text{III})(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ y $[\text{Ru}(\text{II})(\text{NH}_3)_6]^{2+}$.

[0093] La especie redox soluble tiene capacidad de formar un par redox durante el uso de la tira reactiva electroquímica. La especie de este par redox que está presente en la capa de reactivo **36** en el contraelectrodo **30**, denominada la primera especie, preferiblemente está presente en mayor cantidad molar que su especie de contraparte (es decir, la segunda especie) del mismo par redox. Preferiblemente, la relación molar entre la primera especie y la segunda especie es de por lo menos 1,2:1. Más preferiblemente, la relación molar entre la primera especie y la segunda especie es de por lo menos 2:1. Más preferiblemente aún, la relación molar entre la primera especie y la segunda especie es de por lo menos 10:1 o de por lo menos 100:1. En un aspecto especialmente preferente de la presente invención, la segunda especie del par redox está presente en una cantidad máxima de 1 parte por mil (ppt) o

como máximo de 1 parte por millón (ppm), antes del uso de la tira reactiva en un análisis.

[0094] Preferiblemente, la especie redox soluble se solubiliza en la muestra y se mezcla con el analito y otros componentes de la muestra. La especie redox soluble, con el tiempo, se mezcla con la enzima y el mediador, si bien esta mezcla puede no producirse en grado apreciable para ser medible durante el transcurso del análisis. La especie redox soluble no está separada de la muestra líquida por una barrera mecánica ni está separada de la muestra líquida por encontrarse en una fase separada que es distinta de la muestra líquida.

[0095] En una realización preferente, se elige una especie redox soluble que tiene un potencial de reducción estándar de +0,24 voltios o más contra el electrodo estándar de hidrógeno (SHE). En otra realización preferente, se elige una especie redox soluble que tiene un potencial de reducción estándar de +0,35 voltios o más contra el SHE. En otra realización preferente más, se elige una especie redox que tiene un potencial de reducción de aproximadamente +0,48 voltios contra el SHE (en HCl 0,01 M).

[0096] Por lo tanto, para preparar un sensor analítico electroquímico se puede usar una amplia variedad de combinaciones de oxidorreductasas, mediadores y especies redox solubles. El uso de especies redox solubles que tienen números de oxidación mayores o menores en relación con su especie de contraparte en el par redox está dictado por el tipo de reacción a realizar en el electrodo de trabajo.

[0097] En un ejemplo, el analito sufre oxidación por interacción con una oxidasa o una dehidrogenasa. En este caso, la especie redox más concentrada en el

contraelectrodo tiene el número de oxidación más alto. Un ejemplo específico de esta situación es el análisis de glucosa usando glucosa oxidasa o glucosa dehidrogenasa. En otro ejemplo, el analito sufre reducción por interacción con una reductasa. En este caso, la especie redox más concentrada en el contraelectrodo tiene el número de oxidación más bajo. En cualquiera de estos ejemplos el mediador puede ser la misma sustancia que la especie redox más concentrada en el contraelectrodo o la especie redox del otro par redox.

[0098] La FIG. 3 es el diagrama de una vista superior de la base del sensor **10**, que incluye los conductores **12** y **14** bajo una capa dieléctrica **40**, y los electrodos **20** y **30**. La capa dieléctrica **40** puede cubrir parcialmente los electrodos **20** y **30** y puede estar hecha con cualquier capa dieléctrica adecuada, tal como un polímero aislante. La capa dieléctrica **40** puede aislar las porciones de los electrodos que están en contacto con la primera y la segunda capa de reactivo **26** y **36** de las porciones de los electrodos que están en contacto con los conductores **12** y **14**. La capa dieléctrica **40**, cuando está presente, puede ser depositada en la base del sensor **10** antes, durante o después de revestir los electrodos **20** y **30** con las capas de reactivo **26** y **36**, respectivamente.

[0099] Los electrodos **20**, **30** pueden estar revestidos con las capas de reactivo **26**, **36** usando cualquier medio conveniente, tal como impresión, deposición líquida o deposición con chorro de tinta. En un aspecto, la capa de reactivo se deposita en los electrodos **20**, **30** mediante impresión. A igualdad de los demás factores, la inclinación de la hoja impresora puede afectar en forma inversa el espesor de la capa de reactivo que se encuentra en los electrodos **20**, **30**. Por ejemplo, cuando la hoja se mueve con una inclinación de aproximadamente 82°

respecto de la base del sensor **10**, la capa o capas de reactivo resultantes pueden tener un espesor de aproximadamente 10 μm . De modo similar, cuando se utiliza la hoja con una inclinación de aproximadamente 62° respecto de la base del sensor **10**, se puede obtener una capa de mayor espesor, de 30 μm . En este aspecto, inclinaciones menores resultan en capas de reactivo de mayor espesor. Además de la inclinación de la hoja, hay otros factores que afectan el espesor resultante de las capas de reactivo **26**, **36**, incluyendo el espesor del material que forma la capa de reactivo.

[00100] Las FIGS. 4-6 son vistas superiores de tiras reactivas con tres electrodos, donde cada una tiene la base del sensor **10**, el electrodo de trabajo **20**, el contraelectrodo **30**, los conductores **12** y **14**, un conductor **13**, y un tercer electrodo **70**. El tercer electrodo **70** puede estar en comunicación eléctrica con el dispositivo de medición (no se muestra) a través del conductor **13**.

[00101] El dispositivo de medición puede medir un potencial eléctrico que circula entre el electrodo de trabajo **20**, el tercer electrodo **70**, y una muestra (no se muestra) que establece comunicación eléctrica entre los electrodos. En otro aspecto, el dispositivo de medición puede aplicar y medir un potencial eléctrico suministrado al electrodo de trabajo **20**, al tercer electrodo **70** y a la muestra. La base del sensor **10** puede tener otras configuraciones, incluyendo configuraciones con mayor o menor número de componentes, tal como se conoce en la técnica.

[00102] La FIG. 7 es el diagrama de una vista inferior de la base del sensor **10** de la FIG. 5 que muestra el tercer electrodo optativo **70**. En un aspecto, el tercer electrodo optativo **70** puede ser un electrodo de referencia verdadero. En otro aspecto, el tercer electrodo **70** puede estar recubierto con

una tercera capa de reactivo **76** que incluye una especie redox soluble. Puede haber una superficie conductora **74** del tercer electrodo optativo en un tercer conductor principal **72**. En un aspecto, el tercer conductor principal **72** incluye una lámina metálica, mientras que la superficie conductora **74** incluye una o más capas de polvo de carbón conductor. La tercera capa de reactivo **76** y la segunda capa de reactivo **36** pueden incluir los mismos constituyentes o tener constituyentes diferentes, según el uso para el que esté prevista. En un aspecto, la tercera capa de reactivo **76** es una porción de la segunda capa de reactivo **36**, que es depositada en los conductores principales **32** y **72**.

[00103] Cuando la superficie conductora **74** se deposita en el conductor principal **72**, se prefiere que el material en el que está hecha la superficie conductora sea un material conductor no ionizante. Cuando el conductor principal **72** se utiliza sin capa separada de superficie conductora **74**, se prefiere que el material conductor con el que está hecho el conductor principal sea no ionizante. Más preferiblemente, la porción del tercer electrodo **70** en contacto con la tercera capa de reactivo **76** (el conductor principal **72** o la superficie conductora **74**) es un material no ionizante. La tercera capa de reactivo **76** puede incluir los mismos constituyentes que la primera y la segunda capa de reactivo **26** (no se muestra) y **36**. En otro aspecto, la tercera capa de reactivo **76** puede incluir los mismos constituyentes que la segunda capa de reactivo **36**. En otro aspecto más, la tercera capa de reactivo **76** puede incluir ingredientes que estén específicamente adaptados para aumentar el libre flujo de electrones entre la muestra que se está analizando y el tercer conductor principal **72**.

[00104] La capa de reactivo **76** puede contener una especie redox soluble, como se describió anteriormente en relación con la FIG. 2. Preferiblemente, la capa de reactivo **76** del tercer electrodo **70** tiene una composición idéntica a la de la capa de reactivo **36** del contraelectrodo **30**. Si las capas de reactivo en el tercer electrodo y el contraelectrodo son idénticas, puede resultar deseable recubrir ambos electrodos con una única porción de la composición de la capa de reactivo.

[00105] El uso del tercer electrodo **70** puede ser deseable en ciertas aplicaciones. El aumento de la exactitud del voltaje aplicado puede aumentar la exactitud de la medición del analito. Cuando se usa el tercer electrodo **70**, es posible también reducir el tamaño del contraelectrodo **30** o aplicar menor cantidad de la especie redox al contraelectrodo. Si el tercer electrodo **70** está posicionado antes del contraelectrodo **30**, como se ilustra en la FIG. 6, puede ser posible detectar si la cantidad de muestra aplicada en la tira es insuficiente, situación que se denomina "subllenado". La detección del subllenado puede ocurrir cuando hay muestra suficiente para cerrar el circuito entre el electrodo de trabajo **20** y el tercer electrodo **70**, pero no alcanza para cubrir el contraelectrodo **30**. La ausencia de corriente eléctrica en la celda se puede convertir electrónicamente en una señal para el usuario, indicándole que debe añadir más muestra a la tira.

[00106] La FIG. 8 es la vista en perspectiva de una tira reactiva armada **800** que incluye la base del sensor **10**, recubierta al menos en parte por una cubierta **50** que incluye un conducto de ventilación **54**, una superficie cóncava **52**, y una abertura de entrada **60**. Preferiblemente, la cubierta **50** cubre las

capas de reactivo **26** y **36** (no se muestra) pero no entra en contacto con ellas, formando un espacio **56** entre la cubierta **50** y los electrodos.

[00107] Una muestra biológica se puede transferir a los electrodos introduciendo la muestra líquida en la abertura **60** de la tira reactiva **800**. El líquido llena el espacio **56** a la vez que expulsa el aire contenido previamente en el espacio **56** a través del conducto **54**. De esta forma, la muestra pone en comunicación eléctrica a los electrodos. El espacio **56** puede contener una sustancia (no se muestra) que ayuda a retener la muestra líquida en el espacio inmovilizando la muestra y sus contenidos en el área sobre los electrodos. Ejemplos de dichas sustancias incluyen polímeros que se expanden con el agua, tales como carboximetil celulosa y polietilenglicol; y matrices poliméricas porosas, tales como dextran y poliacrilamida.

[00108] Si una muestra introducida por la abertura **60** contiene un analito para la oxidorreductasa, la reacción redox entre el analito y la enzima puede comenzar una vez que las capas de reactivo entran en contacto con la muestra. Los electrones producidos o consumidos en la reacción redox resultante se pueden cuantificar aplicando un potencial eléctrico (es decir, voltaje) entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, y midiendo la corriente. Esta medición de la corriente se puede correlacionar con la concentración del analito en la muestra, siempre que el sistema haya sido calibrado con muestras similares que tienen cantidades conocidas del analito.

[00109] Como alternativa, el tercer electrodo **70** (FIGS. 4-7) se puede usar para monitorear el voltaje aplicado. Toda desviación del valor deseado del potencial eléctrico puede enviar una señal de retroalimentación al circuito a través del tercer electrodo para regular correctamente el voltaje. Un dispositivo

de medición preferiblemente contiene la circuitería y los microprocesadores necesarios para suministrar información de utilidad, tal como la concentración del analito en la muestra, la concentración del analito en el organismo del paciente o la concentración correspondiente a otra sustancia relacionada con el analito medido.

[00110] Una vez introducida la muestra por la abertura **60**, la muestra comienza a solubilizarse y a reaccionar con las capas de reactivo **26**, **36** y, optativamente, **76**. Puede ser ventajoso contemplar un "período de incubación" durante el cual los reactivos convierten una porción del analito en una especie medible antes de la aplicación de un potencial eléctrico. Aunque se puede utilizar un período de incubación más prolongado, preferiblemente el voltaje se aplica inicialmente a la tira reactiva **800** al mismo tiempo o inmediatamente después de la introducción de la muestra por la abertura **60**. Se puede encontrar un tratamiento más detallado de los períodos de incubación en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.620.579 y 5.653.863.

[00111] El voltaje aplicado inicialmente se puede mantener durante un tiempo establecido, como alrededor de 10 segundos en una tira reactiva convencional, para luego interrumpirlo. Posteriormente, puede no aplicarse voltaje alguno durante un tiempo de retardo establecido, tal como alrededor de 10 segundos en una tira reactiva convencional. Transcurrido este tiempo de retardo, se puede aplicar un potencial constante o un "impulso de lectura" a través del electrodo de trabajo y el contraelectrodo de la tira reactiva para medir la concentración del analito. En sensores amperométricos convencionales, este impulso de lectura se aplica mientras se monitorea la corriente para un tiempo de lectura entre 5 y 10 segundos. Teniendo en cuenta el volumen de la muestra

contenida en el espacio 56, un impulso de lectura de 5 a 10 segundos es relativamente prolongado.

[00112] A diferencia del impulso de lectura convencional de 5 a 10 segundos, cuando el electrodo de trabajo 20 (FIG. 2) se configura con la DBL de la presente invención, se prefieren tiempos de lectura más cortos. Las FIGS. 9A y 9B muestran un electrodo de trabajo 900 que tiene una superficie conductora 930 y una DBL 905 durante la aplicación de impulsos de lectura largos y cortos. Se coloca una muestra (no se muestra) en el electrodo de trabajo 900 e incluye glóbulos rojos 920 que se encuentran en la DBL 905, especies medibles externas 910 que se encuentran en la muestra, y especies medibles internas 915 que se encuentran dentro de la DBL 905.

[00113] Como se muestra en la FIG. 9A, cuando se aplica un impulso de lectura largo, de 10 segundos, al electrodo de trabajo 900, en la superficie de la superficie conductora 930 se miden tanto las especies medibles externas como internas 910 y 915 por un cambio de su estado de oxidación. Durante este proceso de medición, la especie medible externa 910 se difunde a través de la región de la muestra donde se encuentran los glóbulos rojos 920 y a través de la DBL 905 para ser medida en la superficie 930. Como se describió anteriormente, esta difusión de las especies medibles 910 a través de los glóbulos rojos 920 durante la medición da lugar al efecto hematocrito.

[00114] Asimismo, un impulso de lectura largo aplicado a una tira que tiene una DBL, como se muestra en la FIG. 9A, actúa en forma similar a la de un impulso de lectura corto aplicado a una tira sin DBL. La similitud surge del hecho de que las especies medibles se difunden a través de los glóbulos rojos antes de ser medidas en la superficie conductora durante el impulso de lectura.

En ambos casos, una porción sustancial de la especie medida durante el impulso de lectura se origina en la muestra ensayada.

[00115] A diferencia de la FIG. 9A, la FIG. 9B representa la situación en que se aplica un impulso de lectura corto a la tira reactiva **900** que tiene la DBL **905** de acuerdo con la presente invención. En este caso, la especie medible interna **915** presente en la DBL **905** sufre un cambio en su estado de oxidación en la superficie **930**. Durante el impulso de lectura, sustancialmente la totalidad de las especies medibles **910** que se encuentran externas a la DBL **905** permanecen externas a la DBL o no se difunden sustancialmente a través de la DBL **905** para alcanzar la superficie conductora **930**. De este modo, la presente invención excluye sustancialmente de la medición las especies medibles externas **910**, midiendo en cambio la especie medible **915** que está en el interior de la DBL **905**.

[00116] Las FIGS. 10A y 10B son gráficos que ilustran el aumento de la exactitud de la medición cuando se combinan una DBL con un impulso de lectura corto de acuerdo con la presente invención. Se combinaron muestras de sangre entera con ferrocianuro en una dilución de 5:1 para representar una concentración de glucosa de base y se hizo la medición con un impulso de lectura de 1 segundo. De este modo, las muestras de sangre entera con valores iniciales del hematocrito de 20%, 40% y 60% quedaron diluidas a hematocritos de 16%, 32% y 48% (una reducción del 20% en los tres valores del hematocrito). Las líneas 20%, 40% y 60% representan la corriente medida en las muestras de sangre con hematocritos del 16%, 32% y 48%, respectivamente.

[00117] La FIG. 10A muestra las inexactitudes introducidas por el hematocrito y otros efectos obtenidas en una tira reactiva con conductor desnudo que carece de DBL. La inexactitud está representada como diferencia entre las líneas de hematocrito del 20% y 60% (amplitud total del sesgo por hematocrito) y representa la inexactitud máxima de la medición atribuible al efecto hematocrito. Valores menores del sesgo representan un resultado más exacto. Un desempeño similar se observó al usar una DBL con un impulso de lectura más largo, como se describió anteriormente en relación con la FIG. 9A.

[00118] A la inversa, la FIG. 10B muestra una marcada disminución de la distancia entre las líneas de calibración del 20% y 60% cuando se combina una DBL de acuerdo con la presente invención con un impulso de lectura de un segundo. Una DBL de polímero PEO y KCl al 10% (sin reactivos) distinta se imprimió sobre una superficie conductora como la usada para la FIG. 10A anterior. Sorprendentemente, la amplitud total del sesgo por hematocrito con la combinación DBL/impulso de lectura corto fue casi dos tercios inferior a la amplitud total del sesgo sin la DBL. Por lo tanto, la presente invención aumentó significativamente la exactitud de la medición, en comparación con el electrodo conductor desnudo convencional.

[00119] Sin que implique adherir a teoría alguna, se piensa que al limitar la duración del tiempo de lectura con respecto al espesor de la DBL, la presente invención puede aprovechar el fenómeno de la variabilidad de la velocidad de difusión de las especies medibles hacia los poros de la DBL, mientras que la velocidad de difusión de las especies medibles desde el volumen interior de la DBL hacia el exterior de la superficie conductora es constante. Se considera que el grado variable de la difusión al interior de la

DBL causado por la matriz de la sangre entera da origen al efecto hematocrito. Por lo tanto, los errores de medición (sesgo) introducidos por los constituyentes de la muestra, incluidos los glóbulos rojos, se pueden reducir limitando la medición sustancialmente a las especies medibles presentes en el volumen interno de la DBL, que se considera tienen una velocidad de difusión relativamente constante.

[00120] Las FIGS. 11A y 11B son gráficos en los que se muestra el aumento de la exactitud que se origina en una reducción de la duración del impulso de lectura cuando se utiliza una DBL. La FIG. 11A muestra que, sin la DBL, los sesgos con impulsos de lectura de 0,9; 5; 10 y 15 segundos son casi idénticos. Cualquiera sea la duración del impulso de lectura, los valores de la amplitud total del sesgo son ~40% y mayores (50% en promedio), debido a que la capacidad del mediador para alcanzar la superficie del conductor está afectada por los constituyentes de la muestra, incluidos los glóbulos rojos. En cambio, como se ilustra en la FIG. 11B, cuando se utiliza una DBL, el sesgo para el impulso de lectura de 0,9 segundos es generalmente menos de la mitad del sesgo observado con el impulso de lectura de 5 segundos y puede ser hasta 2,5 veces inferior al sesgo observado con un impulso de lectura convencional de 10 segundos, según sea la concentración de ferrocianuro.

[00121] Cuando se combinan con una DBL, se prefieren impulsos de lectura de menos de 5 segundos, más preferiblemente impulsos de lectura de menos de 3 segundos. En otro aspecto, se prefieren impulsos de lectura de 0,1 a 2,8 o de 0,5 a 2,4 segundos. En otro aspecto más, se prefieren impulsos de lectura de 0,05 a 2,8 o de 0,1 a 2,0 segundos. En la presente, son más preferibles impulsos de lectura de 0,8 a 2,2 o de 0,8 a 1,2 segundos, en tanto

se prefieren especialmente impulsos de lectura de 0,1 a 1,5 o de 0,125 a 0,8 segundos. El espesor de la DBL presente durante la aplicación del impulso de lectura se puede seleccionar de modo tal que, durante el impulso, las especies medibles externas a la DBL queden sustancialmente impedidas de difundirse hacia la superficie del conductor.

[00122] La FIG. 12 es una tabla que muestra la comparación de los resultados de sesgo para impulsos de lectura de 1 y 10 segundos obtenidos en múltiples análisis realizados con múltiples tipos de tiras reactivas con una DBL. La tabla indica los valores de amplitud total del sesgo para muestras de sangre entera que contienen 50, 100, 200 y 400 mg/dl de glucosa. Se consignan los valores absolutos del sesgo para las muestras con 50 mg/dl, mientras que para las muestras con 100, 200 y 400 mg/dl se indica el sesgo %. Los valores del sesgo para las diversas concentraciones se promediaron para los impulsos de lectura de 10 segundos y de 1 segundo. El impulso de lectura más corto, de 1 segundo, se tradujo en una reducción sustancial de los valores del sesgo en comparación con el impulso de lectura convencional de 10 segundos, con reducciones entre aproximadamente el 21 % y el 90%. El promedio de los 36 ensayos realizados dio una reducción del sesgo de aproximadamente el 50%. Por lo tanto, la combinación de una DBL con un impulso de lectura corto de acuerdo con la presente invención aumentó significativamente la exactitud de la medición.

[00123] Las FIGS. 13A-13C son gráficos que ilustran la capacidad de una tira reactiva que tiene una DBL para medir con exactitud la verdadera concentración de glucosa de una muestra utilizando a impulso de lectura corto. Los datos en las figuras se obtuvieron midiendo la corriente en soluciones de

sangre entera y plasma que contenían ferrocianuro como especie medible. Como las muestras de plasma no contienen glóbulos rojos, las mediciones en plasma no presentan las inexactitudes introducidas por el efecto hematocrito. A la inversa, las mediciones tomadas en las muestras de sangre entera incluyeron las inexactitudes introducidas por el efecto hematocrito.

[00124] La FIG. 13A correlaciona las mediciones en plasma y sangre entera obtenidas con un impulso de lectura de 1 segundo para una tira reactiva con conductor desnudo. La pendiente del trazado de correlación resultante es de solamente 0,43, indicando que, en promedio, se midió sólo el 43% de la especie medible presente en las muestras de sangre entera. Como comparación, la FIG. 13B correlaciona las mediciones en plasma y sangre entera obtenidas con un impulso de lectura de 1 segundo para una tira reactiva con una DBL. La pendiente del trazado de correlación resultante es sustancialmente mayor – 0,86 – indicando que se midió aproximadamente el 86% de la especie medible presente en las muestras de sangre entera. Por lo tanto, comparado con un conductor desnudo, un impulso de lectura corto combinado con una DBL de acuerdo con la presente invención puede mejorar en un 100% la medición versus la concentración real del analito en muestras de sangre entera.

[00125] La FIG. 13C ilustra que la disminución de la duración de los impulsos de lectura mejora el desempeño de la medición de las tiras reactivas equipadas con una DBL de acuerdo con la presente invención. El gráfico muestra los trazados de correlación para mediciones con impulsos de lectura de 1, 5, y 10 segundos tomadas en las muestras de sangre entera y plasma descriptas anteriormente en relación con las FIGS. 13A y 13 B. Los impulsos

de 1, 5, y 10 segundos tienen pendientes del trazado de correlación de 0,86; 0,78 y 0.71, respectivamente. Por lo tanto, las disminuciones de la duración del impulso de lectura redujeron las inexactitudes de las mediciones.

[00126] Cuando se emplea una combinación DBL/capa de reactivo, la duración del impulso inicial y el retardo afectan el espesor de la DBL durante el impulso de lectura que se aplica posteriormente. Como se describió más arriba, la combinación DBL/capas de reactivo se basa en un material ligante hidrosoluble que se solubiliza parcialmente en la muestra antes de la aplicación del impulso de lectura. El material ligante remanente que contiene el reactivo sirve como DBL.

[00127] Como la solubilización del material ligante comienza tan pronto la muestra es introducida por la abertura 60 (FIG.8), el tiempo que transcurre durante el impulso inicial y el retardo afecta la cantidad de la capa combinada que permanece en la superficie conductora durante el impulso de lectura. Por lo tanto, a fin de asegurar que quede suficiente material ligante en el conductor para actuar como una DBL eficaz, pueden resultar preferibles impulsos iniciales y retardos más breves.

[00128] Sin embargo, según sea la duración del impulso de lectura, hay un límite superior preferible para el espesor de la DBL, ya que el aumento del espesor de la DBL puede hacer que el sistema sensor no logre alcanzar el "estado estacionario" antes de la aplicación del impulso de lectura. Antes de que el sistema sensor alcance el estado estacionario, la concentración de la especie medible en la DBL no representa fielmente la concentración de la especie medible en la muestra. En un aspecto, esta discrepancia entre las

concentraciones de la especie medible en la DBL y en la muestra se puede atribuir a la variación del grado de rehidratación de la DBL.

[00129] Por lo tanto, si se aplican y registran impulsos de lectura antes de alcanzarse la condición de estado estacionario, la concentración medida de la especie medible puede no tener correlación con la que está presente en la muestra. Esta falta de correlación entre la concentración de la especie medible en la DBL y en la muestra puede introducir inexactitudes en la medición, anulando así el aumento de la exactitud que se obtiene al excluir de la medición las especies medibles externas a la DBL.

[00130] Las FIGS. 14A a 14F presentan los resultados obtenidos con múltiples concentraciones de glucosa al emplear espesores iniciales diferentes de una combinación DBL/capa de reactivo con impulsos de lectura sucesivos de 1 seg. Los datos se obtuvieron utilizando múltiples impulsos de lectura de 200 mV, con 1 segundo de duración cada uno y separados por intervalos de 0,5 segundos. La siguiente Tabla II presenta el espesor promedio aproximado de la combinación DBL/capa de reactivo y el tiempo aproximado hasta alcanzar el estado estacionario en cada figura. El comienzo aproximado del estado estacionario se puede observar cuando el último dato en el tiempo obtenido para un impulso de lectura individual representa el mayor de los valores de corriente de los datos en el tiempo obtenidos para cualquiera de los impulsos de lectura individuales.

[00131] De esta manera, en la FIG. 14F, el último dato en el tiempo (extremo derecho) ~1750 nA para el impulso de lectura iniciado a ~1,5 segundos establece que el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a los 2,5 segundos con la concentración de glucosa de 674,8 mg/dl.

111 ~~7~~

Figura	Espesor aproximado de la DBL/capa de reactivo, en μm	Tiempo aproximado hasta alcanzar el estado estacionario, en segundos
14A	30	> 10
14B	23	5,5
14C	16	4
14D	14	2,5
14E	12	2,5
14F	11	2,5
14G	1 a 2	1

Tabla II

[00132] Los datos de la Tabla II establecen que para un impulso de lectura de un segundo, precedido por un retardo de 0,5 segundos, el espesor promedio inicial de una combinación DBL/capa de reactivo es preferiblemente inferior a 30 o 23 micrones (μm) y más preferiblemente inferior a 16 μm . Los espesores promedio iniciales preferidos de una combinación DBL/capa de reactivo para usar con un retardo de 0,5 a 5 segundos y un impulso de lectura de 0,5 a 1,2 segundos son de 5 a 15 μm o de 11 a 14 μm . Los espesores promedio iniciales más preferidos de una combinación DBL/capa de reactivo para usar con un retardo de 0,5 a 5 segundos y un impulso de lectura de 0,05 a 2,8 segundos son de 1 a 15 μm o de 2 a 5 μm . De este modo, para un impulso de lectura de 0,8 a 1,2 segundos, estos espesores excluyen sustancialmente

27

las especies medibles de la superficie conductora durante el impulso de lectura, permitiendo que el sistema sensor alcance el estado estacionario.

[00133] Si bien el espesor inicial preferido de la capa de reactivo aplicada al conductor depende de la duración del impulso inicial, del tiempo de retardo y de la duración del impulso de lectura, para duraciones del impulso de lectura de menos de cinco segundos, se prefieren espesores de la capa de reactivo de 5 a 30 μm o de 11 a 20 μm . Asimismo, para impulsos de lectura con una duración de 1,5 segundos o menos, se prefieren espesores de la capa de reactivo de 1 a 10 μm o de 2 a 5 μm . El espesor promedio inicial deseado de una combinación DBL/capa de reactivo se puede seleccionar para una duración específica del impulso de lectura, como para el impulso de lectura de 1 segundo en la Tabla II, en base al momento en que se alcanza el estado estacionario.

[00134] En un aspecto, se prefieren tiempos del impulso inicial y de retardo de menos de 6 segundos. Son más preferibles tiempos del impulso inicial de 1 a 4 segundos y tiempos de retardo de 0,5 a 5 segundos. En un aspecto preferente, los tiempos del impulso inicial y de retardo se seleccionan de modo que por lo menos el 50% del espesor promedio inicial de la combinación DBL/capa de reactivo permanezca en la superficie conductora cuando se aplica el impulso de lectura. En otro aspecto, del 60 al 85% o del 70 al 80% del espesor promedio inicial de la capa combinada permanece en la superficie conductora cuando se aplica el impulso de lectura.

[00135] El espesor preferido de la DBL para una duración específica del impulso de lectura puede depender también de la naturaleza de la DBL. Cuanto más lentamente se desplace la especie medible a través de la DBL durante la



medición, menor será el espesor requerido de la DBL. No obstante, si la difusión de la especie medible a través de la DBL es excesivamente lenta, puede resultar difícil obtener el estado estacionario deseado. La velocidad a la que se difunde una especie medible a través de la DBL también se puede modificar con aditivos que afectan la fuerza iónica de la muestra ensayada y/o del interior de los poros de la DBL. En un aspecto, el aditivo puede ser una sal, como cloruro de sodio o de potasio, que está presente en la deposición solución/pasta en una concentración de 1 a 2 Molar. También se pueden usar otras sales y composiciones que afectan la fuerza iónica de la muestra ensayada, como es sabido por el especialista con un nivel de conocimientos ordinarios en el arte de la química.

[00136] Otra ventaja de medir las especies medibles en la DBL con un impulso de lectura de menos de 3 segundos es la reducción de la imprecisión de la medición derivada de la variación de los volúmenes de la muestra presentes en el espacio **56** de la tira reactiva **800** (FIG. 8). Si un impulso de lectura se mantiene más allá del tiempo en que sustancialmente la totalidad de la especie medible presente en el espacio **56** fue medida, la medición deja de representar la concentración de la especie medible en la muestra y pasa a medir la cantidad de especie medible en el espacio **56**, lo que constituye una medición muy diferente. A medida que se prolonga el impulso de lectura en relación al volumen del espacio **56**, la medición de la corriente depende del volumen del espacio **56**, y no de la concentración del analito. Por lo tanto, impulsos de lectura más prolongados pueden resultar en mediciones sumamente inexactas con respecto a la concentración del analito en los casos

en que la duración del impulso "sobrepasa" la especie medible presente en el espacio **56**.

[00137] En consecuencia, cualquier variación del volumen del espacio **56** presente en la tira reactiva electroquímica puede conducir a mediciones imprecisas porque la electrónica del dispositivo de medición aplica el mismo potencial y realiza los mismos cálculos en cada prueba. De este modo, con la misma muestra, una tira reactiva convencional que tenga un espacio de mayor volumen mostrará una concentración del analito más alta que una tira reactiva con un espacio de menor volumen si el impulso de lectura sobrepasa el volumen del espacio. Al limitar sustancialmente la medición a la especie medible presente en la DBL, la presente invención puede reducir la imprecisión introducida por tiras reactivas que tienen espacios de volúmenes diferentes. De esta manera se puede reducir el efecto que de otro modo las variaciones de fabricación de las tiras reactivas tendrían sobre los resultados de las mediciones.

[00138] La FIG. 15 compara la precisión entre tiras reactivas con DBL y espacios de volúmenes de 1, 3, 5 y 10 ml al aplicar impulsos de lectura de 1, 5, 10 y 15 segundos. La Tabla A presenta los datos obtenidos cuando un preimpulso de 2 segundos y un retardo de 4 segundos fueron seguidos por impulsos de lectura de 1, 5, 10 y 15 segundos. La Tabla B presenta los datos obtenidos cuando un preimpulso de 4 segundos y un retardo de 2 segundos fueron seguidos por impulsos de lectura de 1, 5, 10 y 15 segundos. Las variaciones entre pendientes e interceptos de las líneas de calibración para cada combinación de volumen del espacio y duración del impulso de lectura están expresadas como %-CV. Los valores %-CV de las tablas A y B muestran

que a medida que aumenta la duración del impulso de lectura, también lo hace la imprecisión de las mediciones, a causa de la variación del volumen del espacio. Para ambas secuencias de impulsos, la desviación entre volúmenes del espacio es mínima para el impulso de lectura de ~1 segundo y máxima para el impulso de lectura de 15 segundos. Estos resultados establecen nuevamente el beneficio de utilizar una DBL con un impulso de corta duración de acuerdo con la presente invención.

[00139] Además del efecto hematocrito y las variaciones de los volúmenes del espacio, cuando se mide la especie medible presente en el espacio 56 (FIG. 8), se pueden introducir errores positivos en la lectura del analito si la muestra líquida se mueve durante la medición. Este movimiento de la muestra puede hacer que pase analito nuevo a la región alrededor del electrodo de trabajo donde ya había un patrón de difusión constante, distorsionando así la medición. Al medir la especie medible interna en la DBL, que tiene una velocidad de difusión relativamente constante, empleando un impulso de lectura corto, a la vez que excluyendo sustancialmente de la medición las especies medibles externas a la DBL con velocidades de difusión diferentes, la presente invención puede reducir más los errores de medición introducidos por el movimiento de la muestra.

[00140] Aunque se han descrito diversas realizaciones de la invención precedente, será obvio para los expertos con conocimientos ordinarios de la técnica que podrán practicarse determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención. En consecuencia, la invención está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES:

1. Una tira reactiva electroquímica, que comprende: una base;
un primer electrodo en la base, donde el primer electrodo comprende al menos una primera capa en un primer conductor, donde la primera capa incluye una capa de reactivo; y
un segundo electrodo en la base,
donde el espesor de la primera capa se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el análisis de un analito detecta sustancialmente una especie medible dentro de la primera capa y no detecta sustancialmente las especies medibles por fuera de la primera capa.
2. La tira reactiva electroquímica de la reivindicación 1, donde la capa de reactivo incluye una enzima oxidoreductasa y un ligante.
3. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el segundo electrodo comprende la primera capa en un segundo conductor.
4. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la duración del impulso de lectura es inferior a 5 segundos.
5. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la duración del impulso de lectura es inferior a 3 segundos.
6. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la duración del impulso de lectura es de 0,05 segundos a 2,8 segundos.

7. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la duración del impulso de lectura es de 0,1 segundos a 1,5 segundos.
8. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el espesor promedio inicial de la primera capa es de por lo menos 1 μm .
9. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el espesor promedio inicial de la primera capa es inferior a 30 μm .
10. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el espesor promedio inicial de la primera capa es de 1 a 30 μm .
11. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el espesor promedio inicial de la primera capa es de 5 a 25 μm .
12. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde además el espesor promedio inicial de la primera capa en el primer conductor se selecciona de modo que por lo menos el 50% del espesor permanece en el conductor cuando se aplica el impulso de lectura.
11. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el espesor promedio inicial de la primera capa es de 5 a 25 μ .
12. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde además el espesor promedio inicial de la primera capa en el primer conductor se selecciona de modo que por lo menos el 50% del espesor permanece en el conductor cuando se aplica el impulso de lectura.
13. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde además el espesor promedio inicial de la primera capa en el primer

conductor se selecciona de modo que del 70 al 80% del espesor permanece en el conductor cuando se aplica el impulso de lectura.

14. Una tira reactiva electroquímica, que comprende:

una base;

un primer electrodo en la base, donde el primer electrodo comprende al menos una primera capa en un primer conductor, donde la primera capa incluye una capa de reactivo y una segunda capa entre el primer conductor y la primera capa; y

un segundo electrodo en la base, donde el espesor de la segunda capa se selecciona de modo que un impulso de lectura aplicado al primero y al segundo electrodo durante el análisis de un analito sustancialmente detecta una especie medible dentro de la segunda capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la segunda capa.

15. La tira reactiva electroquímica de la reivindicación 14, donde el espesor promedio inicial de la segunda capa es de por lo menos 1 μm .

16. La tira reactiva electroquímica de la reivindicación 14, donde el espesor promedio inicial de la segunda capa es de 5 a 25 μm .

17. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la segunda capa no incluye una cantidad sustancial de por lo menos uno entre la enzima oxidorreductasa y un mediador.

18. La tira reactiva electroquímica de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde la segunda capa incluye un material polimérico.

19. La tira reactiva electroquímica de la reivindicación 18, donde el material polimérico material incluye al menos uno entre poli(etilen óxido), carboxi metil

celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, sus derivados y sus combinaciones.

20. La tira reactiva electroquímica de la reivindicación 18, donde el material polimérico es parcialmente hidrosoluble.

21. Un método para aumentar la exactitud de la determinación cuantitativa del analito, que comprende:

introducir una muestra que contiene un analito que tiene un componente líquido en una tira reactiva electroquímica, donde la tira tiene una base, un primer conductor en la base, un segundo conductor en la base, y por lo menos una primera capa en por lo menos el primer conductor, donde la al menos una primera capa incluye una capa de reactivo que incluye un ligante y la muestra suministra comunicación eléctrica entre el primer conductor y el segundo conductor;

aplicar un potencial eléctrico entre el primer conductor y el segundo conductor en forma de un impulso de lectura, donde el impulso de lectura se aplica durante un tiempo que sustancialmente detecta una especie medible dentro de la primera capa y sustancialmente no detecta las especies medibles por fuera de la primera capa;

medir el impulso de lectura para suministrar un valor cuantitativo de la concentración del analito en la muestra con exactitud aumentada en relación con una tira reactiva electroquímica que sustancialmente detecta las especies medibles por fuera de la primera capa.

22. El método de la reivindicación 21, donde la exactitud aumentada resulta al menos en parte de una reducción de la inexactitud introducida en la

determinación de la concentración del analito por el efecto del movimiento del líquido.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, que comprende además aumentar la precisión de los valores cuantitativos de la concentración del analito entre una pluralidad de tiras reactivas electroquímicas, donde la muestra se encuentra en un espacio formado entre la base y una cubierta de cada tira reactiva, donde el espacio tiene un volumen que varía entre las tiras reactivas electroquímicas individuales de la pluralidad.

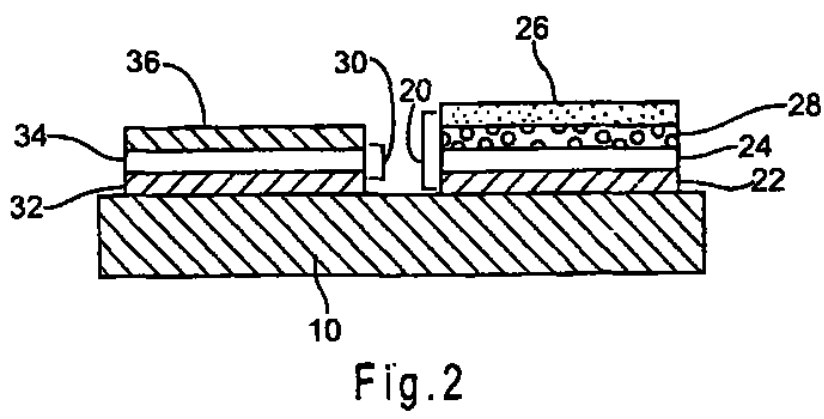
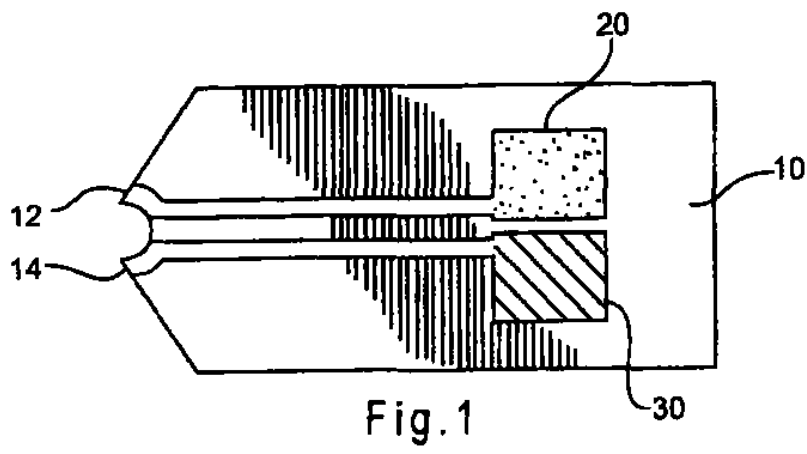
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, que comprende además aplicar un impulso inicial y un retardo antes del impulso de lectura.

25. El método de la reivindicación 24, donde el impulso inicial dura de 1 a 4 segundos.

26. El método de la reivindicación 24, donde el retardo dura de 2 a 4 segundos.

RESUMEN

La presente invención concierne a tiras reactivas electroquímicas y a métodos mejorados para determinar la concentración de un analito en una muestra. Al medir selectivamente una especie medible que se encuentra en una capa de barrera de difusión, con exclusión sustancial de las especies medibles que se encuentran por fuera de la capa de la barrera de difusión, se pueden reducir los errores de medición introducidos por constituyentes de la muestra, tales como los glóbulos rojos, y por las variaciones de fabricación.



2/14

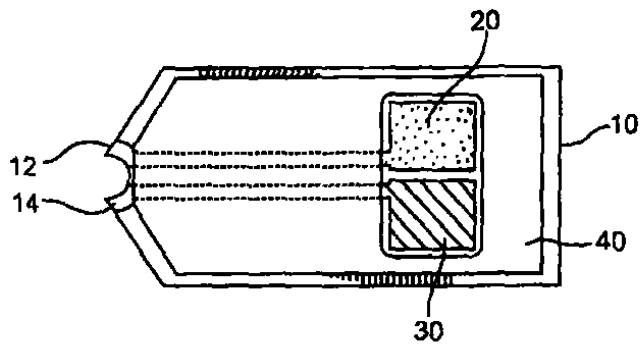


Fig. 3

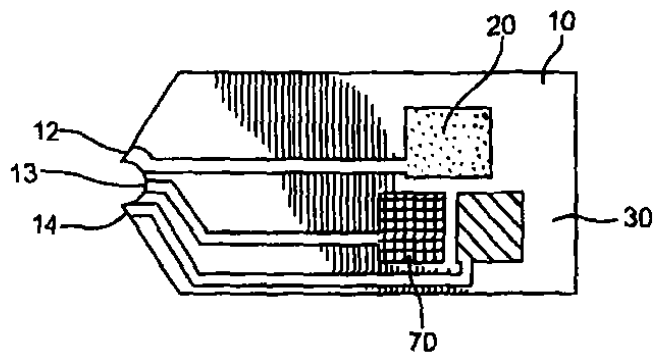


Fig. 4

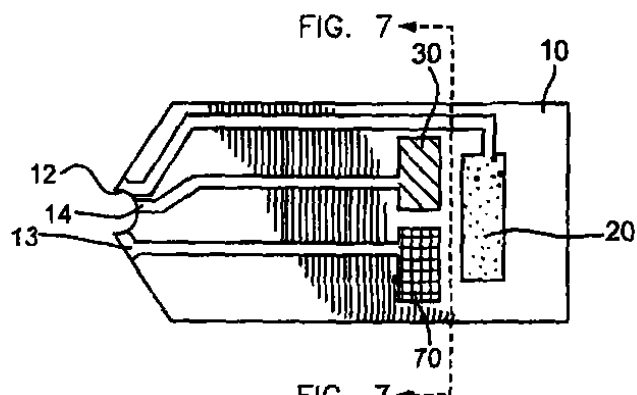


Fig. 5

3/14

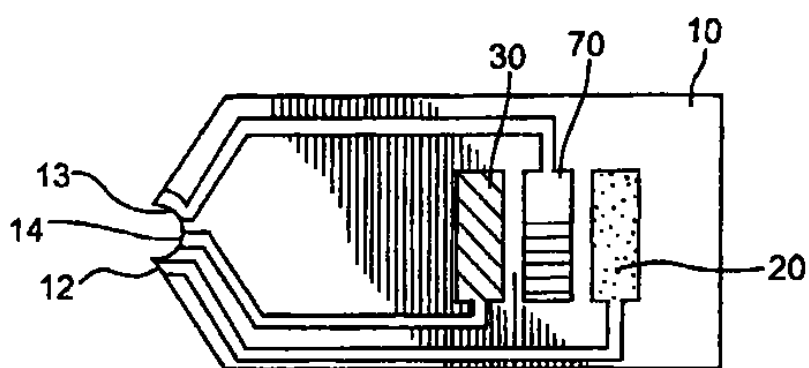


Fig. 6

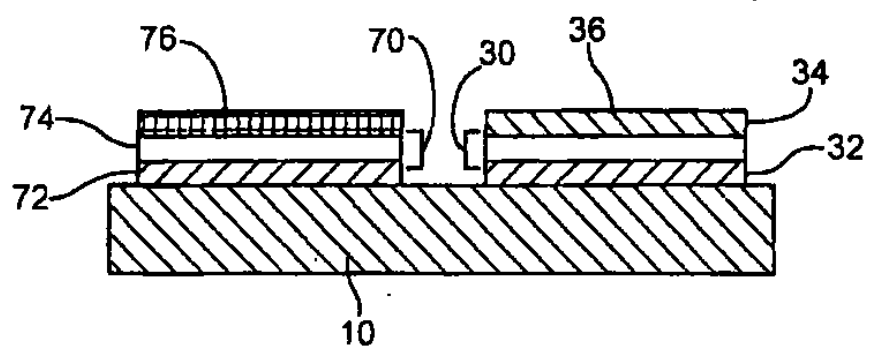


Fig. 7

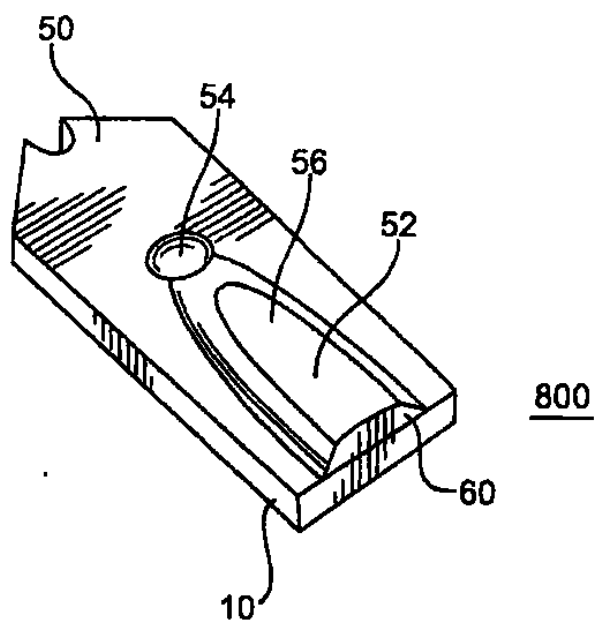


Fig. 8

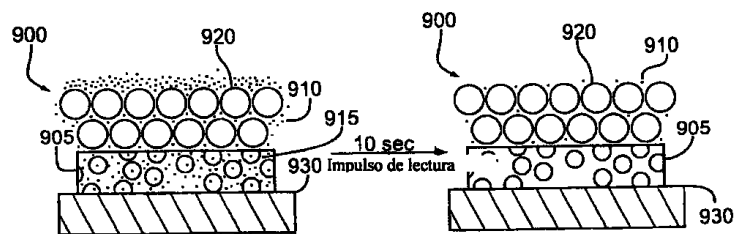


Fig. 9A

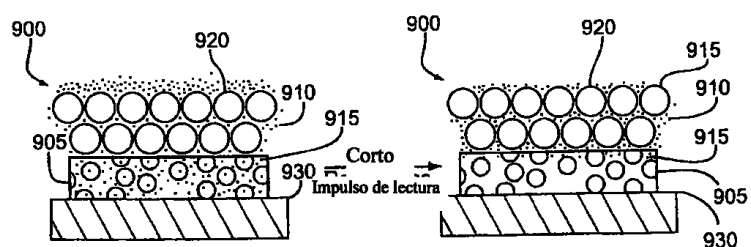


Fig. 9B

5/14

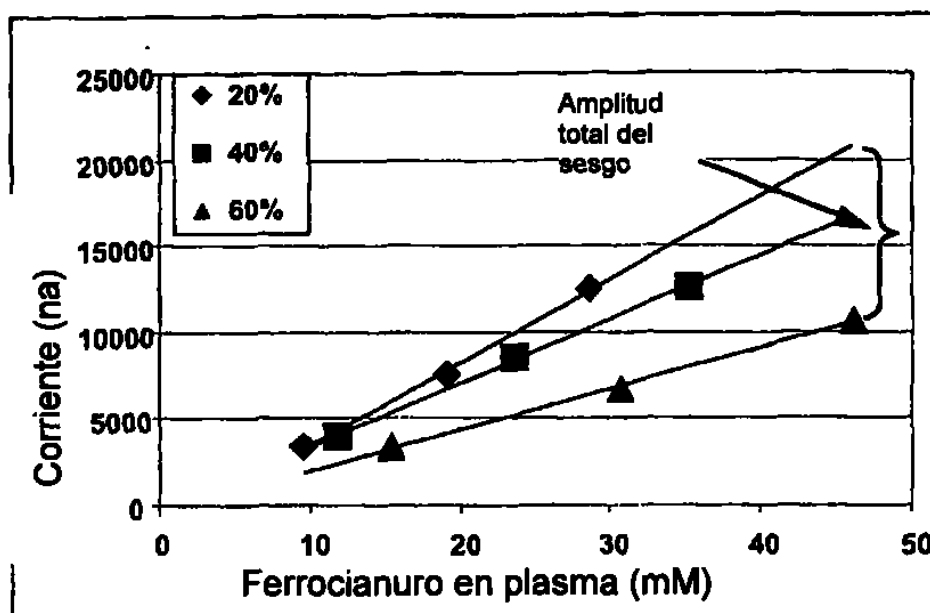


Fig.10A

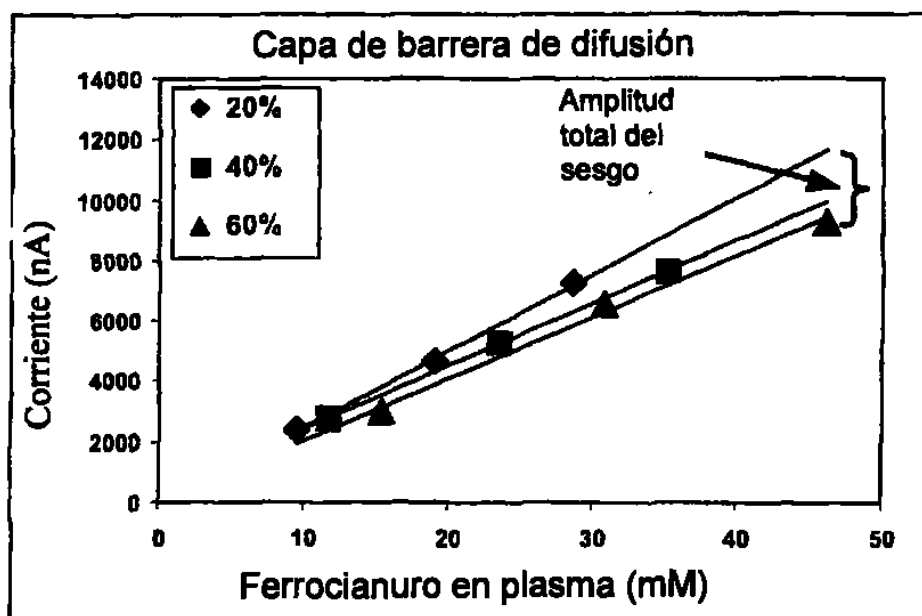


Fig.10B

6/14

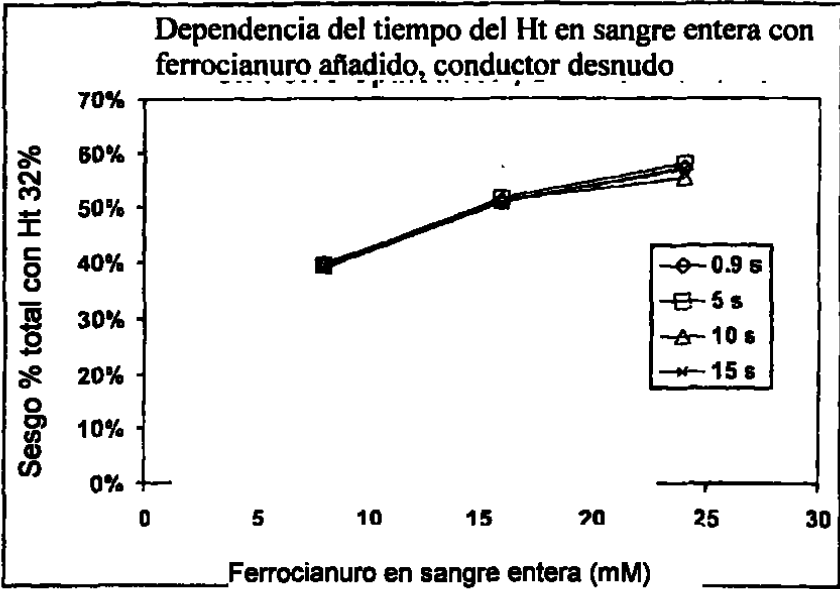


Fig.11A

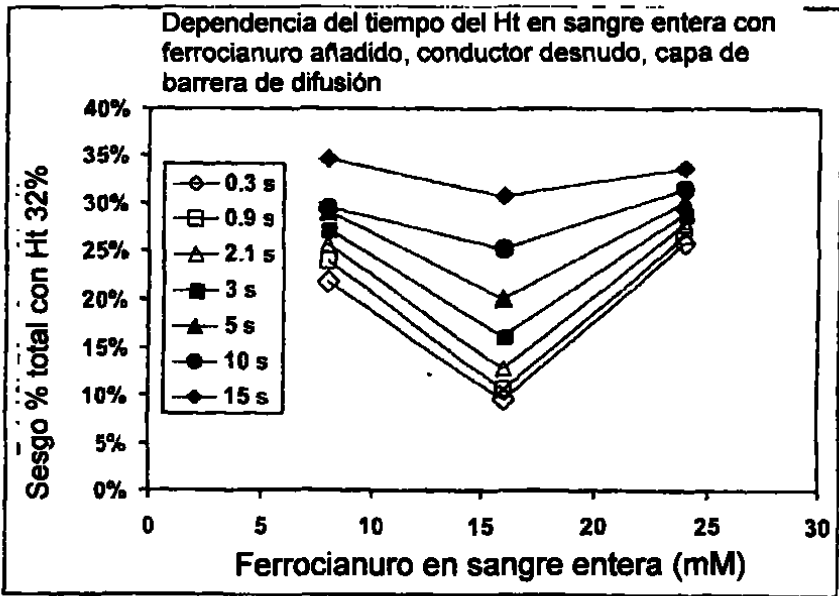


Fig.11B

8/14

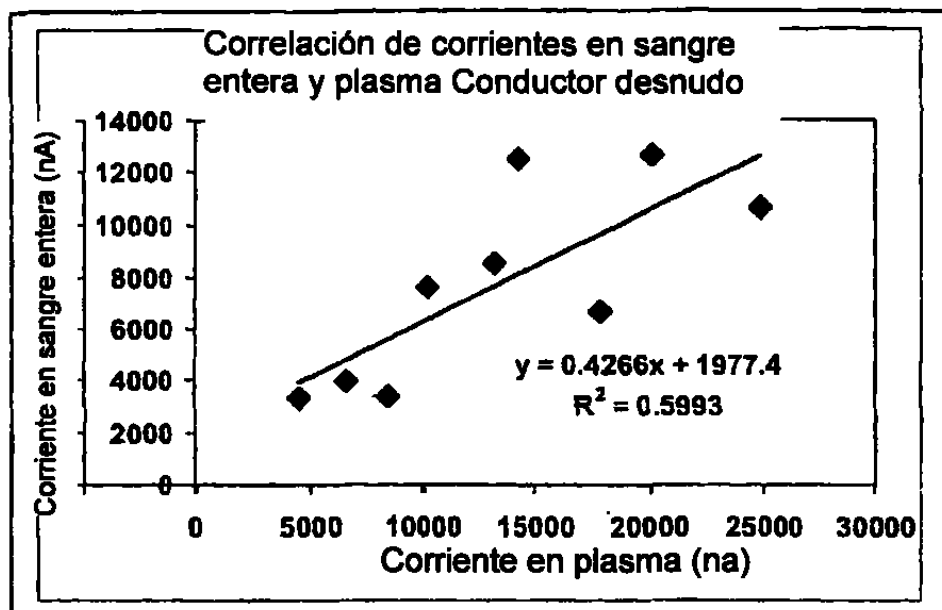


Fig.13A

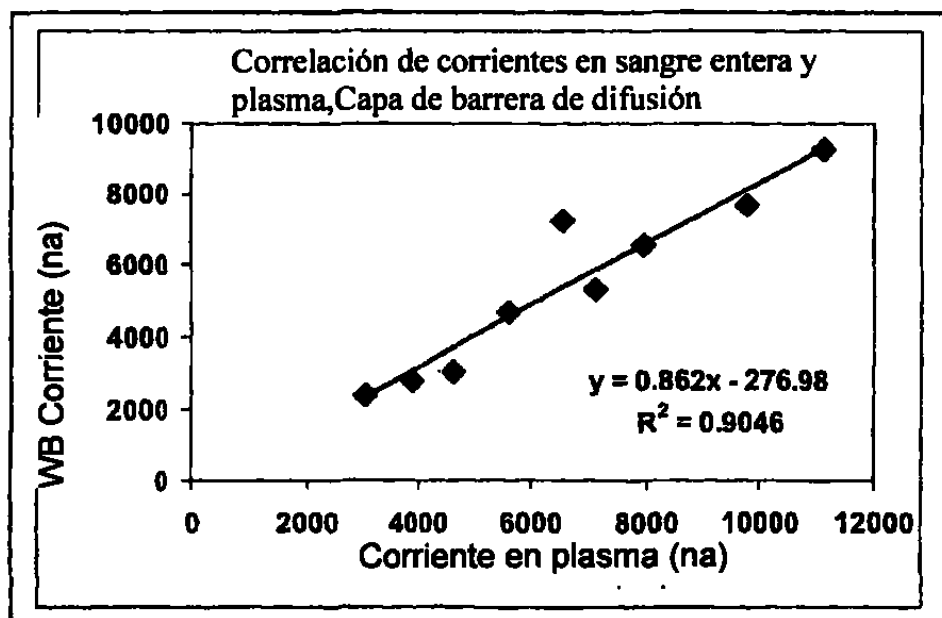


Fig.13B

9/14

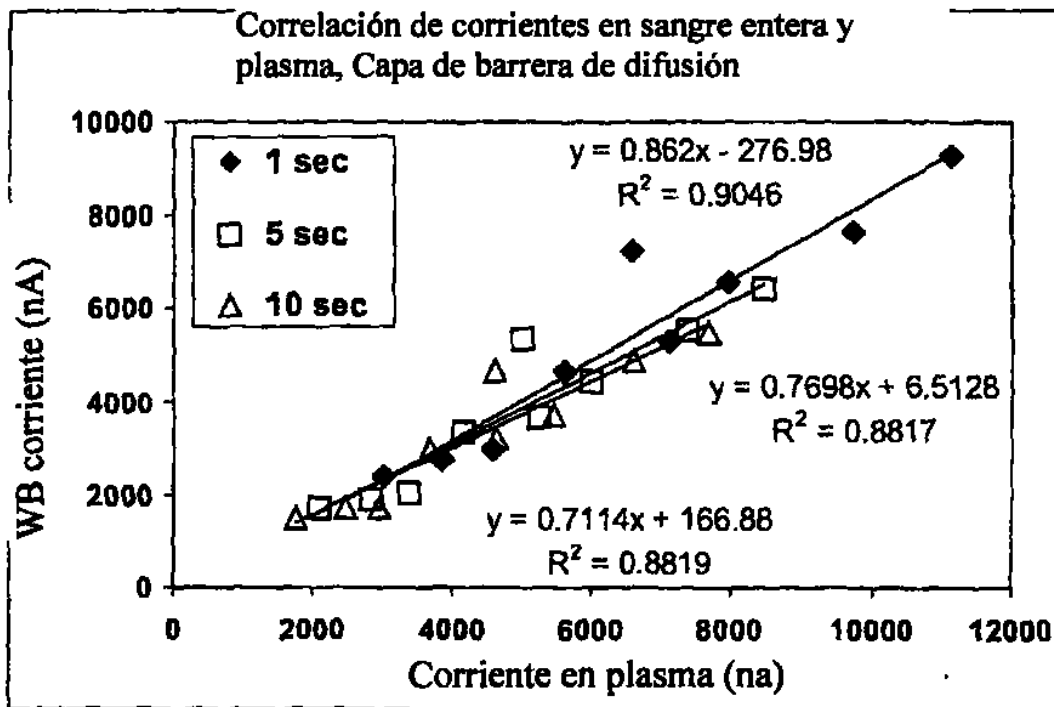


Fig.13C

10/14

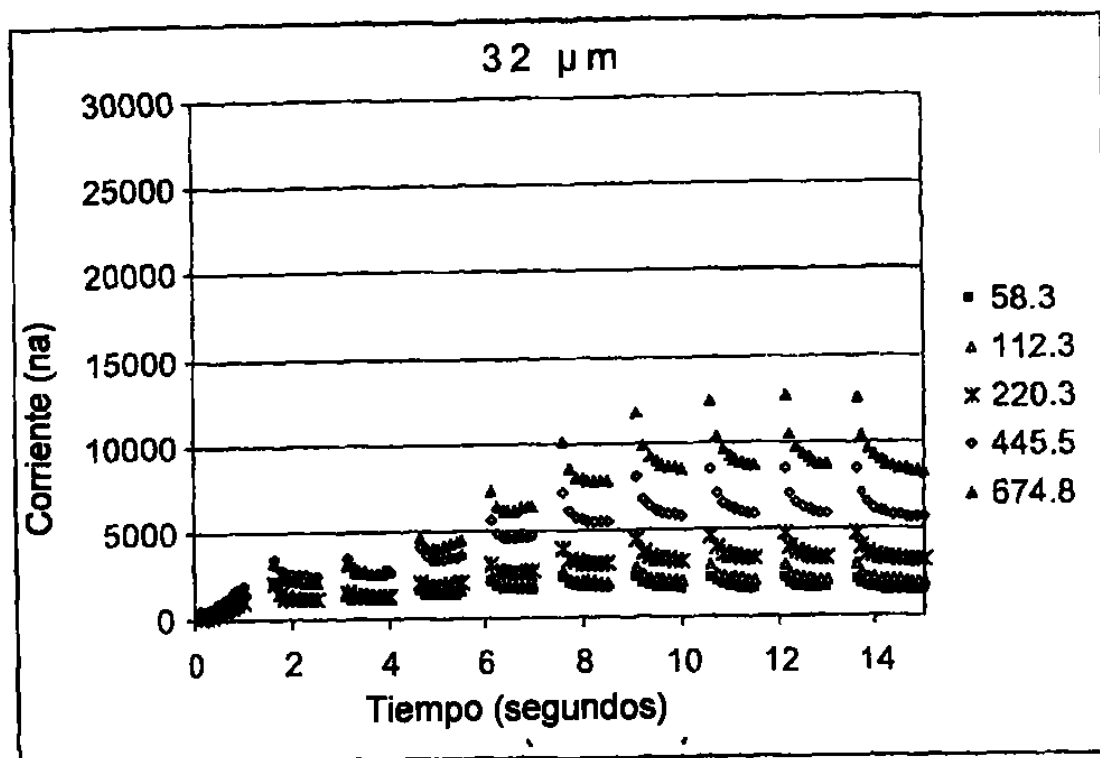


Fig.14A

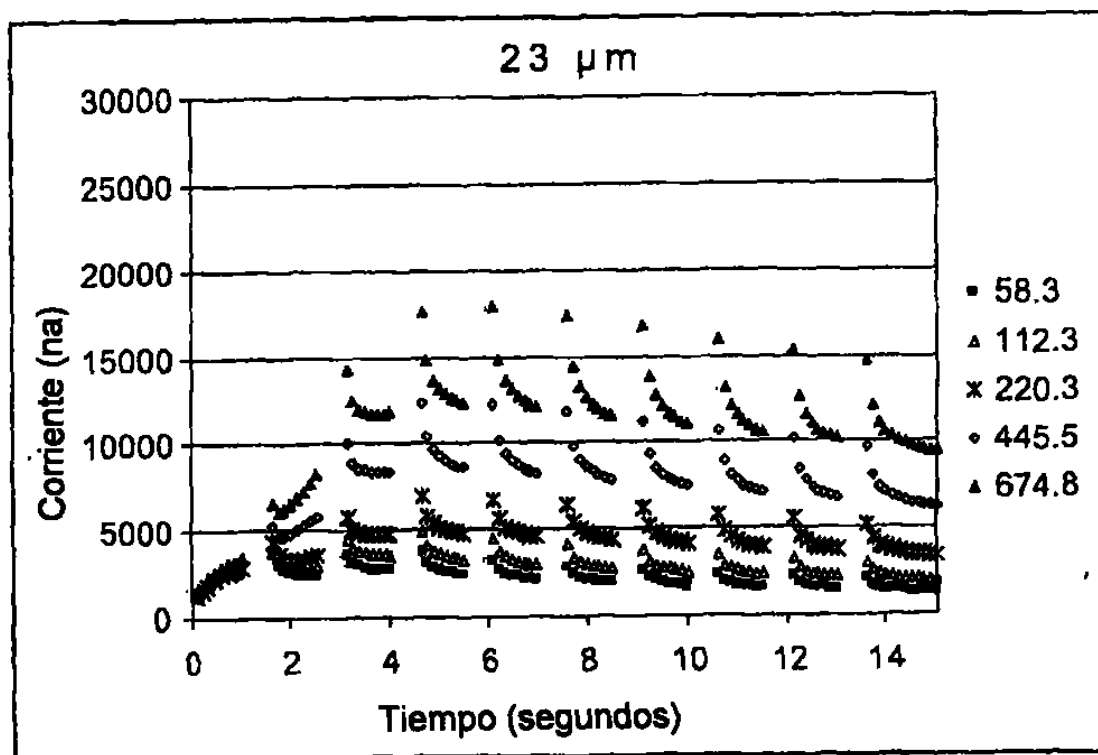


Fig.14B

11/14

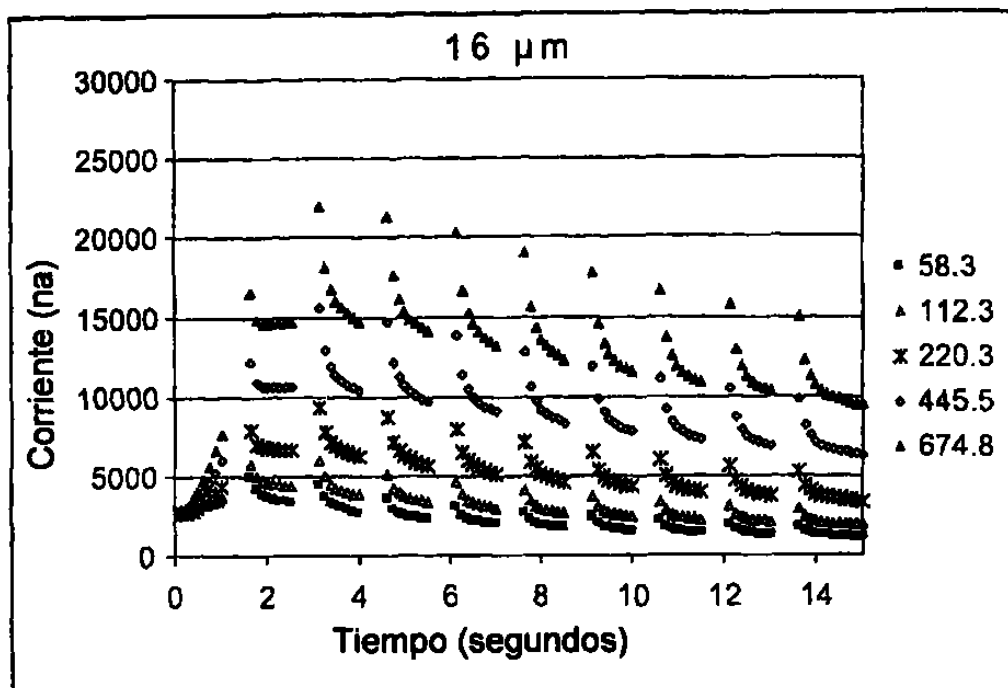


Fig.14C

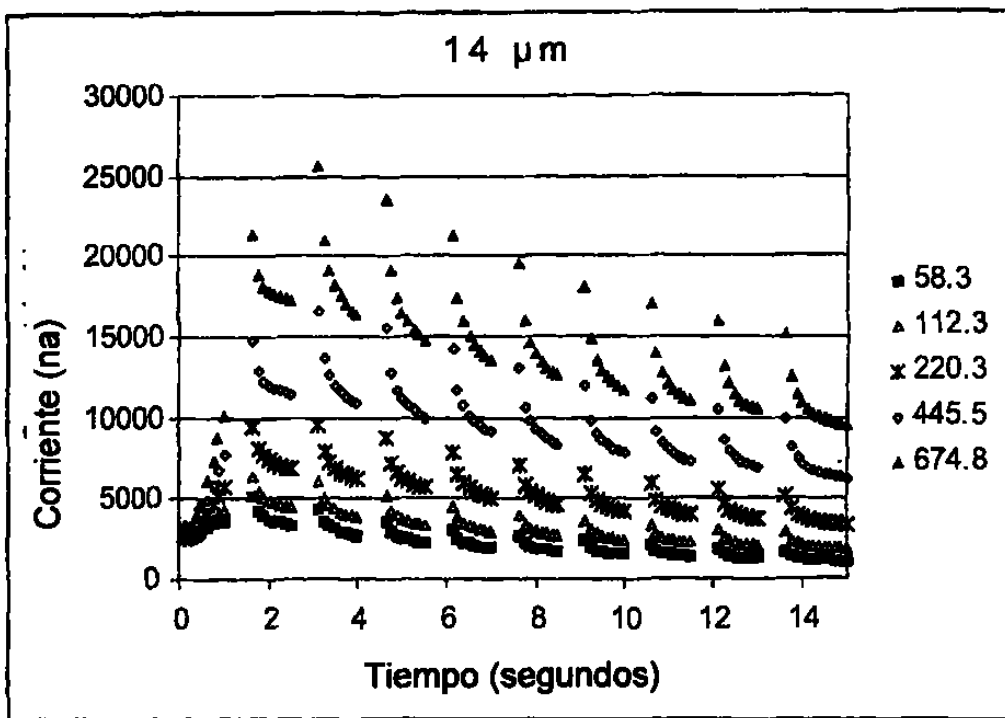


Fig.14D

12/14

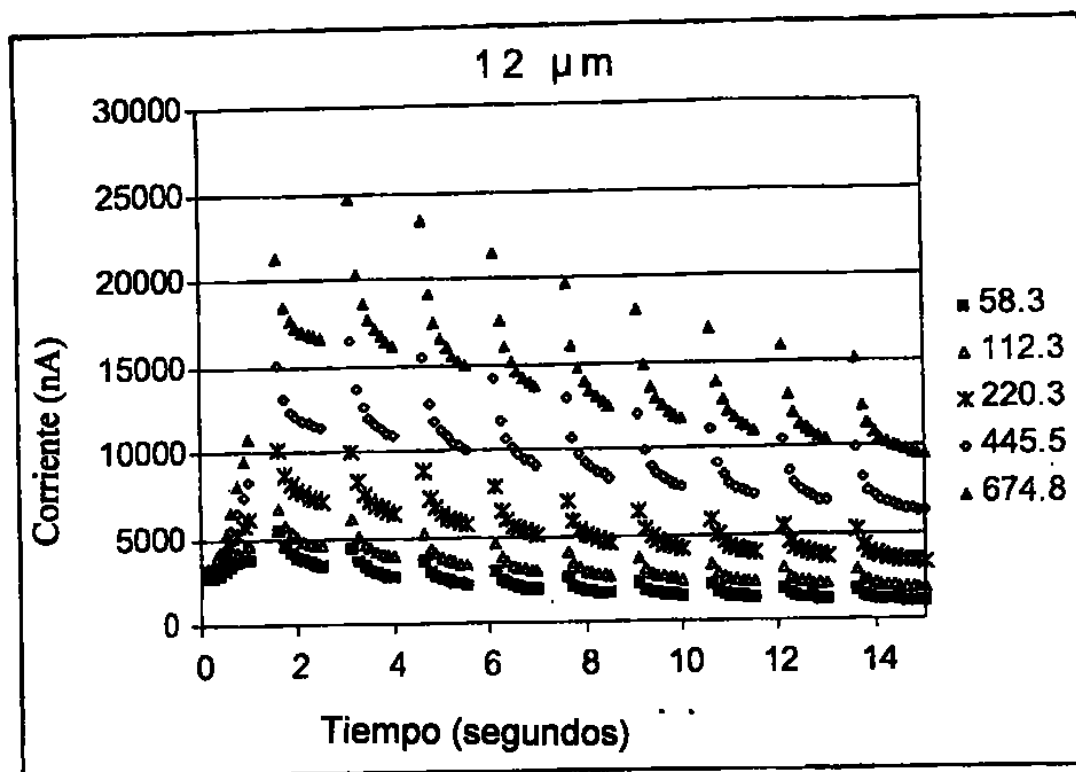


Fig.14E

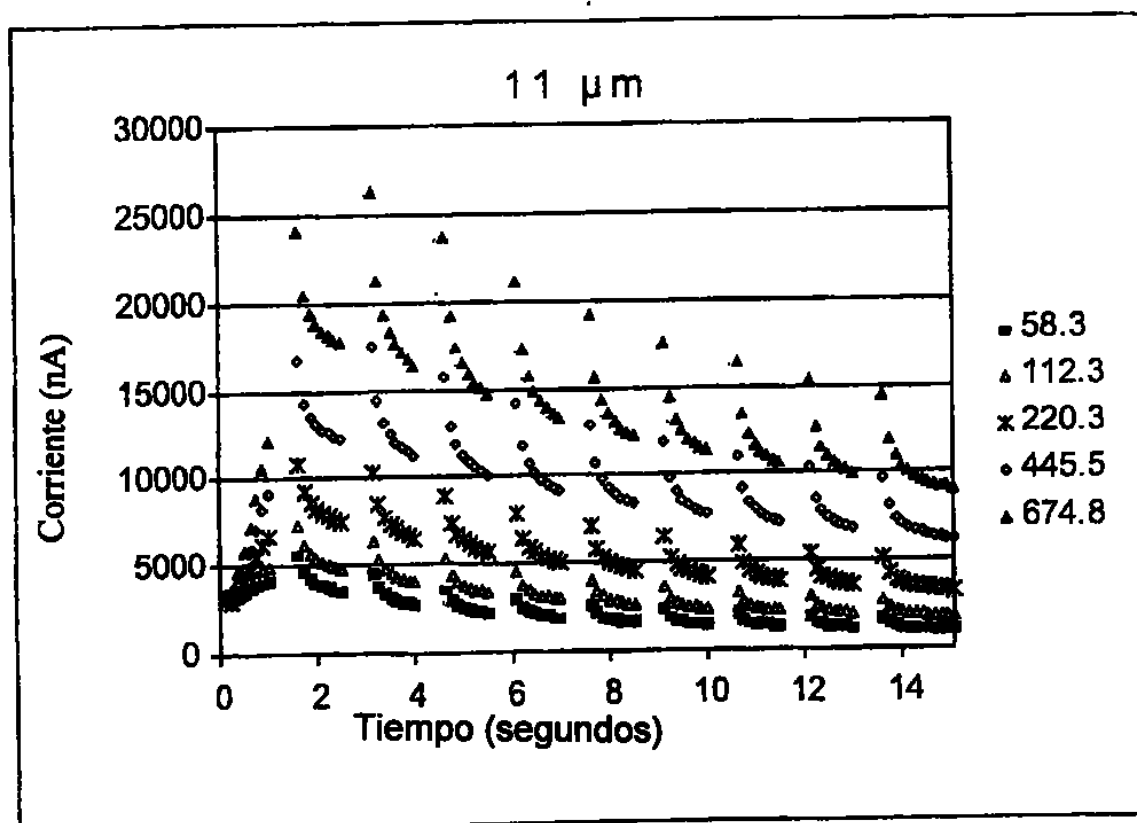


Fig.14F

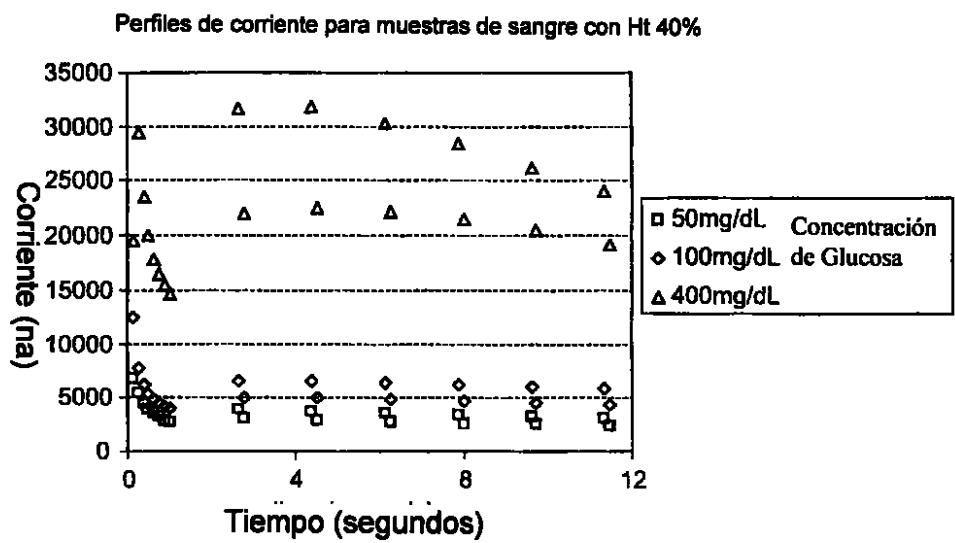


Fig.14G

Impulso de lectura de 10 segundos					Impulso de lectura de 1 segundo						Reducción del sesgo %
	50	100	200	400	Ava Sesgo	50	100	200	400	Ava Sesgo	
1	18.6	37.5		53.46	36.53	-2.4	15		23.06	11.9	67.44
2	2.6	6.8		42.85	17.4	-15.3	-4.9		41.6	7.1	58.96
3	26.2	35.3		34.6	32	9.3	11.2		28.8	16.4	48.63
4	19.8	33		32.2	28.4	-0.1	16		15.8	10.6	62.74
5	6.93	30.92		38.43	25.42	-15.27	17.2		5.27	2.4	90.57
6	26.02	51.79		72.36	50.05	3.45	26.54		44.06	24.68	50.69
7	28.84	46.97		73.86	49.89	10.69	30.08		55.69	32.15	35.56
8	6.42	35.02	54.5	57.55	38.37	-15.19	16.03	35.16	10.23	11.56	69.88
9	30.83	45.52	44.49	44.02	41.22	24.58	44.38	35.2	22.4	31.64	23.24
10	27.69	26.57	34.69	39.19	32.04	0.62	-12.9	22.03	28.54	9.57	70.12
11	47.81	50.62	61.12	59.21	54.69	11.94	15.76	31	40.58	24.82	54.62
12	43.04	71.63	71.02	65.64	62.83	18.2	33.74	36.35	44.89	33.29	47.01
13	16.08	13.19	47.69	52.52	32.37	-12.6	9.33	25.79	40.02	15.64	51.69
14	7.12	32.24	44.75	51.21	33.83	-11.46	9.08	30.96	40.68	17.32	48.82
15	-0.48	9.2	42.8	45.63	24.29	-11.84	2.46	38.14	38.79	16.89	30.47
16	16.65	32.87	40.72	30.68	30.23	0.88	12.18	21.8	33.71	17.14	43.3
17	-1.18	38.75	51.86	70.02	39.86	-27.27	12.67	24.16	47.27	14.21	64.36
18	56.88	93.75	78.6	77.14	76.59	23.36	45.99	42.02	46.07	39.36	48.61
19	23.79	35.17	47.23	57.69	40.97	-5.07	5.6	30.47	34.25	16.31	60.18
20	20.72	33.07	53.1	55.28	40.54	-14.11	5.56	31.84	39.14	15.61	61.5
21	18.19	21.19	33.42	39.41	28.05	-6.16	-1.94	18.72	36.75	11.84	57.78
22	22.31	22.09	37.74	39.99	30.53	-8.59	-7.56	33.71	54.01	17.89	41.39
23	58.53	51.14	33.52	30.27	42.87	26.7	15.94	37.49	56.05	34.05	20.58
24	38.63	57	56.52	56.57	52.18	13.35	13.92	30	37.49	23.69	54.6
25	-7.53	17.23	39.26	53.24	25.55	-29.85	3.52	29.79	46.04	12.38	51.57
26	38.26	53.5	57.71	56.42	51.47	7.58	18.87	28.72	34.02	22.3	56.68
27	-2.43	27.72	50.71	53.16	32.29	-15.9	3.56	35.95	42.93	16.63	48.48
28	40.41	55.55	46.16	51.23	48.34	6.35	15.17	25.73	41.91	22.29	53.89
29	17.1	32.74	58.15	67.64	43.91	-23.8	-0.67	44.21	55.16	18.72	57.35
30	8.92	30.32	32.7	48.09	30.01	-6.61	16.28	35.8	48.81	23.57	21.46
31	5.75	31.54	44.94	57.71	34.98	-29.54	30.31	42.45	56.01	24.81	29.09
32	0.25	5.7	11.11	26.79	10.96	-4.4	-1.72	1.69	27.09	5.66	48.33
33	1.19	2.87	5.66	10.87	5.15	-5.32	-0.28	-2.92	14.71	1.55	69.99
34	10.01	34.95	60.03	54.07	39.76	-2.53	17.58	46.25	41.26	25.64	35.51
35	27.66	38.11	80.72	84.21	57.67	12.68	15.69	57.99	61.93	37.08	35.72
36	7.88	7.51	43.07	38.97	24.36	0.1	-3.91	34.85	29.6	15.16	37.76
Prom.											50.24

Fig.12

Comparación de precisiones

A		Pendiente				Intercepto			
		1 seg	5 seg	10 seg	15 seg	1 seg	5 seg	10 seg	15 seg
2-4-x									
1 mil		17.625	11.696	9.521	8.042	1 mil	2426	1282.3	963.34
3 mil		17.835	11.965	10.013	8.8584	3 mil	2374.5	1226	894.65
5 mil		17.408	12.07	10.334	9.267	5 mil	2268	1147.5	779
10 nil		17.789	12.282	10.406	9.3369	10 nil	2527	1243.5	835.45
Prom		17.66	12.00	10.07	8.88		2398.88	1224.83	868.11
Desv. estándar		0.19	0.24	0.40	0.59		107.82	56.66	79.12
%-CV		1.09	2.03	4.00	6.70		4.49	4.63	9.11

B		Pendiente				Intercepto			
		1 seg	5 seg	10 seg	15 seg	1 seg	5 seg	10 seg	15 seg
4-2-x									
1 mil		14.316	10.541	8.6459	7.4083	1 mil	1600	922.18	704.06
3 mil		14.487	10.887	9.4164	8.2635	3 mil	1490.4	815.49	511.94
5 mil		14.457	10.949	9.7811	8.9251	5 mil	1551.3	813.45	401.4
10 nil		13.882	10.785	9.6788	8.8721	10 nil	1650.1	828.27	413.41
Prom.		14.29	10.79	9.38	8.37		1572.95	844.85	507.70
Desv. estándar		0.28	0.18	0.51	0.71		68.23	51.97	139.96
%-CV		1.95	1.66	5.47	8.44		4.34	6.15	27.57

14/14

Fig.15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
US2005/036806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N27/30 G01N33/487 C12Q1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 312 590 A (GUNASINGHAM ET AL) 17 May 1994 (1994-05-17) column 4, line 4 - line 6; figure 1; example 1	1,14,21
X	EP 0 878 708 A (BAYER CORPORATION) 18 November 1998 (1998-11-18) cited in the application column 3, line 9 - column 4, line 36	1,14,21
X	EP 0 741 186 A (BAYER CORPORATION) 6 November 1996 (1996-11-06) cited in the application page 4, line 44 - page 5, line 29	1,14,21
A	EP 1 411 348 A (ARKRAY, INC.) 21 April 2004 (2004-04-21) paragraph '0027! - paragraph '0041!	1,14,21
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'T' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'A' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 February 2006		Date of mailing of the international search report 20/02/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Komenda, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/036806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5312590	A	17-05-1994	NONE
EP 0878708	A	18-11-1998	AT 293251 T 15-04-2005
		AU 724236 B2 14-09-2000	
		AU 6482198 A 12-11-1998	
		CA 2236132 A1 12-11-1998	
		DE 69829707 D1 19-05-2005	
		DK 878708 T3 11-07-2005	
		ES 2241073 T3 16-10-2005	
		JP 10318971 A 04-12-1998	
		NZ 329793 A 25-11-1998	
		TW 400433 B 01-08-2000	
		US 5798031 A 25-08-1998	
EP 0741186	A	06-11-1996	AT 207113 T 15-11-2001
		AU 701303 B2 21-01-1999	
		AU 5205896 A 14-11-1996	
		CA 2170660 A1 06-11-1996	
		DE 69615909 D1 22-11-2001	
		DE 69615909 T2 04-04-2002	
		DK 741186 T3 14-01-2002	
		ES 2162643 T3 01-01-2002	
		JP 3413323 B2 03-06-2003	
		JP 8304340 A 22-11-1996	
		US 5620579 A 15-04-1997	
		US 5653863 A 05-08-1997	
EP 1411348	A	21-04-2004	CN 1531649 A 22-09-2004
		WO 03008956 A1 30-01-2003	
		US 2004173458 A1 09-09-2004	

Copy for (DO-EP) 31
PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2005/036806

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

GATZ, John, C.
Jenkins & Gilchrist, P.C.
225 West Washington Street
Suite 2600
Chicago, IL 60606
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

03 November 2006 (03.11.2006)

Applicant's or agent's file reference
47082-262WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No

PCT/US2005/036806

International filing date (day/month/year)

12 October 2005 (12.10.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BAYER HEALTHCARE LLC
1884 Miles Avenue
Elkhart, IN 46514
United States of America

State of Nationality
US

State of Residence
US

Telephone No.

574-264-8394

Facsimile No.

574-262-7564

Teleprinter No.

PRO-DG 1
17. 11. 2006
TEAM 14

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BAYER HEALTHCARE LLC
555 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591
United States of America

State of Nationality
US

State of Residence
US

Telephone No.

574-264-8394

Facsimile No.

574-262-7564

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Roslik-Milliquet Ana

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Telephone No. +41 22 338 96 13

FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS

Royal
Technologies S.A.
Escuela de Ingenieros y Arquitectos

139

Expediente No		07040108	No de Folio
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		1
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Sobre con este final

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040108- 00000-0000

Fecha: 2007-04-23 15:43:34 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 139



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

[☒]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- ◆ Descripción de la invención [☒]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [☒]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia Martínez Cortes
 Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

141

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

924

REFERENCIA	Radicación No.	7 40108
	Solicitud internacional	PCT/US2005/036806
	Fecha inicio fase nacional	12/05/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6105

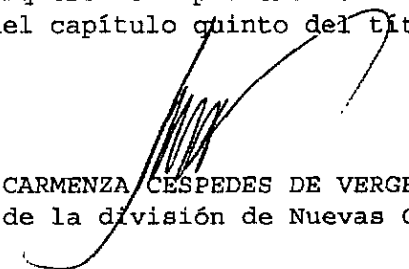
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 18 MAYO 2007
adpall