



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 790**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05803876 .1**
96 Fecha de presentación : **01.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1789796**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Sensor de nitrógeno ureico en sangre (BUN).**

30 Prioridad: **02.09.2004 US 606436 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2011

73 Titular/es: **ABBOTT POINT OF CARE, Inc.**
400 College Road East
Princeton, New Jersey 08540, US

72 Inventor/es: **Collier, Bruce, G.;**
Brouwer, Eric y
Wong, Anjulia

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 362 790 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sensor de nitrógeno ureico en sangre (BUN)

5 **I. Campo de la invención**

Un aparato y un método para la rápida determinación *in situ* de urea en muestras líquidas que puede usarse en el campo de diagnóstico clínico inmediato, incluyendo su uso en lugares de accidente, salas de urgencia, en cirugía, en unidades de cuidados intensivos, y también en entornos no médicos.

10

II. Antecedentes de la invención

La invención se refiere a un aparato y a su método de uso para determinar la presencia o la concentración de urea en una muestra líquida, por ejemplo en dispositivos de autoanálisis de laboratorio y preferiblemente en cartuchos desechables de único uso adaptados para realizar diversos ensayos de analitos casi en tiempo real o en tiempo real.

15

En realizaciones específicas, la invención se refiere a la determinación de urea en muestras biológicas tales como sangre, componentes sanguíneos y orina.

20

Las técnicas de microfabricación (por ejemplo, fotolitografía y deposición de plasma) son atractivas para la construcción de estructuras de sensor de múltiples capas en espacios confinados. En la patente estadounidense 5.200.051 concedida a Cozzette *et al.*, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad se dan a conocer métodos para la microfabricación de sensores de BUN (nitrógeno ureico en sangre), por ejemplo sobre sustratos de silicio. El sensor comprende un chip de silicio con un electrodo de plata / cloruro de plata sobre el que se encuentra una capa de poli(cloruro de vinilo) plastificada que contiene el ionóforo de amonio, nonactina. Sobre esta capa se encuentra una capa de un material de látex de formación de película que contiene ureasa. Ionóforos de amonio alternativos incluyen gramicidina D (Nikolelis y Siontorou; Ammonium ion minisensors form self-assembled bilayer, Anal. Chem. 68, 1735, 1996) y péptidos bicíclicos (Nowak; Design, synthesis and evaluation of bicyclic peptides as ammonium ionophores; Thesis, Worcester Polytechnic Institute, 2003).

25

30

El dispositivo de Cozzette *et al.*, funciona de la manera potenciométrica convencional, en la que la enzima ureasa convierte la urea de la muestra en iones amonio, estos iones se detectan por la membrana selectiva de amonio que recubre el electrodo. El potencial eléctrico en el electrodo es una función logarítmica de la concentración de amonio y por tanto de la concentración de urea en masa. Mediante la calibración del sensor con patrones conocidos que contienen urea, puede estimarse la concentración de urea en la muestra.

35

Se ha usado la enzima anhidrasa carbónica (CA) en un sensor de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), que se añadió a la capa de electrolito para acelerar el equilibrio $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3$ acuoso. Este uso de CA es muy conocido y no está relacionado con la detección de urea, véase: Lindskog, S., Henderson, L., Kannan, K., Liljas, A., Nyman, P., y Strandberg, B.: Carbonic Anhydrase, The Enzymes 5, 587, 1971.

40

Botre, C. y Botre, F., ("Carbonic Anhydrase and Urease: An Investigation In Vitro on the Possibility of Synergic Action,") Biochimica et Biophysica Acta, 997, 111-4, (1989), apoyan la existencia de una conexión fisiológica entre los niveles *in vivo* de urea y la producción de la actividad enzimática de CA. Botre enseña la colocación de un electrodo de detección de gas de amonio, un electrodo de detección de gas de dióxido de carbono, y un sensor de pH en el interior de una disolución que contiene o bien ureasa, o bien ureasa y anhidrasa carbónica. También enseña la adición de urea y un inhibidor de CA (acetazolamida) a las disoluciones. Estos experimentos son compatibles con predicciones basadas en la ley de acción de masas, que se basan en que la presencia de anhidrasa carbónica puede influir (aumentar) en la tasa de hidrólisis de la urea por la ureasa, puesto que la CA elimina eficazmente el dióxido de carbono del sistema llevándolo a la fase gaseosa.

45

50

Específicamente, el bicarbonato formado por la reacción de la ureasa se convierte en dióxido de carbono por la CA, que luego se difunde fuera de la fase líquida y al aire. Este proceso tiene el efecto de reducir la reacción inversa en la que los iones amonio más el bicarbonato se convierten en urea. Por tanto, el efecto neto de la presencia de CA en este sistema es aumentar la tasa de producción de iones amonio.

55

Con respecto a la ley de acción de masas, es muy conocido en la técnica de reacciones enzimáticas reversibles, de manera genérica $A = B + C$, añadir un reactivo D que reacciona con C, para el fin de activar la reacción reversible en el sentido de B (A. W. Adamson, A Textbook of Physical Chemistry, Academic Press (Nueva York) 1973, capítulo 7.). Aunque la presente invención también busca usar anhidrasa carbónica para influir en la reactividad de la ureasa (UR), Botre no sugiere la presente invención por al menos las siguientes razones:

60

Botre no menciona la determinación analítica de la concentración de urea en una muestra, y no menciona la determinación analítica de urea en muestras biológicas de interés clínico, por ejemplo una muestra de sangre. Botre tampoco menciona la inmovilización de UR y CA, ni los electrodos potenciométricos con enzimas inmovilizadas.

65

Botre no menciona la microfabricación de electrodos potenciométricos para determinar cualquier analito que incluya urea, ni el uso de las enzimas UR y CA en un sistema que no permita que el intercambio de dióxido de carbono desde la disolución hacia un espacio de aire, como en un cartucho del documento US 5.096.669 que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad y otros sistemas analíticos en los que la urea se mide electroquímicamente.

El concepto de medición electroquímica diferencial por ejemplo potentiométrica y amperométrica, es muy conocido en la técnica electroquímica, véase por ejemplo Cozzette, documento US 5.112.455 y Cozzette, documento US 5.063.081, que se incorporan ambos al presente documento como referencia en su totalidad.

El documento US 5.081.063 da a conocer el uso de capas permeoselectivas para sensores electroquímicos y el uso de látex de formación de película para la inmovilización de moléculas bioactivas, que se incorpora al presente documento como referencia. El uso de poli(alcohol vinílico) (PVA) en la fabricación del sensor se describe en el documento US 6.030.827 que se incorpora como referencia. Los documentos US 6.030.827 y 6.379.883 enseñan métodos para estampar capas de poli(alcohol vinílico) y se incorporan como referencia en su totalidad.

Botre *et al*; Analytical Letters, vol. 22, n.º 11-12, 1989, páginas 2413-2422 describen un electrodo en el que la ureasa se proporciona sobre un elemento de triacetato de celulosa que luego se fija a un electrodo de pNH₃ para proporcionar un sensor de urea. Botre *et al*. se centran en una interacción indirecta entre la anhidrasa carbónica y la ureasa en disolución.

La electroforesis en gel de una preparación de ureasa comercial típica, tal como se muestra en la figura 14, indica que los sensores de BUN de la técnica anterior no habrían incluido anhidrasa carbónica como impureza significativa.

III. Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un dispositivo para detectar urea en una muestra, que comprende: (a) un sensor con el que puede ponerse en contacto una muestra que se sospecha que contiene urea, incluyendo el sensor ureasa y anhidrasa carbónica inmovilizadas sobre al menos una parte de dicho sensor, y (b) un sistema detector para procesar señales desde el sensor, en el que el dispositivo está configurado para inhibir el intercambio de gases desde la muestra hacia un espacio de aire en una zona de la ureasa y la anhidrasa carbónica inmovilizadas.

Otro objeto es proporcionar una membrana de sensor que comprende: una matriz permeable al agua, que incluye al menos dos enzimas, ureasa y anhidrasa carbónica estando configurada la membrana en un dispositivo de manera que inhibe el intercambio de gases desde una muestra hacia un espacio de aire en una zona de la membrana. Asimismo en la presente invención se incluye el uso de una membrana tal como se describe en el presente documento en un dispositivo de detección de urea.

Además en la presente invención se incluye un dispositivo para detectar urea en una muestra, que comprende: un electrodo recubierto con una primera capa, comprendiendo dicha primera capa poli(cloruro de vinilo) plastificado y nonactina, y al menos dos enzimas, ureasa y anhidrasa carbónica, inmovilizadas sobre dicha primera capa.

Además en la presente invención se incluye un dispositivo para detectar urea en una muestra, que comprende: un electrodo recubierto con una primera capa, comprendiendo dicha primera capa poli(cloruro de vinilo) plastificado y nonactina, y una segunda capa ubicada sobre y en contacto con al menos con una parte de dicha primera capa, comprendiendo dicha segunda capa una matriz permeable al agua e incluyendo al menos dos enzimas, ureasa y anhidrasa carbónica.

Otro objeto es proporcionar un dispositivo de detección microfabricado para detectar urea en una muestra, que comprende: (a) un sustrato sustancialmente plano que tiene una superficie de microelectrodo estampada, (b) una primera capa sobre al menos una parte de dicho sustrato que comprende un polímero plastificado y nonactina, y (c) una segunda capa sobre al menos una parte de dicha primera capa, que comprende una matriz permeable al agua que incluye al menos dos enzimas, ureasa y anhidrasa carbónica en el que la ureasa y la anhidrasa carbónica están inmovilizadas sobre al menos una parte de un único electrodo y en el que el dispositivo está configurado para inhibir el intercambio de gases desde una disolución de muestra hacia un espacio de aire en una zona de la urea y anhidrasa carbónica inmovilizadas.

Además se da a conocer en el presente documento un sensor selectivo de iones mejorado para la detección de urea que tiene una capa en la que está inmovilizada una enzima, ureasa, comprendiendo la mejora: la inmovilización de al menos otra enzima, anhidrasa carbónica, en dicha capa.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para someter a ensayo urea en una muestra, que comprende: poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene urea con un sensor que comprende ureasa inmovilizada y anhidrasa carbónica inmovilizada, y

detectar un resto químico con un sensor seleccionado del grupo que consiste en un sensor de iones amonio, un

sensor de pH, un sensor de dióxido de carbono, un sensor de bicarbonato, un sensor de conductividad,

en el que el dispositivo está configurado para inhibir el intercambio de gases desde la muestra hacia un espacio de aire en una zona de la ureasa inmovilizada y la anhidrasa carbónica inmovilizada. Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para mejorar la sensibilidad de un sensor de urea, sensor que comprende un detector y ureasa inmovilizada, comprendiendo el método: añadir una cantidad eficaz de anhidrasa carbónica inmovilizada, a dicho sensor, en el que dicho sensor está configurado para inhibir el intercambio de gases desde una muestra hacia un espacio de aire en una zona de la ureasa y la anhidrasa carbónica inmovilizadas.

Además se da a conocer en el presente documento un método para someter a ensayo urea en una muestra, que comprende: poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene urea con un sensor que tiene al menos una capa y al menos dos enzimas, ureasa y anhidrasa carbónica, inmovilizadas en dicha al menos una capa, y detectar un resto químico próximo a dicha al menos una capa con un sensor seleccionado del grupo que consiste en un sensor de iones amonio, un sensor de pH, un sensor de dióxido de carbono, y un sensor de bicarbonato.

Además se da a conocer en el presente documento un método para mejorar la sensibilidad de un sensor de urea, comprendiendo el sensor un detector y al menos una capa en la que está inmovilizada una enzima, ureasa, comprendiendo el método: inmovilizar una cantidad eficaz de una segunda enzima, anhidrasa carbónica, en dicha al menos una capa.

IV. Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una representación gráfica de Nernst de una respuesta del sensor de la técnica anterior, en mV, como función de $\log [\text{urea}]$, en M, en el intervalo de 1 a 90 mM de urea, para sangre (-) acuosa y (•) completa.

La figura 2 muestra una valoración de pH con NaOH 0,5 M de diferentes lotes de polímero Elvace (volumen = 20 mL), que indica capacidad tamponante a pH 7,5 para el lote A. Los lotes de Elvace restantes no muestran capacidad tamponante a pH 7,5.

La figura 3 muestra un pH interno de la capa de Elvace que contiene ureasa tras ponerse en contacto con disolución de calibrador que contiene urea ($t < 10$ s). Las muestras ($t > 14$ s) con alta capacidad tamponante mantienen un pH interno constante. (En la figura, b.c. se refiere a la capacidad tamponante de la muestra).

La figura 4 muestra las curvas de respuesta a fluidos de control acuosos tamponados (M1 = urea 50 mM; P1 = urea 20 mM) usando diferentes diseños de sensor de BUN. Parte superior: sensor de BUN convencional; sensor de BUN con ureasa desnaturalizada; sensor de BUN con proteína (albúmina sérica bovina) que sustituye a la ureasa. Parte inferior: sensor de BUN convencional; sensor de BUN con capa de enzima tamponada a 7,4 y preparado 1 semana antes; sensor de BUN con adición de anhidrasa carbónica; sensor de BUN con ureasa dializada.

La figura 5 muestra curvas de respuesta de sangre completa, día 1, para sensor de BUN con modificaciones en la capa de enzima.

La figura 6 muestra curvas de respuesta de sangre completa tras incubación en cartucho de 4 días a 40°C, para sensores de BUN con modificaciones en la capa de enzima.

La figura 7 muestra curvas de respuesta de fluido control acuoso tamponado (M1 = urea 50 mM), tras incubación de 4 días a 40°C, para sensores de BUN con modificaciones en la capa de enzima. Los sensores de BUN modificados con anhidrasa carbónica adicional muestran un aumento de la señal.

La figura 8 es un alzado lateral esquemático topológico de un sensor potenciométrico de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y electrodo de referencia.

La figura 9 es el alzado desde arriba del sensor de la figura 8, que muestra una serie de diferentes sensores en un único chip.

La figura 10 es una vista desde arriba isométrica de una cubierta de cartucho de sensor.

La figura 11 es una vista desde abajo isométrica de una cubierta de cartucho de sensor.

La figura 12 es una vista desde arriba de la disposición de una junta de estanqueidad de cinta adhesiva para un cartucho de sensor.

La figura 13 es una vista desde arriba isométrica de una base de cartucho de sensor.

La figura 14 es un gel de proteínas de SDS-PAGE teñido con plata con un marcador de peso molecular, ureasa comercialmente disponible, y anhidrasa carbónica comercialmente disponible.

V. Descripción detallada de la invención

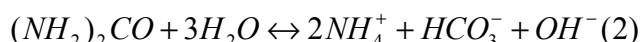
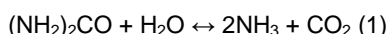
La presente invención permite determinaciones rápidas *in situ* de urea usando un cartucho que tiene una serie de sensores de analito y medios para presentar de manera secuencial una muestra y un fluido (modificados o no) a la serie de analitos. Los cartuchos están diseñados para operarse preferiblemente con un dispositivo de lectura, tal como el que se da a conocer en la patente estadounidense 5.096.669 concedida a Lauks *et al.*, expedida el 17 de marzo de 1992, o en la patente estadounidense 5.821.399 concedida a Zelin, expedida el 13 de octubre de 1998, que se incorporan ambas al presente documento como referencia en sus totalidades respectivas.

La invención se comentará principalmente en lo que se refiere a la aplicación al sistema -i-STAT, por ejemplo, la descripción del cartucho y del analizador en Lauks *et al.*, documento US 5.096.669. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que la invención puede usarse más ampliamente, por ejemplo en otros formatos de sensor desechable de único uso, en formatos de cartucho de sensor de múltiples usos limitados, y en analizadores que tienen sensores que se usan y se calibran de nuevo hasta que fallan y se sustituyen, o en los que se sustituye un componente de membrana que contiene los reactivos de enzima. Estos formatos de ensayo son alternativas comerciales muy conocidas en la técnica de detección electroquímica.

En el sistema -i-STAT, un sensor de BUN, junto con varios otros sensores, se pone en contacto en primer lugar con un fluido calibrador y luego con una muestra de sangre. El papel del calibrador es proporcionar una única disolución que actúe como un patrón universal de concentración conocida para cada uno de los sensores. Un experto en la técnica reconocerá que la selección de su composición requerirá un equilibrio entre las necesidades de competencia de los sensores individuales, por ejemplo en lo que se refiere a la selección de sal de tampón, concentración de tampón, pH, fuerza iónica, estabilidad de reactivo y similares.

El ensayo de BUN es útil para médicos que evalúan la salud de sus pacientes. Mide el nivel de nitrógeno de la urea en sangre, que es un producto de desecho de metabolismo de proteínas eliminado por los riñones. Por tanto, evalúa la función renal. Los valores típicos de BUN son 8-20 mg/100 ml. El estado conocido como azotemia, es decir niveles de BUN aumentados, puede indicar función renal alterada, insuficiencia cardíaca congestiva, deshidratación, choque, hemorragia en el tracto gastrointestinal, estrés, infarto de miocardio agudo o ingesta excesiva de proteínas. Alternativamente, valores de BUN disminuidos pueden indicar insuficiencia hepática, malnutrición, uso de esteroides anabólicos, embarazo y enfermedad celiaca.

La urea, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, se detecta en sangre completa mediante el sensor de BUN -i-STAT en un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, la urea se convierte enzimáticamente en los productos NH_4^+ y HCO_3^- , a través de un mecanismo complicado que no se entiende bien. En la bibliografía se encuentran varias representaciones diferentes de la descomposición enzimática de la urea (Steinschaden, (1997) *Sensors and Actuators B44*, 365-369; H. Suzuki (2001) *Biosensors and Bioelectronics* 16, 725-733; A. J. Taylor (1992), *Ann. Clin. Biochem.* 29, 245-264; D. M. Jenkins (1999) *J. Dairy Sci.* 82, 1999-2004). A continuación se facilitan dos representaciones típicas de la reacción:



La segunda etapa en la detección de urea es la determinación potenciométrica de la actividad de iones amonio por el electrodo selectivo de iones (ISE) NH_4^+ . Resulta aceptable aproximar la actividad de NH_4^+ para que sea su concentración. Esto se conoce muy bien en la técnica electroquímica (D. Freifelder, *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2ª ed., W. H. Freeman (San Francisco) 1982, capítulo 4). La respuesta del sensor de BUN, es decir el cambio en el potencial debido a los cambios en la concentración de NH_4^+ , se calibra a niveles conocidos de urea en sangre. La representación gráfica de la curva de respuesta del sensor -i-STAT, mV como función del tiempo, indica por tanto la concentración de iones amonio dentro de la membrana del sensor, lo que proporciona una estimación indirecta de la concentración de urea en sangre.

La reacción de la enzima ureasa también puede detectarse mediante sensores para los restos H^+ , CO_2 y HCO_3^- porque éstos se producen o se consumen en la reacción. Se prefiere la detección de iones amonio porque la sangre tiene un nivel de fondo significativo de H^+ , CO_2 y HCO_3^- , lo que generalmente requeriría una medición diferencial (es decir, tomando la diferencia entre un sensor recubierto de enzima y un sensor desnudo adyacente), mientras que el nivel de fondo de amonio en la sangre es comparativamente bajo. La producción de iones durante la reacción de ureasa también aumenta la conductividad de la muestra, lo que puede detectarse con un sensor de conductividad. De nuevo, puesto que la muestra tiene una conductividad de fondo alta, éste no es el método de detección preferido. Los sensores para pH, CO_2 , HCO_3^- y conductividad son muy conocidos en la técnica de detección electroquímica.

La conversión de urea en ión amonio y dióxido de carbono o en ión carbonio afecta al pH local de la enzima ureasa inmovilizada. Se sabe que la ureasa tiene un pH óptimo de aproximadamente pH 6 a pH 7,5. Las desviaciones desde este intervalo de pH reducirán la actividad enzimática de, lo que a su vez puede afectar a la linealidad de

respuesta del sensor en concentraciones de sustrato superiores. Los cambios de pH en la matriz usada para inmovilizar la enzima también pueden tener efectos significativos sobre el rendimiento de la enzima. Esto puede observarse para sensores fabricados, en lo que se refiere al término de caducidad del sensor.

- 5 Características de rendimiento de un sensor de BUN que contiene sólo la enzima ureasa: La linealidad del sensor de BUN de un diseño de la técnica anterior (documento US 5.200.051) se muestra en la figura 1. Éstas son representaciones gráficas de Nernst de la respuesta del sensor, en milivoltios (mV), como función de $\log [\text{urea}]$, en el intervalo de 1 a 90 mM de urea.
- 10 El intervalo notificable clínico típico es de 1- 50 mM (a 50 mM, $\log [\text{urea}] = -1,3$). Como con todos los sensores, la respuesta no satisface completamente el comportamiento lineal teórico, especialmente en el extremo inferior del intervalo de analitos. Mientas que la pendiente teórica de Nernst es de aproximadamente 59 mV/década a temperatura ambiente, este diseño de BUN muestra aproximadamente 37 mV/década en el extremo superior (lineal). Obsérvese que en la medida en que se conozca la pendiente esperada para el lote fabricado de sensores, puede programarse en el software que ejecuta el ciclo de prueba del sensor. Este valor, más que el valor teórico de la pendiente, se usa entonces en los cálculos. Se proporciona una descripción detallada de ecuaciones y cálculos muy conocidos en el funcionamiento de sensores de este tipo en el documento US 5.112.455, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.
- 15
- 20 La presente invención se entenderá mejor con referencia a las realizaciones específicas establecidas en los siguientes ejemplos.

1. Inmovilización de la enzima y rendimiento del sensor

- 25 Este ejemplo trata de las formas en que se inmovilizan enzimas sobre en un sensor de base de manera que se mantenga la actividad enzimática. El material preferido es ELVACE[®], que es un adhesivo comercialmente disponible que consiste en una emulsión a base de agua del copolímero poli(etileno)(acetato de vinilo). Se usa como la matriz permeable al agua (denominada cóctel de BUN) para inmovilizar las enzimas.
- 30 Se ha hallado que la adición de tampón fosfato de sodio (pH 6,5, 6,8 y pH 7,4) al cóctel de BUN mejora su capacidad tamponante. Esto da como resultado que se aumente la vida útil del cóctel, es decir el tiempo desde la preparación hasta la aplicación (por ejemplo mediante microdispensación sobre la superficie del sensor), desde aproximadamente 16 horas hasta aproximadamente 25 días. La microdispensación, como método de aplicación, se da a conocer en el documento US 5.554.339 de titularidad común, que se incorpora como referencia en su totalidad.
- 35 Mediante el uso de de tampón fosfato de sodio 50, 75 ó 100 mM a pH 7,4, se observó que se mantenía una impresión fiable hasta aproximadamente 25 días, basándose en una evaluación visual del material impreso sobre el sensor y el rendimiento del sensor.
- 40 Se sabe que la ureasa en los ensayos de actividad enzimática tiene actividad significativamente reducida a valores de pH superiores a pH 7,4. Normalmente la actividad de la enzima ureasa a pH 8,0 es aproximadamente el 50% que a pH 7,0. En segundo lugar, se observó una respuesta mayor del sensor a [BUN] alta con el tampón añadido. Los motivos para la mejora de respuesta del sensor se comentan a continuación.
- 45 Se sabe muy bien que la actividad de la ureasa del haba blanca (*Canavalia ensiformis*) es dependiente tanto del tampón como del pH; el pH óptimo para la ureasa en tampón TRIS es entre pH 6,0 y pH 8,0 (Cesareo, S., y Langton, S.: Kinetic Properties of Helicobacter-Pylori Ureases Compared with Jack Bean Urease, FEMS Microbiol Lett 99, 15, 1992). En el sistema -i-STAT de la técnica anterior, el fluido calibrador tiene un pH de 7,4, sin embargo en la zona localizada del sensor de BUN, es decir la matriz de BUN y su capa de difusión, el pH puede elevarse hasta aproximadamente pH 7,85 debido a la producción de ión hidróxido (OH⁻) procedente de la degradación enzimática de urea en el fluido calibrador por la ureasa en la matriz. Cuando el sensor de BUN entra en contacto con la muestra de sangre, normalmente a pH 7,4, se sabe que el tamponamiento de pH está dominado por la hemoglobina (J. E. Sherwin y B. B. Bruegger in Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation, ed. L. A. Kaplan y A. J. Pesce, C. V. Mosby (San Luis), 1989, Capítulo 21). Esto puede dar como resultado un pH diferente en la zona del sensor de BUN. Estos valores de pH no óptimos en la zona del sensor pueden afectar a la distribución del producto, reducir la respuesta del sensor y aumentar la variabilidad. Se ha hallado que la adición del tampón fosfato de sodio al cóctel de BUN mejora significativamente el tamponamiento de ureasa en la matriz, y reduce la diferencia en el comportamiento entre fluidos calibradores acuosos y muestras de sangre completa.
- 50
- 55
- 60 Se ha hallado que la adición del tampón fosfato de sodio (pH 6,0, 6,8 y pH 7,4) al cóctel de BUN para la microdispensación mejora la solubilidad de la enzima en ese tampón.

Se descubrió otra forma de reducir el tiempo de respuesta del sensor (el tiempo hasta alcanzar el 95% de la señal en estado estacionario) determinando si la respuesta del sensor tiene velocidad limitada por la formación de NH₄⁺. Se añadió anhidrasa carbónica (CA) a la matriz de enzima para eliminar el bicarbonato/dióxido de carbono mediante la formación del anión carbonato (CO₃²⁻), llevando así la reacción (1) hacia la derecha (tal como se describió

- 65

anteriormente). Esto reduce significativamente el tiempo de respuesta del sensor.

También se halló que no hay diferencia sustancial en la respuesta para una concentración de CA de la matriz de 0,09 mM y 0,5 mM para muestras acuosas, pero la concentración de anhidrasa carbónica [CA] superior, proporcionó una curva de respuesta más plana en sangre completa. Además, los sensores con anhidrasa carbónica y la concentración de matriz de ureasa convencional en un cóctel de 0,07 mM, proporcionaron una respuesta similar a los sensores con anhidrasa carbónica y un 20% más de ureasa. Esto es compatible con aumentos en la linealidad en el extremo superior de la curva de respuesta de urea y la precisión mejorada con la adición de anhidrasa carbónica (i) para limitar la reacción inversa, es decir la producción de urea a partir de NH_4^+ y HCO_3^- y (ii) a partir de la capacidad tamponante adicional que surge del anión carbonato.

Estudios cinéticos del sensor de BUN indican que dos mecanismos de velocidad diferente son operativos en el intervalo de analito de urea 1 - 50 mM. En el extremo superior de este intervalo, la respuesta del sensor está limitada por la concentración de ureasa, tal como se indica en estudios de modelación según Carr & Bowers (1980) págs. 209-210. En el extremo inferior el sustrato está limitado.

Cuando el objeto de la invención es realizar sensores de BUN de único uso, es decir los que se usan con una única muestra de sangre y luego de desechan, como en el sistema -i-STAT, pueden fabricarse muchos millones de estos sensores anualmente. En este ejemplo, la adición de CA y el tampón a la matriz puede contribuir a la variabilidad reducida de un lote a otro de los lotes fabricación en el extremo superior del intervalo del analito. El grado al que se reduce la concentración de la enzima ureasa, como etapa limitante, también puede ayudar a un mejor rendimiento del sensor.

Resulta deseable que la realización preferida del sensor de BUN mejorado incorpore las siguientes características, (i) tampón fosfato de sodio a pH 7,4 se añade mejor a la mezcla de látex (cóctel de BUN) que incluye las enzimas ya que esto prolonga considerablemente el término de caducidad de la mezcla, (ii) antes de la adición a la mezcla, la enzima ureasa se dializa mejor frente al tampón fosfato de sodio para aumentar la cinética de la enzima, y (iii) la anhidrasa carbónica se añade mejor a la mezcla para aumentar la eficacia de la conversión de urea en NH_4^+ . Los siguientes datos experimentales apoyan estas conclusiones.

El rendimiento del sensor de BUN de la técnica anterior y el nuevo sensor de BUN se comparan en las figuras 4 - 7. Estas figuras muestran una parte de la respuesta del electrodo para BUN como función del tiempo. La parte de la respuesta a un tiempo < 14 s indica la respuesta potenciométrica, con respecto al electrodo de referencia, del electrodo para BUN a la disolución de calibrador. La respuesta de la señal a un tiempo > 18 s es la del sensor de BUN a la muestra de prueba, que puede ser un material de control de base acuosa o una muestra de sangre completa. El electrodo de referencia se describe en el documento US 4.933.048 de titularidad común, que se incorpora al presente documento como referencia. Otros electrodos de referencia que se conocen bien en la técnica electroquímica también podrían usarse con estos sensores de BUN.

La figura 4A muestra las curvas de respuesta a materiales de control acuosos usando diferentes composiciones de sensor de BUN. El sensor de BUN convencional, basado en -i-STAT de la técnica anterior, se indica mediante una línea negra continua. El trazo largo indica un sensor de BUN compuesto por ureasa desnaturalizada. El trazo corto indica un sensor de BUN compuesto por albúmina sérica bovina que sustituye a la ureasa. Este gráfico demuestra que la señal se genera por la presencia de urea que se está convirtiendo por la enzima ureasa.

La figura 4B muestra el rendimiento indicado con una línea continua para un sensor de BUN convencional. Un trazo corto muestra un cóctel de enzimas tamponado a pH 7,4 y preparado 1 semana antes de microdispensarse. Un trazo intermedio indica un sensor de BUN que también incluye anhidrasa carbónica y el trazo largo indica ureasa dializada. La presencia de anhidrasa carbónica muestra un aumento de la señal.

La curva de trazos largos es el cóctel de BUN preparado con ureasa dializada frente a tampón fosfato 50 mM. Una característica importante es la mayor respuesta inicial tras la transición del contacto con el fluido calibrador a una muestra de sangre, lo que sugiere que la cinética de ureasa se aumenta sustancialmente, es decir se mejora la actividad de la enzima ureasa y realiza la conversión rápida de urea en el producto NH_4^+ , y se acerca a la curva de respuesta "función de etapa" ideal de los sensores potenciométricos teóricos.

La adición de anhidrasa carbónica (CA) al cóctel de BUN en la línea de trazos intermedios aumenta la cantidad de NH_4^+ convertido a partir de urea. En otras palabras, la CA aumenta la eficacia de la conversión de urea en iones amonio. La implicación en este caso es que la sensibilidad del sensor aumenta con la adición de CA.

Las figuras 5 - 7 son representaciones gráficas de un estudio de término de caducidad con sensores almacenados a 40°C constantes tras la fabricación. El almacenamiento a esta temperatura elevada proporciona un medio para simular una tasa aumentada de degradación de sensores. Esto puede proporcionar un medio para predecir el término de caducidad real de sensores almacenados en condiciones más normales, por ejemplo temperatura ambiente y refrigeración. Para sensores fabricados del tipo descrito en el presente documento, es necesario garantizar que los sensores siguen pudiendo usarse durante hasta aproximadamente un año tras la fecha de

adquisición. Se muestran curvas de respuesta en sangre completa y en fluido acuoso (ml) para sensores almacenados a la temperatura de almacenamiento elevada durante un día (d1) y cuatro (d4) días.

5 Se usaron dos lotes de sensor fabricados diferentes (A y B) para el estado convencional. En la figura 5 sólo se muestran los datos para las modificaciones de anhídrido carbónico (a dos concentraciones, 0,09 mM y 0,5 mM).

10 La primera representación gráfica muestra la respuesta de la sangre completa (wb) (figura 5). Las características clave de la modificación de CA son (i) la respuesta de mV aumentada para un cambio dado en la concentración de urea, es decir, una conversión más eficaz de urea en iones amonio, y (ii) la forma de curva "aplanada" entre aproximadamente 25 y 40 s, lo que implica un funcionamiento en estado estacionario mejorado. El sensor de [CA] = 0,5 mM parece proporcionar una forma de curva ligeramente más plana que el sensor de [CA] = 0,09 mM. De manera significativa, ambos sensores de CA muestran una disminución insignificante en el potencial entre 25 y 40 s lo que constituye una mejora con respecto al diseño del sensor convencional en el que está ausente la CA.

15 El comportamiento del sensor tras cuatro días (d4) a 40°C de incubación es similar al de un día (d1) tal como se muestra en la figura 6. Obsérvese que la respuesta inferior comparada con la de d1 se debe a diferentes muestras de wb. Un establecimiento de intervalo ideal de recogida de datos de muestra (véase la descripción del documento US 5.112.455 de titularidad común) para el sensor con CA sería de aproximadamente 30 s.

20 La respuesta del fluido acuoso para los sensores de BUN en d1 en la figura 7 es similar a las mostradas en la figura 6. Se proporciona a continuación la respuesta del sensor al fluido acuoso m1 tras cuatro días a 40°C de incubación. El sensor que contiene CA muestra la misma respuesta de mV aumentada que para las muestras de sangre completa. Una comparación de las curvas de respuesta en un intervalo de recogida de datos de 30 s para el sensor que contiene CA muestra sólo una pequeña diferencia entre las muestras acuosas y de sangre completa; esto
25 constituye una mejora útil con respecto a la diferencia observada entre las muestras acuosas y de sangre completa para el sensor convencional de la técnica anterior.

30 Los datos dados a conocer anteriormente muestran (i) que el sensor de BUN de la técnica anterior está limitado por la enzima a concentraciones altas de urea, sin embargo pueden lograrse mejoras significativas en la respuesta del sensor con la adición de anhídrido carbónico, (ii) la estabilidad de la matriz de enzima (Elvace) está relacionada con la presencia de ácido acético y que la adición de un componente tamponante ayuda a prolongar su duración para la aplicación del sensor, por ejemplo mediante microdispensación, (iii) el mantenimiento de un pH óptimo en el sensor de BUN es crucial para garantizar la alta actividad de la ureasa y por tanto un rendimiento máximo del sensor de BUN y puede lograrse añadiendo un tampón a la matriz, (vi) la adición de anhídrido carbónico proporciona sensores de BUN con diferencias mínimas en las curvas de respuesta entre muestras acuosas y de sangre completa, y (v) la adición de anhídrido carbónico a la matriz proporciona sensores con término de caducidad aceptable.

40 Las siguientes secciones (i) proporcionan una descripción de la fabricación de la realización preferida del nuevo sensor de BUN, (ii) dan a conocer materiales de matriz alternativos para la inmovilización de UR y CA, (iii) proporcionan detalles sobre las propiedades bioquímicas y fuentes de UR y CA, (iv) dan a conocer sistemas tamponantes de membrana alternativos al fosfato, y (v) dan a conocer formas alternativas de obtener membranas de UR-CA para la unión de electrodos tradicionales, puesto que la invención no se limita a aplicaciones de sensor microfabricado.

45 Fabricación de una realización preferida del nuevo sensor de BUN

Una realización preferida del nuevo sensor de BUN se fabrica usando una combinación de procedimientos de microfabricación de película delgada y técnicas de microdispensación. Comprende un electrodo indicador de plata-cloruro de plata de película delgada que opera en combinación con un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata de película delgada del tipo descrito en el documento US 4.933.048.

55 Se recubre una oblea de sustrato de silicio con una capa aislante de dióxido de silicio, preparada por oxidación térmica. Se depositan capas metálicas de titanio/tungsteno, y luego de plata sobre la oblea de base de dióxido de silicio, luego se estampan usando técnicas fotolitográficas. Una capa eléctricamente aislante tal como polímero de poliimida o dióxido de silicio adicional se somete entonces a foto-estampado para asilar el conjunto de circuitos de sensor adyacentes. El electrodo indicador de plata-cloruro de plata (diámetro de ~200 micras) se prepara a partir de la plata estampada usando técnicas tradicionales, por ejemplo electroquímica, plasma de gas cloro y oxidación de Ag^0 por un oxidante inorgánico tal como $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ o Fe^{3+} en presencia de ión cloruro.

60 Las capas restantes del electrodo para BUN incluyen dos estructura de película gruesa: (i) una película de membrana semipermeable, que comprende una capa de polímero orgánico (por ejemplo, poli(cloruro de vinilo) - PVC), y un ionóforo de iones amonio; y (ii) la biocapa exterior, que comprende en este sensor particular, un látex de formación de película (por ejemplo, poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico)) y una cantidad suficiente de las enzimas ureasa y anhídrido carbónico. Estas capas se depositan mediante una técnica de microdispensación tal como se describe en el documento US 5.554.339 de titularidad común, que se incorpora como referencia.

65

La parte del electrodo de referencia de la célula unitaria puede comprender estructuras recubiertas descritas en las patentes US 4.933.048 y 5.200.051, que se incorporan ambas como referencia.

La estructura sensible a iones amonio de película gruesa comprende un aglutinante de poli(cloruro de vinilo) (PVC), tris(2-etilhexil)fosfato como plastificante, y nonactina como ionóforo. El electrodo indicador puede hacerse selectivo para diferentes iones usando la misma composición de aglutinante y plastificante pero con diferentes ionóforos. Por ejemplo, se ha usado valinomicina, monensina y (metil)monensina, y cloruro de tridodecilamonio para hacer electrodos selectivos de ión cloruro, sodio o potasio, respectivamente. Otros ionóforos pueden incluir, pero no se limitan a éteres corona, trialkilaminas, o ésteres de fosfato, y similares. Alternativamente, pueden usarse otros materiales de aglutinante polimérico además del PVC. Estos polímeros pueden incluir, por ejemplo, caucho de silicio, plásticos de politetrafluoroetileno, o derivados de PVC que contienen grupos funcionales ionizables (por ejemplo, carboxilatos). Otros plastificantes adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a tris(2-etilhexil)fosfato, nitrocimeno, 2-nitrofenilocetil éter, sebacato de dibutilo, adipato de dietilo, ftalatos, carbonato de propileno, 5-fenilpentanol, o mezclas de los mismos. A los expertos en la técnica aún pueden ocurrírseles otras combinaciones de ionóforo y aglutinantes, que estén dentro del alcance de la presente invención. La película selectiva de iones semipermeable resultante puede tener un espesor en el intervalo de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 200 micras, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 micras.

En este punto, es importante distinguir entre las propiedades de los látex de partículas y sus homólogos de formación de película. Un látex de partículas comprende una estructura polimérica sólida, tal como poliestireno, que está recubierta con un material hidrófilo lo que permite que la partícula de polímero sea transportada por el agua. Tradicionalmente se han usado materiales de látex de partículas para inmovilizar todo tipo de materiales biológicamente activos incluyendo enzimas (Véase, Kraemer, D. *et al.*, patente estadounidense n.º 4.710.825). En la presente invención pueden usarse látex de partículas recubiertos con CA y UR.

Por el contrario, un látex de formación de película es una disolución coloidal que comprende un núcleo líquido polimérico móvil, tal como un acetato de vinilo, con un recubrimiento externo hidrófilo. Un látex de formación de película de este tipo se obtiene mediante un procedimiento de emulsión-polimerización en el que se añade un monómero orgánico inmiscible en agua o una mezcla de monómeros a un medio acuoso que contiene un catalizador de radicales libres. La polimerización puede iniciarse, por ejemplo, mediante agitación mecánica (Véase, por ejemplo, Vanderhoff, J. W., J. Poli. Sci. Polymer Symposium 1985, 72, 161-198). Cuando este material se seca, las partículas se fusionan para formar una película que no puede volver a dispersarse en agua. Debido a que los látex de formación de película son a base de agua y contienen tanto componentes hidrófilos como hidrófobos, puede especularse que estas composiciones pueden proporcionar un entorno de estabilización para especies biológicamente activas, por ejemplo enzimas que incluyen CA y UR, y constituyen un medio eficaz para la inmovilización o incorporación de las mismas.

Se ha hallado adicionalmente que los látex de formación de película tanto de fuentes naturales como sintéticas son de utilidad significativa. Por ejemplo, los siguientes monómeros sintéticos, sus analógicos químicamente modificados, copolímeros, o mezclas de los mismos pueden usarse para obtener un látex de formación de película: acetato de vinilo, etileno, acrilato o ácido acrílico, estireno, o butadieno. Estos y muchos otros materiales conocidos por los expertos en la técnica están disponibles comercialmente de muchas fuentes incluyendo Reichhold, Air Products, DuPont, Dow Chemical, o Imperial Chemical Company. Los polímeros a base de isopreno naturales también son útiles y están disponibles de Imperial Adhesives y Chemicals, Inc. y de General Latex y Chemical Corp. Se usa Elvace de Reichhold en la realización preferida del sensor de BUN.

Además, estos materiales conservan sus propiedades de formación de película incluso cuando los componentes solubles en agua distintos al látex (por ejemplo, proteínas, enzimas, polisacáridos, e hidrocoloides tales como agarosa, goma de semilla de algarrobo, goma guar, o combinaciones de hidrocoloides, o polímeros sintéticos tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poliacrilamida y similares) comprenden hasta aproximadamente el 25% en peso del contenido en sólidos. A este respecto, una consideración significativa relacionada con un procedimiento de microfabricación para la producción de sensores es que la película establecida se adhiera eficazmente a un sustrato plano incluso en presencia de grandes cantidades de aditivos (es decir, enzimas).

Pueden usarse diversos métodos para definir una capa sobre un sustrato plano. Si se requiere una capa gruesa (de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 micras), se prefiere la microdispensación de una composición viscosa de látex de formación de película (< 500 Centipoises tal como se mide en un viscosímetro RV de Brookefield). Sin embargo, si se requiere una capa delgada (de aproximadamente 0,2 a menos de aproximadamente 5 micras), se usa una composición con una viscosidad inferior que puede microdispensarse directamente sobre el electrodo indicador, o alternativamente, o bien microdispensarse o bien recubrirse por centrifugación sobre una capa de resistencia positiva (por ejemplo, Shipley AZ 1370 SF) que se ha estampado para dejar expuesta el área sobre el electrodo indicador. Cualquier disolvente adecuado conocido en la técnica, tal como acetato de n-butilo y similar, se usa luego para elevar la resistencia, junto con el látex en exceso. También puede usarse una técnica separada usando una capa fotorresistente.

El control de la energía de superficie puede usarse de manera beneficiosa para controlar la extensión del reactivo

microdispensado (y, por tanto, su dimensionalidad, tal como el espesor). Un tratamiento con plasma con fluorocarbono por ejemplo, tetrafluoruro de carbono, de una capa de poliimida que rodea al electrodo indicador hace que el látex de base acuosa muestre un ángulo de contacto alto (es decir, minimiza la extensión y aumenta el espesor).

Para inmovilizar una o más especies biológicamente activas en una capa de látex es posible o bien mezclar las especies con el látex antes de la deposición o bien impregnar la capa tras la deposición. La estabilidad de las especies biológicamente activas, particularmente de las enzimas, puede mejorarse añadiendo un agente de reticulación o bien antes o bien tras la deposición. Estos agentes de reticulación se conocen bien en la técnica y pueden incluir compuestos tales como glioxal, glutaraldehído, melamina-formaldehído, urea-formaldehído, y fenol-formaldehído. Otros agentes de reticulación adecuados pueden poseer al menos dos grupos funcionales que pueden incluir vinilo, carboxilo, anhídrido, amina, amida, epóxido, hidroxilo, ciano, isocianato, tiol, halo, además de formilo, y combinaciones estables de estos grupos funcionales (por ejemplo, un cloroalquilepóxido). Estos aditivos pueden mejorar significativamente la resistencia a la humedad de la biocapa y prolongar el término de caducidad del sensor completado. En casi todos los ejemplos, pueden inmovilizarse satisfactoriamente una o más macromoléculas biológicamente activas enumeradas en las secciones anteriores o siguientes de esta descripción usando un látex de formación de película tal como Elvace o pegamento Elmer.

La porosidad de la matriz de enzima puede controlarse en un grado significativo incorporando determinados aditivos, tales como sales (por ejemplo, cloruro de sodio) o alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, eritritol, o sorbitol), en la mezcla de látex antes de la deposición. Por ejemplo, la adición del sorbitol a la formulación de látex (a aproximadamente 1 g/dL de disolución) reduce significativamente el tiempo necesario para la humectación de un sensor de urea desecado. Un periodo más corto de humectación (véase el documento US 5.112.455 de titularidad común) proporciona, a su vez, una respuesta más rápida.

En la realización preferida, el nuevo sensor de BUN está envasado en el interior de un cartucho del tipo dado a conocer en el documento US 5.096.669, que también contiene una disolución de calibrador. Está contenido en un envase de calibrador (CALPAK), que se rompe durante el análisis de la muestra de sangre. La secuencia típica de acontecimientos incluye que el CALPAK se rompe y luego la disolución de calibración pasa sobre el sensor y humedece el sensor. Normalmente, el CALPAK de los cartuchos de la técnica anterior contenía lo siguiente: iones, sodio, potasio, calcio, cloruro, bicarbonato y también tampón HEPES, glucosa, lactato, urea, creatina y creatinina.

Con respecto a la urea en el CALPACK, puesto que se descubrió que este sustrato puede crear una acumulación de producto, lo que produce la inhibición de la retroalimentación de la enzima, puede eliminarse del fluido de calibración, eliminando de ese modo la inhibición de la retroalimentación de la enzima.

La constitución preferida del CALPAK para el nuevo sensor de BUN debe incluir sodio, potasio, calcio, cloruro, amonio, bicarbonato, tampón HEPES, glucosa, lactato, creatina y creatinina. En esta realización, los iones amonio calibran el sensor de BUN, en vez de la urea .

Propiedades y fuentes de ureasa (E.C. 3.5.1.51)

Una propiedad ideal de la ureasa para esta solicitud es que tiene un nivel residual bajo de sustrato asociado (urea < 0,0002 $\mu\text{mol/unidad de enzima}$) y otros compuestos nitrogenados. Además, debe estar libre de proteasas contaminantes. Actividades específicas superiores a 700 U/mg de proteína a 25°C son características ideales. Las preparaciones de enzima también deben tener una pureza alta. Otras características deseables de la ureasa son que la K_m de la enzima se encuentre en el intervalo de 1 a 50 (mM), preferiblemente más cerca de 50 mM y que la V_{max} sea superior a 16.000 (micromol/ml/min.) y también que la K_{cat} sea de $5 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ o superior.

En la realización preferida, la fuente preferida de ureasa es la ureasa del haba blanca (E.C. 3.5.1.5) de Genzyme Diagnostics (One Kendall Square, Cambridge, MA, EE.UU., 02139). Número de artículo 70-1661-01 (K_m : 9,39 mM; V_{max} : 16187 micromol/ml/min; K_{cat} : $5,91 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$) Otra fuente de ureasa del haba blanca (E.C. 3.5.1.5) incluye; (i) Sigma-Aldrich Canada Ltd. (2149 Winston Park Drive, Oakville, Ontario, Canadá, L6H 6J8) Número de catálogo U1500, (ii) Toyobo (Toyobo Building, 17-9, Nihonbashi, Koami-cho, Chuo-ku, Tokio, 103-8530, Japón) Números de catálogo URH-201 o URH-301 y (iii) Worthington Biochemical Corporation (730 Vassar Ave, Lakewood, NJ, EE.UU., 08701)

Las enzimas ureasas también están disponibles a partir de los siguientes microorganismos; *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas syringae* (pv. tomato), *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Sulfolobus tokodaii*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*Haemophilus pleuropneumoniae*), *Bacillus pasteurii*, *Bacillus sp.* (cepa TB-90), *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica* (*Alcaligenes bronchisepticus*), *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella aerogenes*, *Lactobacillus fermentum*, *Listonella damsela* (*Vibrio damsela*), *Morganella morgani* (*Proteus morgani*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*), *Staphylococcus aureus* (cepa Mu50 / ATCC 700699), *Staphylococcus aureus* (cepa N315), *Staphylococcus aureus* (cepa MW2), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*,

Streptococcus salivarius, *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803), *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biotipo 1), *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biotipo 2), *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*Haemophilus pleuropneumoniae*), *Bacillus pasteurii*, *Bacillus* sp. (cepa TB-90), *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica* (*Alcaligenes bronchisepticus*), *Bordetella parapertussis*,
 5 *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*), *Helicobacter pylori* J99 (*Campylobacter pylori* J99), *Klebsiella aerogenes*, *Lactobacillus fermentum*, *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*), *Staphylococcus aureus* (cepa Mu50 / ATCC 700699), *Staphylococcus aureus* (cepa N315), *Staphylococcus aureus* (cepa MW2), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, *Streptococcus salivarius*, *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803), *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biotipo 1), *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biotipo 2), *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*Haemophilus pleuropneumoniae*), *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58 / ATCC 33970),
 10 *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), *Anabaena* sp. (cepa PCC 7120), *Bacillus halodurans*, *Bacillus pasteurii*; *Bacillus* sp. (cepa TB-90), *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica* (*Alcaligenes bronchisepticus*), *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Brucella abortus*, *Candidatus Blochmannia floridanus*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*), *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus fermentum*, *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Proteus mirabilis*, *Prochlorococcus marinus* (cepa MIT 9313), *Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* (cepa CCMP 1378 / MED4), *Prochlorococcus* sp. (cepa PCC 9511), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* (cepa KT2440), *Pseudomonas syringae* (pv. *tomato*), *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*), *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*), *Rhizobium leguminosarum* (biovar *viciae*), *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*), *Rhodobacter capsulatus* (*Rhodopseudomonas capsulata*), *Rhodobacter sphaeroides* (*Rhodopseudomonas sphaeroides*), *Staphylococcus aureus* (cepa Mu50 / ATCC 700699), *Staphylococcus aureus* (cepa N315), *Staphylococcus aureus* (cepa MW2), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Synechococcus elongatus* (*Thermosynechococcus elongatus*), *Synechococcus* sp. (cepa WH7805), *Synechococcus* sp. (cepa WH8102), *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803), *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biotipo 1),
 15 *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biotipo 2), *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Canavalia ensiformis* (haba blanca) (haba caballar), *Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella neoformans*), *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter pylori* J99 (*Campylobacter pylori* J99), *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*), *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de fisión), *Glycine max* (soja).
 20
 25
 30
 35

Estas enzimas pueden purificarse a partir de sus fuentes naturales o a partir de fragmentos génicos clonados de estos microorganismos y sobreexpresarse en clones recombinantes. Información adicional sobre las enzimas ureasas está actualizada en el sitio web www.expasy.ch o en las bases de datos de NCBI.

40 Propiedades y fuentes de anhidrasa carbónica (E.C. 4.2.1.1)

Una propiedad ideal de la anhidrasa carbónica para esta solicitud es que tiene niveles residuales bajos de compuestos nitrogenados y está libre de proteasas contaminantes. El vendedor cita una actividad específica superior a 2500 unidades de Wilbur-Anderson/mg de proteína a 0°C. (Wilbur, K.M. y N.G. Anderson, 1948, *Journal of Biological Chemistry*, 176: 147-154) Las preparaciones de la enzima deben ser de alta pureza.
 45

Otras características ideales de la anhidrasa carbónica son un valor de K_m de entre 1 y 50 mM, una V_{max} superior a 50 (microl/ml/min.), con un nivel ideal por encima de 10.000 y un valor de K_{cat} superior a 75, pero con un nivel ideal superior a 10^5 min^{-1} .
 50

En la realización preferida, la fuente preferida es anhidrasa carbónica bovina (E.C. 4.2.1.1) de Sigma-Aldrich Canada Ltd. (2149 Winston Park Drive, Oakville, Ontario, Canadá, L6H 6J8) número de catálogo C3934. (K_m : 1,31 mM; V_{max} : -64,4 micromol/ml/min; K_{cat} : 76,24 min^{-1}). Otra fuente de anhidrasa carbónica bovina (E.C. 4.2.1.1) es Worthington Biochemical Corporation (730 Vassar Ave, Lakewood, NJ, EE.UU., 08701).
 55

Las enzimas anhidrasas carbónicas también están disponibles a partir de los siguientes microorganismos: *Caenorhabditis elegans*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Flaveria linearis*, *Equus caballus* (caballo), *Macaca mulatta* (mono Rhesus), *Macaca nemestrina* (mono de cola de cerdo), *Monodelphis domestica* (colicorto gris), *Arabidopsis thaliana* (berro de oreja de ratón), *Bos taurus* (toro), *Gallus gallus* (pollo), *Flaveria linearis*, *Tribolodon hakonensis* (breca japonesa), *Equus caballus* (caballo), *Rattus norvegicus* (rata), *Caenorhabditis elegans*, *Bos taurus* (toro), *Ovis aries* (oveja), *Arabidopsis thaliana* (berro de oreja de ratón), *Hordeum vulgare* (cebada), *Pisum sativum* (guisante), *Spinacia oleracea* (espinaca), *Nicotiana tabacum* (tabaco común), *Arabidopsis thaliana* (berro de oreja ratón), *Hordeum vulgare* (cebada), *Pisum sativum* (guisante), *Oryctolagus cuniculus* (conejo), *Spinacia oleracea* (espinaca), *Nicotiana tabacum* (tabaco común), *Homo sapiens* (ser humano), *Mus musculus* (ratón), *virus Vaccinia* (cepa Copenhagen), *virus Vaccinia* (cepa WR), *virus Variola*, *Flaveria bidentis*, *Flaveria brownii*, *Flaveria pringlei*, *Brachydanio rerio* (pez cebra) (*Danio rerio*), *Anabaena* sp. (cepa PCC 7120), *Dunaliella salina*, *Erwinia carotovora*,
 60
 65

5 *Klebsiella pneumoniae*, *Methanosarcina thermophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori* J99 (*Campylobacter pylori* J99), *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*), *Synechococcus* sp. (cepa PCC 7942) (*Anacystis nidulans* R2), *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803), *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* (berro de oreja de ratón), *Medicago sativa* (alfalfa), *Synechococcus* sp. *Zea mays* (maíz), *Urochloa panicoides* (avena fatua), *Porphyridium purpureum*, *A. panicoides* (avena fatua), *Mycobacterium bovis*, *Synechococcus* sp. (cepa WH8102), *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus cereus* (cepa ATCC 14579 / DSM 31), *Nitrosomonas europaea*, *Phaseolus vulgaris* (judía común) (judía verde), *Lotus japonicus*, *Flaveria bidentis*, *Leptospira interrogans*, *eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), *Arabidopsis thaliana* (berro de oreja de ratón), *Gossypium hirsutum* (algodón de altura), *Riftia pachyptila* (gusano de tubo), *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*), *Methanosarcina mazei* (*Methanosarcina frisia*), *Nicotiana tabacum* (tabaco común), *Brucella melitensis*, *Salmonella typhimurium* Q92KY0, *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*) [Plásmido pSymA (megaplásmido 1)], *Coccomyxa* sp. PA *Bacillus halodurans*, *Gossypium hirsutum* (algodón de altura), *Solanum tuberosum* (patata) [cloroplasto], *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Streptomyces coelicolor*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Gossypium hirsutum* (algodón de altura), *Glycine max* (soja), *Phaseolus aureus* (judía mungo) (*Vigna radiata*), *Anthopleura elegantissima* (anémone de mar).

Estas enzimas pueden purificarse a partir de sus fuentes naturales o a partir de fragmentos génicos clonados de estos microorganismos y sobreexpresarse en clones recombinantes. Información adicional sobre enzimas anhidrasas carbónicas está actualizada en el sitio web www.expsy.ch o las bases de datos de NCBI.

20 Sistema tamponante para la matriz de enzima

En la bibliografía se notifica que el pH óptimo para la ureasa es pH 8,0. (Wall & Laidler, 1953, The Molecular Kinetics of the Urea-Urease System. IV. The Reaction in an Inert Buffer, Archives of Biochemistry and Biophysics, vol 43: 307-311). Los datos de los presentes solicitantes sugieren que un pH inferior a pH 8,0, más cerca del intervalo de pH de 6,5 a 7,4, para la preparación de ureasa proporciona una actividad de enzima óptima.

Un tampón preferido para su uso en el dispositivo de cartucho preferido es fosfato de sodio 100 mM a pH 6,8. Los tampones fosfato de sodio que oscilan desde 10 hasta 200 mM pueden usarse en la realización preferida, incluyendo dichos tampones en el intervalo de pH desde aproximadamente 6,5 hasta 7,4.

Otros tampones útiles en este dispositivo incluyen fosfato de potasio, TRIS (tris-hidroximetilaminometano), por ejemplo TRIS-H₂SO₄ (Wall & Laidler, 1953), HEPES (Cesareo & Langton, 1992; Kinetic Properties of Helicobacter pylori urease compared with jack bean urease, FEMS Microbiology Letters, vol 99: 15-22), Tampón TRIS-HCl y barbital.

Otros tampones no recomendados generalmente para su uso con ureasa son los que incluyen iones sulfito, bisulfito y fenilsulfito. (G. Fasman & C. Niemann, 1951, A reinvestigation of the kinetics of the urease-Catalyzed hydrolysis of Urea. I. The activity of urease in the presence of Sodium and Potassium Phosphate, Journal of the American Chemical Society, vol 73: 1646-1650.)

40 Membranas con ureasa y anhidrasa carbónica para su uso en dispositivos no microfabricados

La presente invención no se limita a dispositivos de detección que se microfabrican. De manera tradicional, los electrodos de detección están compuestos por estructuras de vidrio con membranas que se mantienen en su sitio sobre la punta de la estructura por medio de una junta tórica o componente de fijación similar, por ejemplo un elemento de sujeción que incorpora una membrana unida, en el que el elemento de sujeción puede acoplarse a un electrodo de manera que la membrana colinde con la superficie del electrodo selectivo de iones. La técnica anterior para sensores de urea potenciométricos de vidrio se conoce bien y puede emplear un segundo electrodo selectivo de iones (ISE) conjuntamente con la capa de enzima para detectar o bien iones amonio, a través de ISE basado en nonactina, o bien iones hidronio, a través de ISE de pH. Las membranas que contienen ureasa y que pueden unirse a un electrodo de vidrio por medio de una junta tórica se conocen bien en la técnica. También se conocen bien membranas similares para enzimas tales como glucosa-oxidasa, como en el analizador de glucosa de Yellow Springs Instruments. Se conoce bien que los instrumentos de este tipo tienen electrodos reutilizables en los que la membrana se expone a una serie de muestras y proporciona un valor de concentración de urea en la muestra para cada una. De manera intermitente o con cada muestra, la membrana también se expone a uno o más fluidos calibradores. Normalmente también se aplica un fluido de lavado a la membrana entre las muestras.

En la presente invención pueden prepararse membranas que contienen enzimas tanto ureasa como anhidrasa carbónica. Esta inmovilización puede ser o bien mediante unión covalente o bien mediante atrapamiento físico, en un medio polimérico. Tales materiales poliméricos incluyen pero no se limitan a nitrocelulosa (tal como se describe en el documento US 4.713.165); poli(alcohol vinílico), y copolímeros de poli (alcohol vinílico), polipirrol, polivinilpiridina, polialquiltiofenos (tal como se describe en el documento US 5.858.186) y poliuretano (tal como se describe en la patente US 6.673.565).

Las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica también pueden inmovilizarse, o bien mediante unión covalente o bien

mediante atrapamiento físico, en un sol-gel, o albúmina sérica bovina (BSA) reticulada con glutaraldehído (como en el documento US 4.927.516). Alternativamente, la inmovilización puede basarse en anticuerpos que se unen a ureasa y anhidrasa carbónica.

5 La realización preferida es una membrana de poliuretano preparada como sigue: (i) mezclar el tampón Tris de pH 7,8 (10 mM) y tensioactivo (por ejemplo Pluronic F-68) en un recipiente, (ii) añadir disoluciones de ureasa y anhidrasa carbónica obtenidas en el mismo tampón, (iii) añadir prepolímero de poliuretano con funcionalidad isocianato Hypol™ (Hampshire Chemical Corp., una subsidiaria de Dow Chemical) y mezclar completamente, (iv) inyectar la mezcla al interior de un molde de membrana, y (v) curar la membrana y cortarla en discos para su unión
10 en un electrodo selectivo de iones amonio.

También se proporciona una realización alternativa en que la ureasa y la anhidrasa carbónica se inmovilizan en albúmina sérica bovina (BSA) reticulada con glutaraldehído. Se deposita una capa de ureasa y anhidrasa carbónica a un espesor de aproximadamente 1 mm sobre la superficie de un electrodo selectivo de iones amonio. La capa de
15 enzima se deposita mediante un procedimiento de reticulación usando glutaraldehído como agente de reticulación. La estructura reticulada evita que la ureasa y la anhidrasa carbónica eluyan al interior de una muestra líquida. (Disolución A): Se disolvió albúmina sérica bovina al 15% en peso en una disolución de tampón fosfato de pH 8,0, y se disolvieron 1,5 g de ureasa y 0,2 g de anhidrasa carbónica en 5 mL de la disolución resultante. (Disolución B): disolución acuosa de glutaraldehído al 25%. (Disolución C): disolución acuosa de glicina al 10%. Se sumergió un
20 electrodo de alambre en la disolución A, se secó durante aproximadamente 1 min., se sumergió en la disolución B y luego se secó durante 1 min. Este procedimiento se repitió hasta que se formó una capa que tenía un espesor de aproximadamente 1 mm sobre el electrodo. El electrodo se sumergió luego en la disolución C durante 1 min., eliminando de ese modo la una enzima sin reaccionar. Esto completa la deposición de la capa de ureasa y anhidrasa carbónica.

25 Las membranas del tipo descrito en el presente documento pueden unirse a cualquier clase de sensor conocido en la técnica incluyendo sensores potenciométricos, sensores amperométricos, sensores conductimétricos, sensores ópticos, por ejemplo dispositivos de fibra óptica y de guía de onda, sensores piezoeléctricos, sensores de onda acústica y similares. Del mismo modo, la combinación de ureasa y anhidrasa carbónica puede inmovilizarse directamente sobre estos sensores por medio de reactivos de reticulación química o mediante adsorción física. El sensor óptico puede incluir un material colorante que cambia las propiedades ópticas como función de la
30 concentración de H^+ , NH_4^+ , CO_2 y HCO_3^- .

35 Sensores de BUN adicionales

Un sensor químico potenciométrico para urea puede considerarse como un sistema, que se construye a partir de componentes funcionalmente distintos. En una realización del sensor de nitrógeno ureico en sangre (BUN), la capa exterior, la que está en contacto con la disolución de analito, permite el transporte de urea mientras que también
40 sirve para inmovilizar las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de urea a amoníaco tal como se describió anteriormente. En valores de pH neutros, el amoníaco así producido existe predominantemente como iones amonio. Interponiendo una estructura estratificada separada, que contiene un ionóforo con sensibilidad y selectividad altas para iones amonio entre la capa que contiene enzimas y un electrodo indicador de plata-cloruro de plata, puede medirse la concentración de iones amonio en la superficie de contacto del electrodo. En este tipo de medición, se registra la diferencia potencial entre el electrodo indicador y un electrodo de
45 referencia.

El valor analítico de la medición se deriva del hecho de que la magnitud de la diferencia de potencial se relaciona mediante la ecuación de Nicolsky (Ec. 3, a continuación) con la concentración del analito, en este caso, urea:

$$50 \quad E = E_0 + RT/nF \log [A + \sum (a,b) k(a,b)B] \quad (3)$$

en la que E es la fuerza electromotriz medida (señal), R es la constante de ley de gases, T es la temperatura absoluta, n es el valor absoluto de la carga en la especie de analito a (por ejemplo, $n = 1$ para los iones amonio), F es la constante de Faraday, A es la actividad de la especie de analito a, B es la actividad de la especie química de
55 interferencia b, $k_{a,b}$ es el coeficiente de interferencia asociado con el efecto de la presencia de especies químicas b sobre la determinación potenciométrica electroquímica de la actividad de la especie de analito a, y E_0 es una constante independiente de T, A, o B. Para un comentario adicional de la ecuación de Nicolsky, véase Amman, D., Ion-Selective Microelectrodes, Springer, Berlín (1986) pág. 68 y referencias citadas en el mismo.

60 En una realización preferida de la presente invención, la célula unitaria para el sensor de BUN comprende un electrodo indicador de plata-cloruro de plata de película delgada que opera en combinación con un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata de película delgada.

65 Con referencia ahora a la ilustración topológica en la figura 8, la oblea de sustrato, 20, es silicio, con una capa aislante recubierta de dióxido de silicio, 15. La primera capa metálica, 10, es titanio y sirve para las funciones de un conductor y una capa de adhesión a la oblea. Las capas 4 y 4' subsiguientes, son las capas de plata y de cloruro de

plata. En el lado izquierdo de la figura 8, las capas restantes del electrodo indicador incluyen (i) una película de membrana semipermeable, 25, que comprende una capa de polímero orgánico (por ejemplo, poli(cloruro de vinilo) - PVC) y un ionóforo de iones amonio; y (ii) la biocapa exterior, 11, que comprende en este sensor particular, un látex de formación de película (por ejemplo, poli(acetato de vinilo-co-alcohol vinílico)) y una cantidad suficiente de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica.

La parte de electrodo de referencia de la célula unitaria puede comprenderse estructuras recubiertas tal como se muestra en la figura 8. En esta realización particular, las capas metálicas y cloradas del electrodo de referencia están recubiertas por una capa de electrolito, 12, que puede comprender cualquier material que permita sostener una alta concentración de sal pero que, preferiblemente sea fotoformable. A este respecto, una formulación de poli(alcohol vinílico) (PVA) es el material preferido y puede fotoestamparse en primer lugar y forma una matriz permeable al agua que posteriormente puede saturarse con una sal, tal como cloruro de potasio. También puede estar presente una membrana permeable a los gases separada, 8', que sirve para reducir la pérdida de electrolito o sal para la muestra analítica en masa pero que permite la humectación rápida (es decir, paso de H₂O u otras moléculas gaseosas pequeñas) del electrodo de referencia antes de comenzar el análisis de la muestra. No es necesario eliminar la capa 9 fotorresistente, que puede ser un remanente del procedimiento de estampado si no bloquea el paso libre del disolvente, soluto, o iones. En una realización preferida, se usa la estructura del electrodo de referencia descrita en el documento US 4.933.048, que se incorpora al presente documento como referencia. Alternativamente, puede usarse una estructura del electrodo de referencia en la que la distancia entre la unión de líquidos y la superficie de plata/cloruro de plata es suficientemente grande de manera que la concentración de electrolitos en las proximidades inmediatas de la estructura de Ag/AgCl es sustancialmente constante durante un período de tiempo suficiente para realizar una medición de la diferencia de potencial entre el electrodo indicador y el electrodo de referencia.

Tal como se ilustra en la figura 8, superpuesta sobre el electrodo indicador de un sensor de BUN hay una estructura sensible a iones amonio de película gruesa que comprende un aglutinante de poli(cloruro de vinilo) (PVC), tris(2-etilhexil)fosfato como plastificante, y nonactina como ionóforo. El electrodo indicador puede hacerse selectivo para diferentes iones usando la misma composición de aglutinante y plastificante pero con diferentes ionóforos. Por ejemplo, se ha usado valinomicina, monensina y (metil)monensina, o cloruro de tridodecilamonio para hacer electrodos selectivos de ión cloruro, sodio o potasio, respectivamente. Otros ionóforos pueden incluir, pero no se limitan a éteres corona, trialkilaminas, o ésteres de fosfato, y similares. Alternativamente, pueden usarse otros materiales de aglutinante polimérico además del PVC. Estos polímeros pueden incluir, por ejemplo, caucho de silicio, plásticos de politetrafluoroetileno, o derivados de PVC que contienen grupos funcionales ionizables (por ejemplo, carboxilatos). Otros plastificantes adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a tris(2-etilhexil)fosfato, nitrocimeno, 2-nitrofeniloctil éter, sebacato de dibutilo, adipato de dietilo, ftalatos, carbonato de propileno, 5-fenilpentanol, o mezclas de los mismos. A los expertos en la técnica aún pueden ocurrírseles otras combinaciones de ionóforo y aglutinantes, que se estén dentro del alcance de la presente invención. La película selectiva de iones semipermeable resultante puede tener un espesor en el intervalo de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 200 micras, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 micras.

Con referencia ahora a la figura 9, el electrodo indicador, 30, y el electrodo de referencia adyacente, 35, está cada uno conectado mediante una línea de señal sobrepasivada, 2, a una almohadilla de contacto, 1. La célula unitaria está confinada dentro de un área rectangular, que se repite en una serie de varios cientos de veces en una única oblea de silicio. En realizaciones particulares de la presente invención, pueden estar presentes otros electrodos indicadores en la célula unitaria para la medición simultánea de otras especies (por ejemplo, Na⁺, K⁺, o Cl⁻) además de iones amonio.

BIOCAPA de BUN

En este punto, es importante distinguir entre las propiedades de los látex de partículas y sus homólogos de formación de película. Un látex de partículas comprende una estructura polimérica sólida, tal como poliestireno, que está recubierta con un material hidrófilo lo que permite que la partícula de polímero sea transportada por el agua. Tradicionalmente se han usado materiales de látex de partículas para inmovilizar todo tipo de materiales biológicamente activos (Véase, Kraemer, D. *et al.*, patente estadounidense n.º 4.710.825). Sin embargo, una propiedad importante de algunos pero no todos los látex de partículas, que no es adecuada en la presente solicitud, es que incluso después de que estos materiales se hayan secado, las partículas pueden volver a dispersarse fácilmente en agua. Por el contrario, un látex de formación de película es una disolución coloidal que comprende un núcleo líquido polimérico móvil, tal como un acetato de vinilo, con un recubrimiento externo hidrófilo. Un látex de formación de película de este tipo se obtiene mediante un procedimiento de emulsión-polimerización en el que se añade un monómero orgánico inmiscible en agua o una mezcla de monómeros a un medio acuoso que contiene un catalizador de radicales libres. La polimerización puede iniciarse, por ejemplo, mediante agitación mecánica (Véase, por ejemplo, Vanderhoff, J. W., J. Poli. Sci. Polymer Symposium 1985, 72, 161-198). Cuando este material se seca, las partículas se fusionan para formar una película que no puede volver a dispersarse en agua. Debido a que los látex de formación de película son a base de agua y contienen tanto componentes hidrófilos como hidrófobos, puede especularse que estas composiciones pueden proporcionar un entorno de estabilización para especies

biológicamente activas, y constituyen un medio eficaz para la inmovilización o incorporación de las mismas.

Se ha hallado adicionalmente que los látex de formación de película tanto de fuentes naturales como sintéticas son de utilidad significativa. Por ejemplo, los siguientes monómeros sintéticos, sus análogos químicamente modificados, copolímeros, o mezclas de los mismos pueden usarse para obtener un látex de formación de película: acetato de vinilo, etileno, acrilato o ácido acrílico, estireno, o butadieno. Estos y muchos otros materiales conocidos por los expertos en la técnica están disponibles comercialmente de muchas fuentes incluyendo Reichhold, Air Products, DuPont, Dow Chemical, o Imperial Chemical Company. Los polímeros a base de isopreno naturales también son útiles y están disponibles de Imperial Adhesives y Chemicals, Inc. y de General Latex y Chemical Corp.

Además, estos materiales conservan sus propiedades de formación de película incluso cuando los componentes solubles en agua distintos al látex (por ejemplo, proteínas, enzimas, polisacáridos tales como agarosa, o polímeros sintéticos tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, y similares) comprenden hasta aproximadamente el 25% en peso del contenido en sólidos. A este respecto, una consideración significativa relacionada con un procedimiento de microfabricación para la producción de biosensores es que la película establecida se adhiera eficazmente a un sustrato plano incluso en presencia de grandes cantidades de aditivos (es decir, enzimas).

Pueden usarse diversos métodos para definir una capa sobre un sustrato plano. Si se requiere una capa gruesa (de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 micras), se prefiere la microdispensación de una composición viscosa de látex de formación de película (< 500 Centipoises tal como se mide en un viscosímetro RV de Brookefield). Sin embargo, si se requiere una capa delgada (de aproximadamente 0,2 a menos de aproximadamente 5 micras), se usa una composición con una viscosidad inferior que puede microdispensarse directamente sobre el electrodo indicador, o alternativamente, o bien microdispensarse o bien recubrirse por centrifugación sobre una capa de resistencia positiva (por ejemplo, Shipley AZ 1370 SF) que se ha estampado para dejar expuesta el área sobre el electrodo indicador. Cualquier disolvente adecuado conocido en la técnica, tal como acetato de n-butilo y similar, se usa luego para elevar la resistencia, junto con el látex en exceso. También puede usarse una técnica separada usando una capa fotorresistente.

El control de la energía de superficie puede usarse de manera beneficiosa para controlar la extensión del reactivo microdispensado (y, por tanto, su dimensionalidad, tal como el espesor). Un tratamiento con plasma con fluorocarbono (por ejemplo, CF_4), de una capa de poliimida que rodea al electrodo indicador hace que el látex de base acuosa muestre un ángulo de contacto alto (es decir, minimiza la extensión y maximiza el espesor).

Para inmovilizar una o más especies biológicamente activas en una capa de látex es posible o bien mezclar las especies con el látex antes de la deposición o bien impregnar la capa tras la deposición. La estabilidad de las especies biológicamente activas, particularmente de las enzimas, normalmente se mejora añadiendo un agente de reticulación o bien antes o bien tras la deposición. Estos agentes de reticulación se conocen bien en la técnica y pueden incluir compuestos tales como glioxal, glutaraldehído, melamina-formaldehído, urea-formaldehído, y fenol-formaldehído. Otros agentes de reticulación adecuados pueden poseer al menos dos grupos funcionales que pueden incluir vinilo, carboxilo, anhídrido, amina, amida, epóxido, hidroxilo, ciano, isocianato, tiol, halo, además de formilo, y combinaciones estables de estos grupos funcionales (por ejemplo, un cloroalquilepóxido). Estos aditivos con frecuencia pueden mejorar significativamente la resistencia a la humedad de la biocapa y prolongar el término de caducidad del sensor completado.

En una realización particular de la presente invención, se usa un látex de formación de película para inmovilizar las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica. Se logra una actividad enzimática superior en este caso en comparación con un sensor de urea que contiene ureasa sola.

La porosidad de la capa de enzima (biocapa) puede controlarse en un grado significativo incorporando determinados aditivos, tales como sales (por ejemplo, cloruro de sodio) o alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, eritritol, o sorbitol), en la mezcla de látex antes de la deposición. Por ejemplo, la adición del sorbitol a la formulación de látex (1 g/dL de disolución) reduce significativamente el tiempo necesario para la humectación de un sensor de urea desecado. Un periodo más corto de humectación proporciona que puedan facilitarse resultados para análisis de sangre más rápidamente. Para fabricar el sensor de base, se coloca una oblea de silicio con una capa tópica de dióxido de silicio, que previamente se ha limpiado de manera escrupulosa con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno en un sistema de deposición de plasma y se realiza un bombardeo catódico de capas de titanio (0,1 micras) y plata (0,5 micras) de manera consecutiva sobre la superficie de la oblea. La bicapa de plata-titanio se procesa luego para situarla en una zona, que en el dispositivo final actúa como el sensor de iones amonio. Este proceso se logra mediante una técnica litográfica convencional en la que la oblea se recubre por centrifugado con resistencia positiva (Shipley AZ 1370 SF). Tras la exposición UV de la fotorresistencia a través de una máscara y el revelado (Shipley AZ 351), se elimina la plata expuesta mediante una disolución acuosa de nitrato férrico (0,9 mM) como solución de ataque. La capa de titanio subyacente se procesa entonces por medio de las mismas etapas fotolitográficas, pero usando una mezcla acuosa de ácido nítrico (3,9 M) y se usa ácido fluorhídrico (0,78 M) como solución de ataque. Entonces se usa el disolvente N-metilpirrolidona para eliminar la fotorresistencia restante para exponer las estructuras de plata requeridas (con un diámetro de aproximadamente 150 micras).

Para pasivar las líneas de señales se recubre por centrifugado una poliimida fotodefinible (DuPont 2703) sobre la oblea. Una vez que la oblea se expone a UV y se revela con un disolvente, el polímero se introduce en un horno a 350°C. durante 30 minutos a una atmósfera inerte y se deja enfriar hasta 150°C. antes de retirarla.

5 La plata se clora sumergiendo la oblea entera en una disolución acuosa de dicromato de potasio (12 mM) y ácido clorhídrico (60 mM). Sobre estos electrodos de cloruro de plata estampados se coloca una membrana de sensible a iones amonio. El material de membrana se obtiene disolviendo PVC de peso molecular bajo (Sigma) y PVC
10 carboxilado de un peso molecular alto (Type Geon, Goodrich) (1:1 p/p) en un sistema de disolvente de ciclohexanona, propiofenona, y N-metilpirrolidona (1:1:1 v/v/v) hasta un contenido en sólidos total de 10 g/dL de disolución. La disolución se logra calentando la mezcla a 70°C. durante 30 minutos. A esta mezcla se añade el
15 plastificante tris(2-etilhexil)fosfato (Fluka), para proporcionar un contenido en sólidos total de 35 g/dL. La mezcla resultante se deja enfriar entonces hasta 45°C. y se añade nonactina (Fluka) en la cantidad equivalente al 2 por ciento de los sólidos totales en la mezcla. A temperatura ambiente, 10-100 nL de este material final se
20 microdispensan sobre cada uno de los electrodos indicadores de cloruro de plata en la oblea, superponiéndose sobre todos los lados en al menos aproximadamente 30 micras. El curado se logra colocando la oblea sobre una placa caliente a 60°C. durante 30 minutos. Este procedimiento proporciona una estructura fuerte y estable que tiene un espesor de aproximadamente 15 micras. Entonces se lava la oblea y se corta parcialmente en dados. La disolución de ureasa se prepara añadiendo 305 mg de ureasa (Genzyme, n.º de catálogo 1661, ureasa de haba
25 blanca E.C. 3.5.1.5 >300 unidades/mg de actividad específica, libre de amoniaco < 0,0002 mol/unidad) a un tubo de plástico estéril, al que se añadieron 2,20 g de tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8 al tubo y se mezcló suavemente en hielo. La disolución de anhídrido carbónico se prepara por separado añadiendo 0,3 g de anhídrido
30 carbónico (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo C3934) a 1 ml de tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8 en un tubo de plástico estéril y se mezcla suavemente en hielo. Se prepara una disolución de PVA añadiendo 1,4500 g de PVA (Polisciencias, N.º de catálogo 04398 o Aldrich, N.º de catálogo 36,310-3) a 27,4900 g de agua estéril desionizada, que se mezcla en una placa de agitación a 150°C que luego se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se prepara una disolución de microdispensación añadiendo 2,33 g de la disolución de ureasa a 3,38 g de látex (ELVACE Reichold, N.º de catálogo 40711-00), 0,58 mL de la disolución de anhídrido carbónico, 1,55 g de fosfato de sodio
35 100 mM, pH 6,8, 1,12 g de disolución de PVA.

30 Las siguientes formulaciones pueden cargarse en un conjunto de microjeringa para establecer capas sensibles a iones de manera controlable. El conjunto de microjeringa está equipado preferiblemente con agujas de calibre de 25 a 30 (EFD Inc.) que tienen un diámetro interno de 150 micras y un diámetro externo de 300 micras. Normalmente, la
35 aguja de la microjeringa, que incluye un elemento alargado y una punta de la aguja, están constituida por un material metálico, como acero inoxidable. Pueden recubrirse capas adicionales sobre la aguja para cambiar sus propiedades de superficie. Además, también pueden emplearse otros materiales tales como polímeros sintéticos en la fabricación del cuerpo principal de la propia aguja. Dependiendo del tratamiento previo de la superficie de electrodo y de la cantidad de volumen del fluido aplicado, pueden obtenerse de manera constante capas de membrana de un espesor que oscila desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 200 micras.

40 SISTEMA DE MICRODISPENSACIÓN AUTOMATIZADO

Un aspecto importante del procedimiento de microfabricación descrito en la presente invención es un sistema automatizado, que puede microdispensar cantidades precisas y programables de los materiales usados en los
45 sensores de interés. El sistema de microdispensación comprende un soporte de mantenimiento en vacío y una jeringa, estando unido cada uno de ellos a medios separados para alterar uno o más del desplazamiento en vertical, horizontal, lateral, o rotacional de estos elementos. Por motivos económicos, es suficiente tener medios para cambiar el desplazamiento vertical de la jeringa siempre que se pueda cambiar la posición del soporte de mantenimiento en vacío de manera multidireccional. Los movimientos de ambos elementos pueden controlarse a través de un ordenador personal. La posición del soporte de mantenimiento en vacío puede reproducirse dentro de
50 +-13 micras o mejor en cualquiera de las direcciones x o y.

Los tamaños de gota que pueden dispensarse de manera reproducible se extienden a lo largo de un intervalo amplio. Para tamaños de volumen entre de aproximadamente 5 y aproximadamente 500 nanolitros (nL), las gotas
55 pueden aplicarse con una precisión de aproximadamente el 5%. Un solenoide que tiene un 0,1% de clasificación de precisión es suficiente para este propósito. La altura de la punta de la aguja de la jeringa por encima del sensor debe ser de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 mm, dependiendo del volumen que vaya a dispensarse: generalmente, cuanto más pequeño sea el volumen de la gota, menor será la elevación de la aguja desde el sensor.

60 El alineamiento preciso de la aguja de la jeringa con el área preseleccionada del sensor puede lograrse ópticamente por medio de una cámara y una retícula. Tal funcionamiento puede realizarse manualmente por un operario o automáticamente por medio de un sistema de reconocimiento visual.

MICRODISPENSACIÓN VOLUMÉTRICA DE FLUIDOS

65 En este punto resulta útil considerar las dinámicas involucradas cuando se forma una única gota de fluido en y se expulsa de una aguja.

5 A medida que se expulsa más fluido de la punta de la aguja, la gota crecerá en tamaño hasta que la fuerza gravitacional que actúa sobre la masa de la gota supere las fuerzas opuestas que mantienen el contacto con la punta de la aguja. Estas fuerzas opuestas incluyen las fuerzas adhesivas entre la punta de la aguja y el fluido o líquido, y la tensión superficial del propio líquido. Está bien establecido que a velocidades de flujo de líquido bajas en las que se completa la formación de la gota diferenciada, el volumen de gota es fijo. Sin embargo, el volumen puede cambiarse variando cualquiera de los parámetros relacionados con fluidos comentados anteriormente, o cambiando el diámetro de la punta de la aguja, cambiando así el área superficial disponible para la adhesión de fluido. Por ejemplo, un recubrimiento de politetrafluoroetileno hidrófobo (PTFE) aplicado a la punta de la aguja reduce el tamaño de gota natural de un material de látex de base acuosa reduciendo las fuerzas adhesivas entre la gota y la punta de la aguja.

15 En circunstancias en las que debe microdispensarse un volumen controlado sobre una superficie, es posible tener la punta de la microjeringa ubicada por encima de la superficie plana a una altura que no permite que la gota se forme completamente (y luego que caiga a la superficie con la influencia de la gravedad), pero la gota parcialmente formada en realidad entra en contacto con la superficie y las nuevas fuerzas adhesivas entre el líquido y la superficie comienzan a extender la gota. Si la punta de la aguja se retrae ahora en la dirección Z una distancia lo suficientemente lejos de la superficie, entonces se superan las fuerzas cohesivas del líquido y un volumen de líquido inferior que el tamaño fijo de la gota permanecerá en contacto con la superficie. Esta técnica puede usarse para dispensar de manera reproducible cualquier volumen de líquido desde aproximadamente una milésima del tamaño fijo de la gota y superior.

COMPOSICIONES DE FLUIDOS CON TENSIÓN SUPERFICIAL PREDETERMINADA

25 La tensión superficial entre un líquido puro y su fase de vapor puede cambiarse añadiendo reactivos. Por ejemplo, un ácido graso añadido al agua reduce la tensión superficial, mientras que las sales añadidas pueden aumentar la tensión superficial.

30 Las composiciones del fluido microdispensable de la presente invención se preparan para que tengan una tensión superficial optimizada y controlada. Los aditivos adecuados se usan cuando es necesario. La hidrofobicidad o hidrofiliidad del fluido se controla de la misma manera. Cuando se requiere una membrana curada como producto final, el contenido en sólidos y el contenido en disolventes volátiles se ajustan de manera cuidadosa. Además, también se usa la razón de estos componentes para controlar la viscosidad.

35 Las composiciones microdispensables preferidas para el sensor de iones amonio comprenden polímero de PVC, plastificantes, ionóforos y disolventes con viscosidades generalmente superiores que las que se usan para una colada plana (por ejemplo, centrifugado) de membranas. Estas composiciones de viscosidad superior se curan o se secan sin deformación de la capa de membrana. Problemas relacionados, por ejemplo, el de garantizar la homogeneidad de la matriz a alta viscosidad y por tanto evitar la separación de fases de los materiales con el tiempo (es decir, consideraciones relacionadas con el término de caducidad) también se alivian mediante estas composiciones. También se usan otros aditivos para evitar la degradación de las membranas a largo plazo. Finalmente, el sistema de disolvente se selecciona para proporcionar la tensión superficial y la estabilidad apropiadas. Para los sensores de NH_4^+ , el contenido en sólidos (% en peso) de plastificante, polímero de PVC, e ionóforo preferiblemente es del 60-80%, el 15-40% y el 0,5-3%, respectivamente.

45 MÉTODOS PARA ADAPTAR LA ENERGÍA DE SUPERFICIE DE UNA ESTRUCTURA PLANA

Además de los factores descritos anteriormente en relación con la dispensación volumétrica controlada de fluidos que tienen una tensión superficial optimizada asociada con una composición prescrita, la adaptación de la energía libre de superficie del sustrato, o la superficie sobre la que se dispensa el fluido, proporciona control sobre las dimensiones finales, especialmente el espesor, de la capa resultante. El proceso resultante es altamente versátil, permitiendo la deposición de series de capas de composición y utilidad variadas.

55 Para establecer membranas espesas, (por ejemplo, 40-60 micras de espesor), se adapta preferiblemente la superficie de modo que el ángulo de contacto que forma el fluido microdispensado con la superficie sea grande. Por ejemplo, antes de microdispensar una membrana de látex acuosa, la superficie se somete primero a tratamiento de plasma con tetrafluoruro de carbono para producir un ángulo de contacto con el agua (fluido control) en el intervalo de 50°-70°.

60 Construcción del cartucho:

La realización preferida proporciona cartuchos y métodos de su uso para procesar muestras de líquido para determinar la presencia o la cantidad de un analito en la muestra.

65 Con referencia a las figuras, el cartucho de la presente invención comprende una cubierta (dos vistas), figuras 10, 11, una base, figura 13, y una junta de estanqueidad de cinta adhesiva de película delgada, figura 12, dispuesta

entre la base y la cubierta y que las sujeta. Específicamente, el lado posterior de la cubierta mostrada en la figura 10 está acoplado a la cara expuesta de la junta de estanqueidad de la figura 12, y el lado posterior de la junta de estanqueidad está acoplado a la cara expuesta de la base de la figura 13. Con referencia ahora a la figura 10, la cubierta 1 está compuesta por un material rígido, preferiblemente plástico, y puede tener una deformación repetitiva en zonas 5, 9, 10 de articulación flexibles sin romperse. La cubierta comprende una tapa 2, unida al cuerpo principal de la cubierta mediante una articulación 9 flexible. En funcionamiento, tras la introducción de una muestra en la cámara 34 que contiene la muestra, la tapa puede sujetarse sobre la entrada al acceso 4 de entrada de la muestra, lo que evita una fuga de la muestra por medio de un sello 11 deformable, y la tapa se mantiene en su sitio mediante un gancho 3. La cubierta comprende además dos paletas 6, 7, que pueden moverse en relación con el cuerpo de la cubierta, y que están unidas a ésta mediante zonas 5,10 de articulación flexibles. En el funcionamiento, cuando se operan mediante un medio de bomba, la paleta 6 ejerce una fuerza sobre un depósito de aire que comprende la cavidad 43, que está cubierta por la junta 21 de estanqueidad de película delgada, para desplazar fluidos dentro de los conductos del cartucho. Cuando se opera mediante un segundo medio de bomba, la paleta 7 ejerce una fuerza sobre la junta 21 de estanqueidad, que puede volver a formarse. El cartucho está adaptado para su inserción en un aparato de lectura, y por tanto tiene una pluralidad de conexiones mecánicas y eléctricas para este fin. También debe resultar evidente que es posible la operación manual del cartucho. Por tanto, tras la inserción del cartucho en un aparato de lectura, el aparato de lectura transmite presión sobre un envase de lámina metálica que contiene fluido lleno con aproximadamente 130 uL de fluido calibrador situado en la cavidad 42, rompiendo el envase con la punta 38, y expulsando fluido al interior del conducto 39, que está conectado a través de un conducto de sección transversal corta en la base al conducto de sensor, 12. Cuando el fluido calibrador se pone en contacto con los sensores, se humectan y establecen una señal asociada con la cantidad de iones de calibración o moléculas en el fluido.

Con referencia a la figura 12, la junta 21 de estanqueidad de película delgada comprende diversos orificios y rendijas para facilitar la transferencia de fluido entre los conductos dentro de la base y la cubierta, y para permitir que la junta de estanqueidad se deforme con la presión cuando sea necesario. Los orificios 30 y 33 permiten que uno o más sensores de urea y uno o más electrodos de referencia que están alojados dentro de cualquier recorte 35 ó 37, pongan en contacto el fluido dentro del conducto 12.

Con referencia a la figura 13, el conducto 34 es la cámara que contiene la muestra que conecta el acceso 4 de entrada de muestra con el primer conducto 15 en el cartucho montado. Los recortes 35 y 37 alojan opcionalmente un sensor conductimétrico para determinar la posición de límites de aire-líquido. Un rebaje 42 aloja un envase que contiene fluido, por ejemplo, una bolsa que puede romperse, en el cartucho montado que se perfora mediante la punta 38 debido a la presión ejercida con la paleta 7 al insertarse en un aparato de lectura. El fluido desde el envase perforado fluye al interior del segundo conducto en 39 y luego al interior del conducto 12. Un depósito de aire comprende el rebaje 43 que está sellado en su superficie superior mediante una junta 21 de estanqueidad. El depósito de aire es una realización de un medio de bomba, y se acciona mediante la presión aplicada a la paleta 6 que desplaza aire en el conducto 40 y de ese modo desplaza la muestra desde la cámara 34 de muestras al interior del conducto 15 y luego al 12.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para detectar urea en una muestra, que comprende: (a) un sensor con el que puede ponerse en contacto una muestra que se sospecha que contiene urea, incluyendo el sensor ureasa y anhidrasa carbónica inmovilizadas sobre al menos una parte de un único electrodo de dicho sensor, y (b) un sistema detector para procesar señales desde el sensor, en el que el dispositivo está configurado para inhibir el intercambio de gases desde la muestra hacia un espacio de aire en una zona de la ureasa y la anhidrasa carbónica inmovilizadas.
- 10 2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que dicho sensor comprende un sensor selectivo de iones amonio.
- 15 3. Dispositivo según la reivindicación 2, en el que el sensor selectivo de iones amonio incluye uno o más de los siguientes:
 - (a) un ionóforo de amonio;
 - (b) nonactina; o
 - 20 (c) polímero plastificado.
- 25 4. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que dicho sensor comprende uno o más de los siguientes:
 - (a) un sensor de pH;
 - (b) un sensor de dióxido de carbono o bicarbonato, y
 - (c) un sensor de conductividad.
- 30 5. Dispositivo según cualquier reivindicación anterior, que comprende además un segundo sensor sin dichas enzimas inmovilizadas.
- 35 6. Dispositivo según la reivindicación 5, en el que el sensor y el segundo sensor se seleccionan independientemente de un electrodo potenciométrico, un electrodo conductimétrico, un sensor óptico y combinaciones de los mismos.
- 40 7. Dispositivo según cualquier reivindicación anterior, en el que el sensor comprende un electrodo potenciométrico selectivo de iones amonio.
- 45 8. Dispositivo según cualquier reivindicación anterior, en el que la ureasa y la anhidrasa carbónica están inmovilizadas en una capa, comprendiendo dicha capa una matriz permeable al agua.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, en el que la matriz permeable al agua comprende un látex de formación de película.
- 50 10. Dispositivo según la reivindicación 9, en el que dicho látex de formación de película comprende un copolímero de etileno y acetato de vinilo.
- 55 11. Dispositivo según cualquier reivindicación anterior, en el que al menos una de las enzimas está inmovilizada a través de un reactivo químico de reticulación, y/o a través de absorción física.
12. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la capa comprende además un tampón.
- 60 13. Dispositivo según la reivindicación 12, en el que dicho tampón se selecciona de fosfato, TRIS, HEPES, y combinaciones de los mismos.
- 65 14. Dispositivo según las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho látex de formación de película incluye un tampón seleccionado del fosfato, TRIS, HEPES, y combinaciones de los mismos.
15. Membrana que comprende una matriz permeable al agua en la que están incluidas al menos dos enzimas, ureasa y anhidrasa carbónica, estando configurada la membrana en un dispositivo de manera que inhibe el intercambio de gases desde una muestra hacia un espacio de aire en una zona de la membrana.
16. Membrana según la reivindicación 15, en la que dichas al menos dos enzimas están inmovilizadas en dicha matriz permeable al agua.

17. Membrana según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, que está en contacto físico con un electrodo selectivo de iones, y/o con un detector.
- 5 18. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que está unida físicamente a un electrodo selectivo de iones por medio de una junta tórica.
19. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que está unida a un elemento de sujeción que puede acoplarse a un electrodo selectivo de iones.
- 10 20. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que se forma aplicando una mezcla líquida sobre una superficie y permitiendo que dicha mezcla líquida se seque sobre dicha superficie.
- 15 21. Membrana según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, que comprende un polímero seleccionado de acetato de celulosa, nitrocelulosa, poliuretano, albúmina sérica bovina reticulada mediante glutaraldehído, acrilamida, celofán, látex de formación de película, y mezclas de los mismos.
22. Uso de una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en un dispositivo de detección de urea.
- 20 23. Uso según la reivindicación 22, en el que el dispositivo de detección de urea se selecciona de un electrodo potenciométrico selectivo de iones, un sensor óptico, un electrodo conductimétrico, y combinaciones de los mismos.
- 25 24. Uso según la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en el que el dispositivo de detección de urea comprende un sensor microfabricado.
25. Uso según la reivindicación 24, en el que el sensor microfabricado comprende un electrodo selectivo de iones.
- 30 26. Uso según la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en el que el sensor microfabricado responde a iones amonio.
- 35 27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el que dicha membrana permeable al agua es látex.
28. Dispositivo según la reivindicación 1. en el que el electrodo está recubierto con una primera capa, comprendiendo dicha primera capa un polímero plastificado, ionóforo de amonio, y en el que la ureasa y la anhidrasa carbónica están inmovilizadas en dicha primera capa.
- 40 29. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el electrodo está recubierto con una primera capa, comprendiendo dicha primera capa un polímero plastificado e ionóforo de amonio, y
- 45 una segunda capa ubicada sobre y en contacto con al menos una parte de dicha primera capa, comprendiendo dicha segunda capa una matriz permeable al agua en la que está incluida la ureasa inmovilizada y la anhidrasa carbónica inmovilizada.
30. Dispositivo según la reivindicación 29, en el que dicha ureasa y anhidrasa carbónica están inmovilizadas en dicha matriz permeable al agua.
- 50 31. Dispositivo de detección microfabricado para detectar urea en una muestra que comprende:
- (a) un sustrato sustancialmente plano que tiene una superficie de microelectrodo estampada,
- 55 (b) una primera capa sobre al menos una parte de dicho sustrato que comprende un polímero plastificado y nonactina, y
- (c) una segunda capa ubicada sobre al menos una parte de dicha primera capa, que comprende una matriz permeable al agua en la que está incluida al menos ureasa y anhidrasa carbónica,
- 60 en el que la ureasa y la anhidrasa carbónica están inmovilizadas sobre al menos una parte de un único electrodo, y
- 65 en el que el dispositivo está configurado para inhibir el intercambio de gases desde una disolución de muestra hacia un espacio de aire en una zona de la urea y anhidrasa carbónica inmovilizadas.

32. Dispositivo de detección microfabricado según la reivindicación 31, que comprende además una o más de las siguientes características:
- 5 (a) el polímero es poli(cloruro de vinilo);
- (b) la superficie de microelectrodo estampada establece un potencial en respuesta a la presencia de iones amonio;
- 10 (c) la ureasa y anhidrasa carbónica están inmovilizadas en dicha matriz permeable al agua; y
- (d) la primera y segunda capa están microdispensadas.
33. Método para someter a ensayo urea en una muestra, que comprende: poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene urea con un sensor que comprende ureasa inmovilizada y anhidrasa carbónica inmovilizada, y
- 15 detectar un resto químico con un sensor seleccionado del grupo que consiste en un sensor de iones amonio, un sensor de pH, un sensor de dióxido de carbono, un sensor de bicarbonato, un sensor de conductividad,
- 20 en el que el dispositivo está configurado para inhibir el intercambio de gases desde la muestra hacia un espacio de aire en una zona de la ureasa inmovilizada y la anhidrasa carbónica inmovilizada.
34. Método según la reivindicación 33, en el que dicho resto químico es ión amonio.
- 25 35. Método según la reivindicación 34, en el que la cantidad de iones amonio detectada es una función de la cantidad de urea en la muestra.
36. Método según la reivindicación 35, en el que dicho sensor es potenciométrico y dicha función es sustancialmente logarítmica.
- 30 37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, que comprende además calibrar dicho sensor exponiendo dicho sensor a un fluido acuoso, que contiene una cantidad conocida de iones amonio, antes o después de que dicha muestra se ponga en contacto con el sensor.
- 35 38. Método para mejorar la sensibilidad de un sensor de urea, comprendiendo el sensor un detector y ureasa inmovilizada, comprendiendo el método: añadir una cantidad eficaz de anhidrasa carbónica inmovilizada, a dicho sensor,
- 40 en el que dicho sensor está configurado para inhibir el intercambio de gases desde una muestra hacia un espacio de aire en una zona de la ureasa y la anhidrasa carbónica inmovilizadas.
39. Método según la reivindicación 38, en el que dicho detector comprende uno o más de los siguientes:
- 45 (a) un sensor selectivo de iones amonio;
- (b) un sensor de pH;
- 50 (c) un sensor de dióxido de carbono o un sensor de bicarbonato; y
- (d) un sensor de conductividad.
40. Método según la reivindicación 39, que comprende usar un segundo detector sin la ureasa y la anhidrasa carbónica para medir una señal de diferencia.
- 55

FIG. 1

Respuesta del sensor de BUN i-STAT como función de la concentración de urea: muestras acuosas y de sangre completa

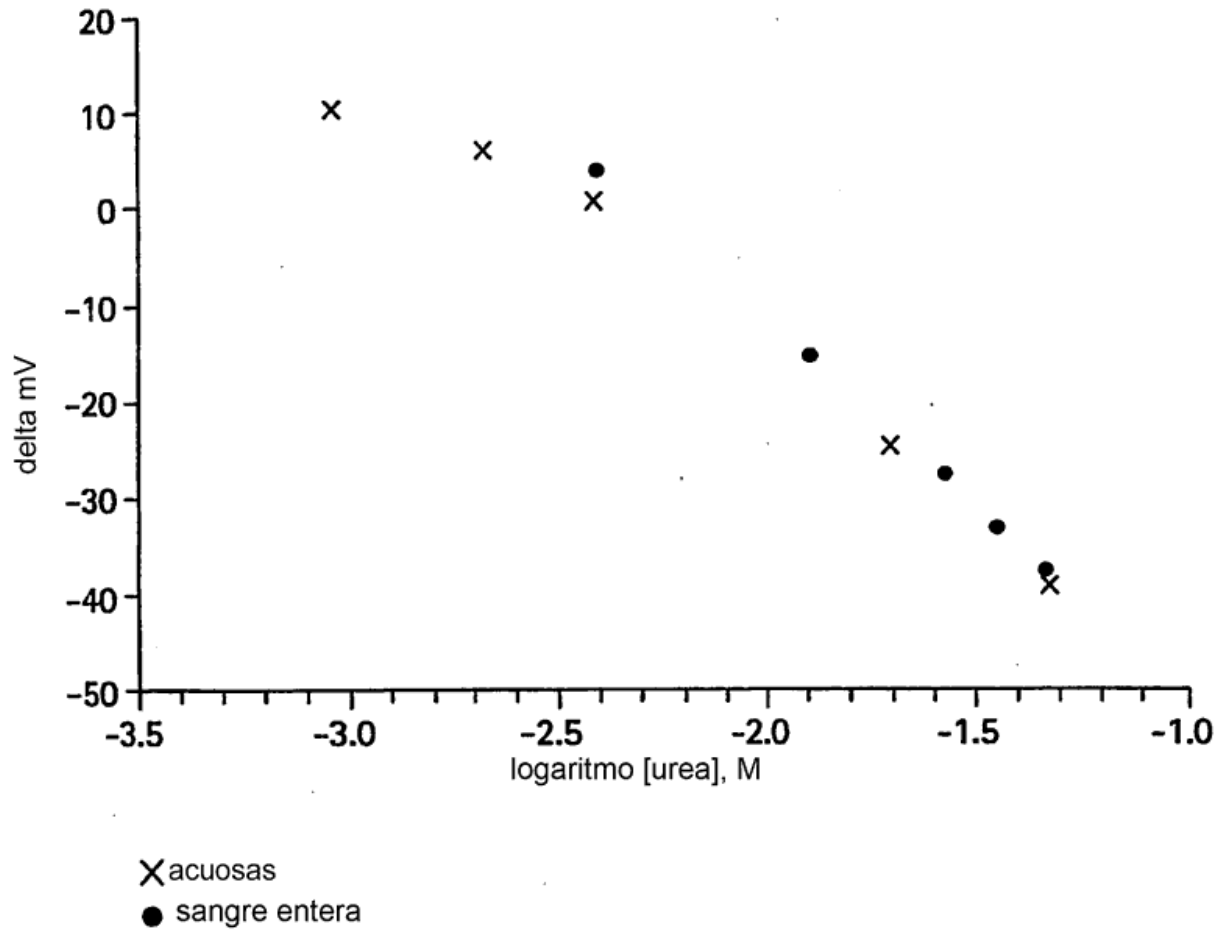


FIG. 2

Valoración con NaOH de lotes de polímero Elvace

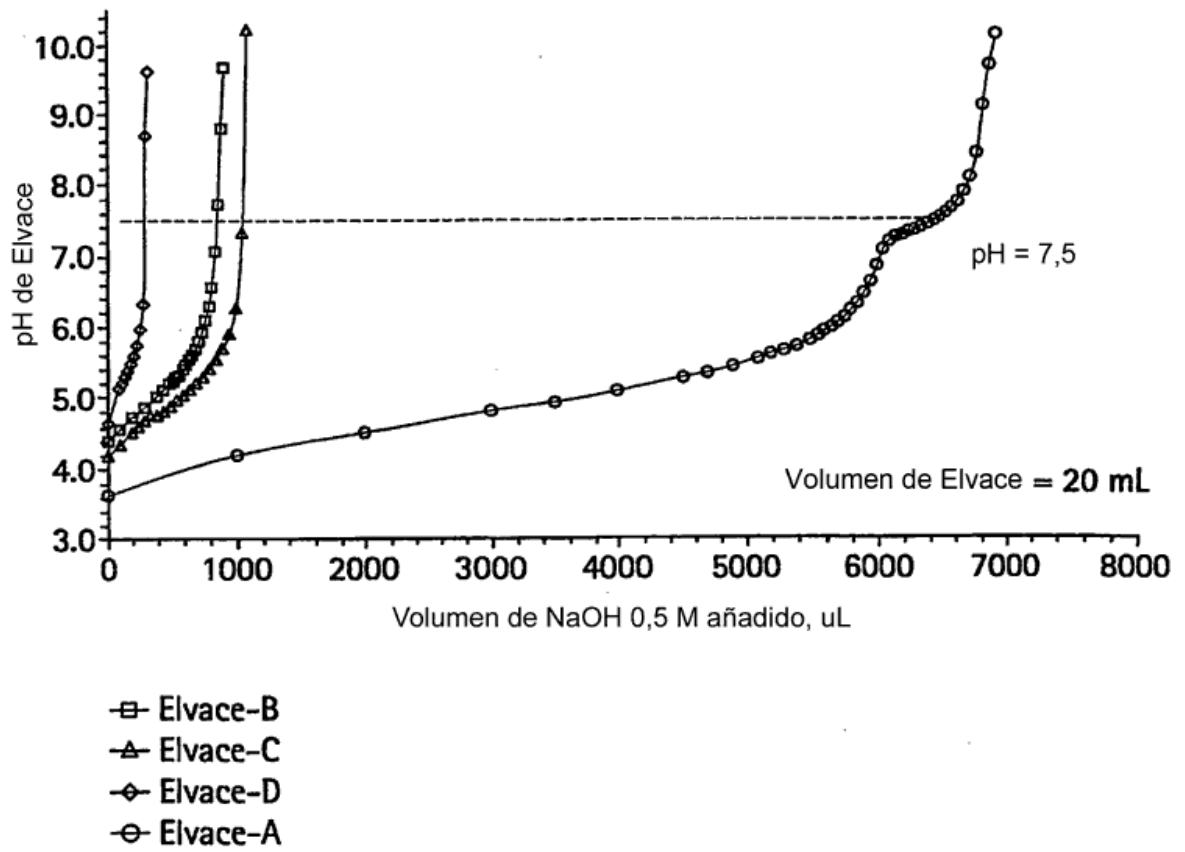


FIG. 3

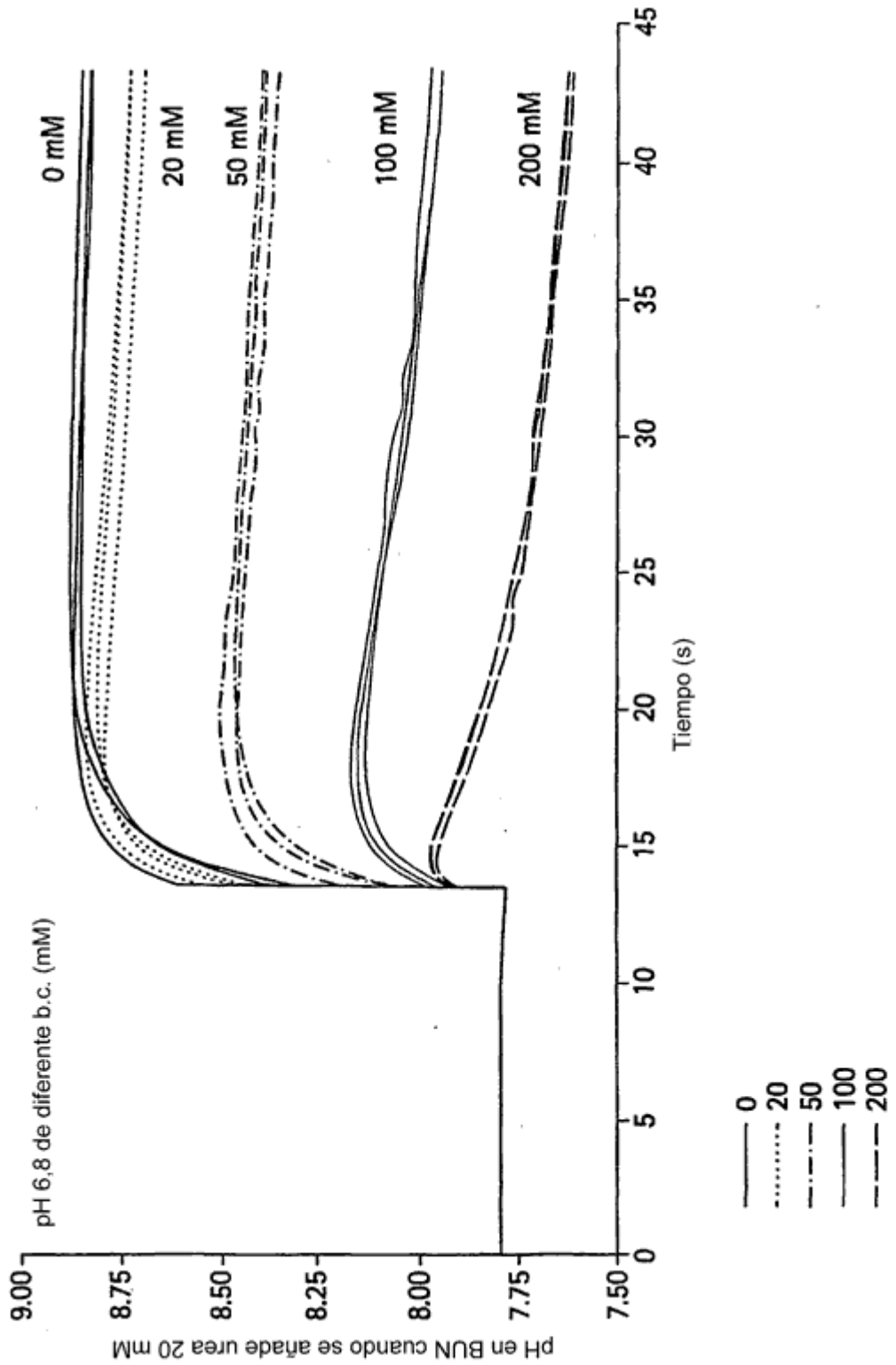


FIG. 4A

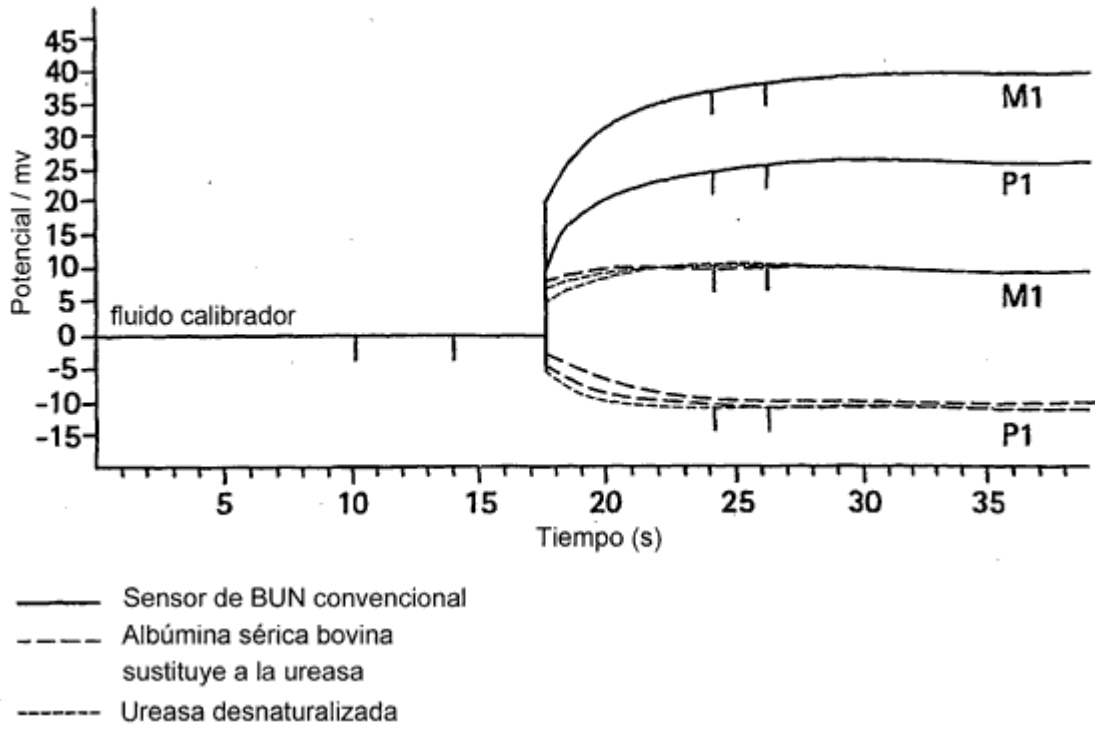


FIG. 4B

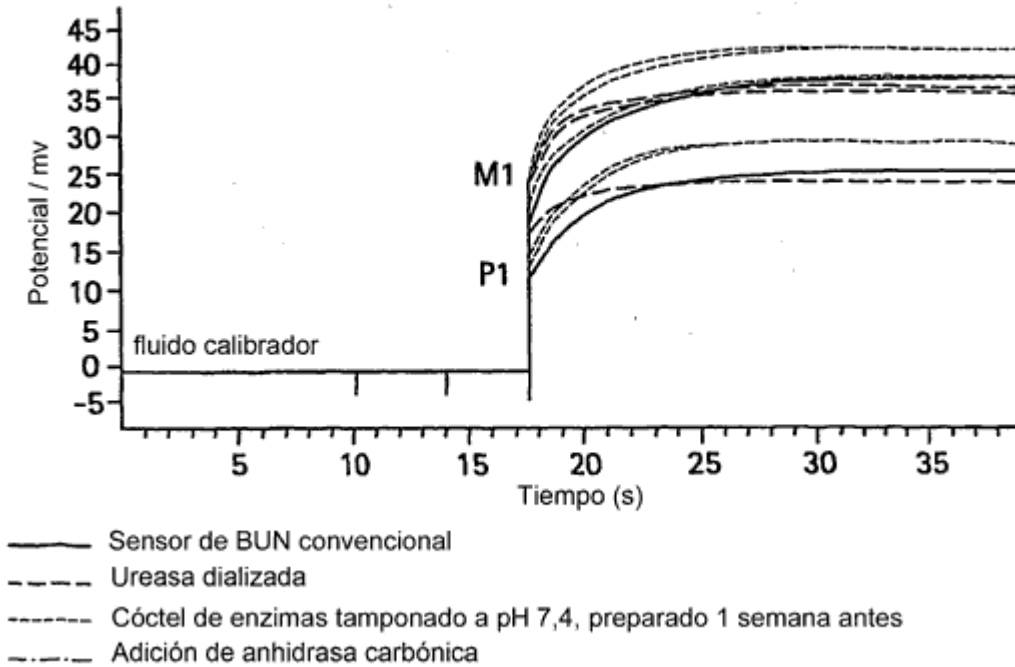


FIG. 5

Sensor de BUN con modificaciones en la capa de enzima, sangre completa, día 1

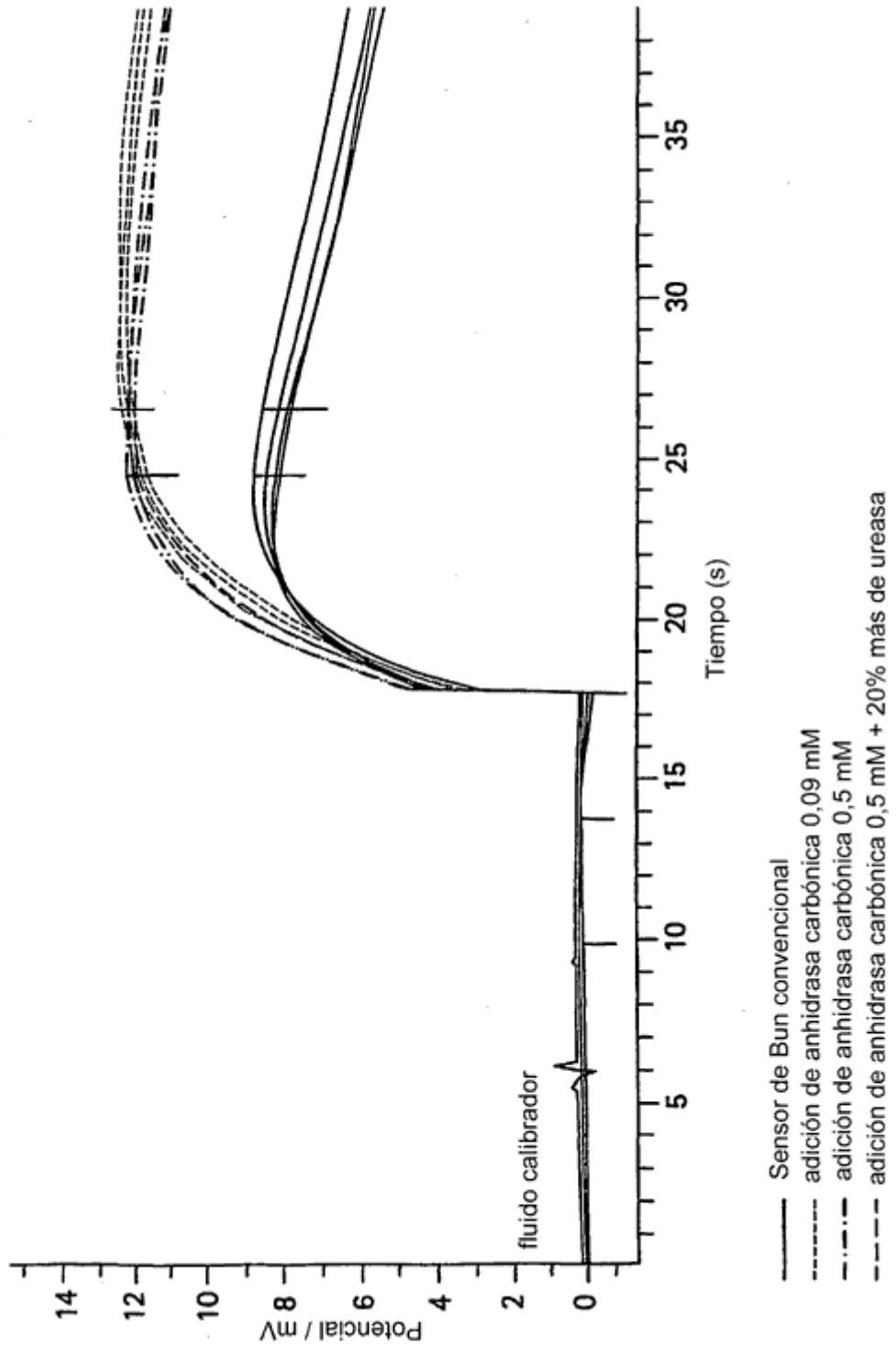


FIG. 6

Sensor de BUN con modificaciones a la capa de enzima, sangre completa, incubación de 4 días a 40°C

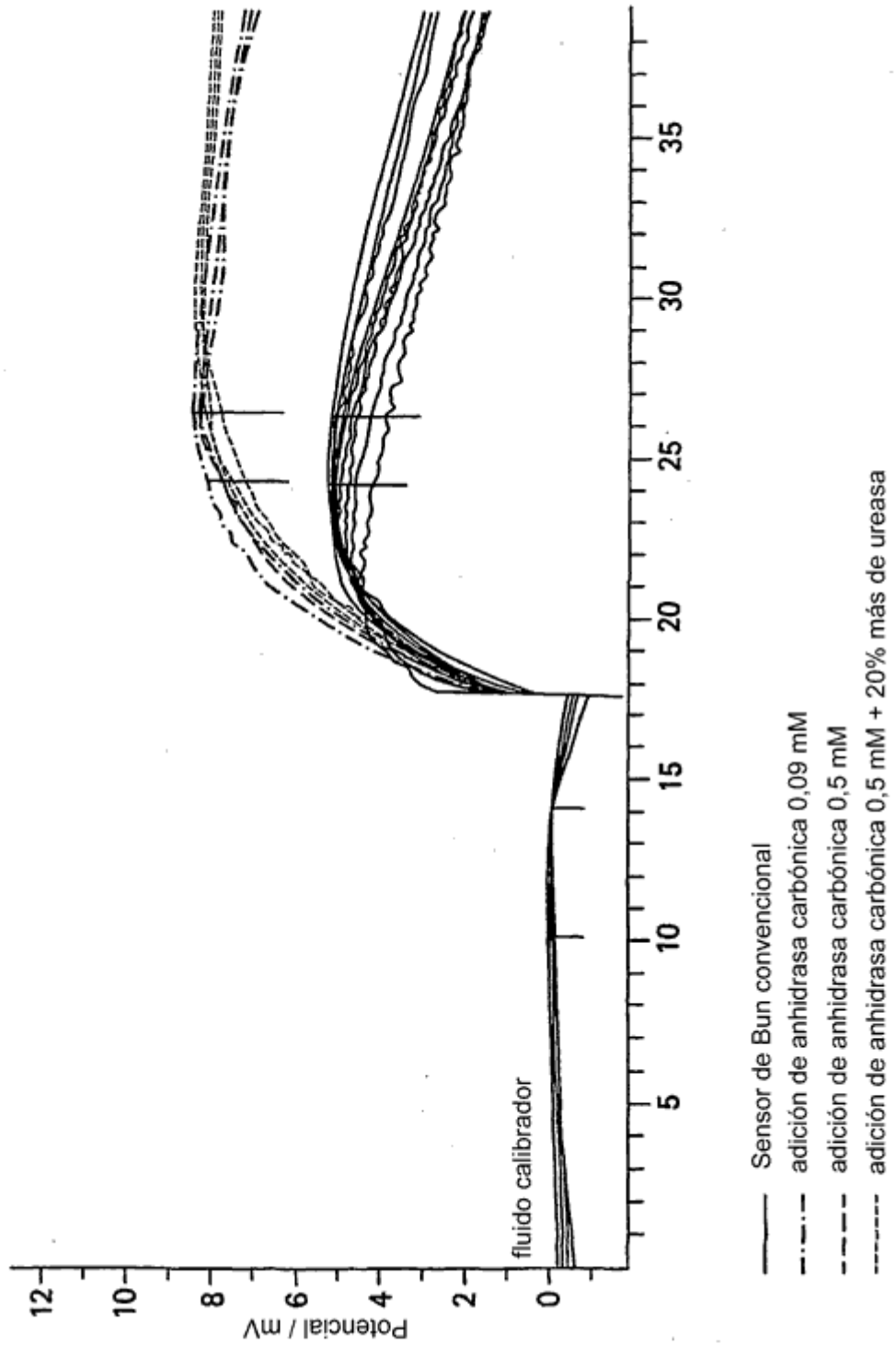


FIG. 7

Sensor de BUN con modificaciones a la capa de enzima, fluido acuoso M1, incubación de 4 días a 40°C

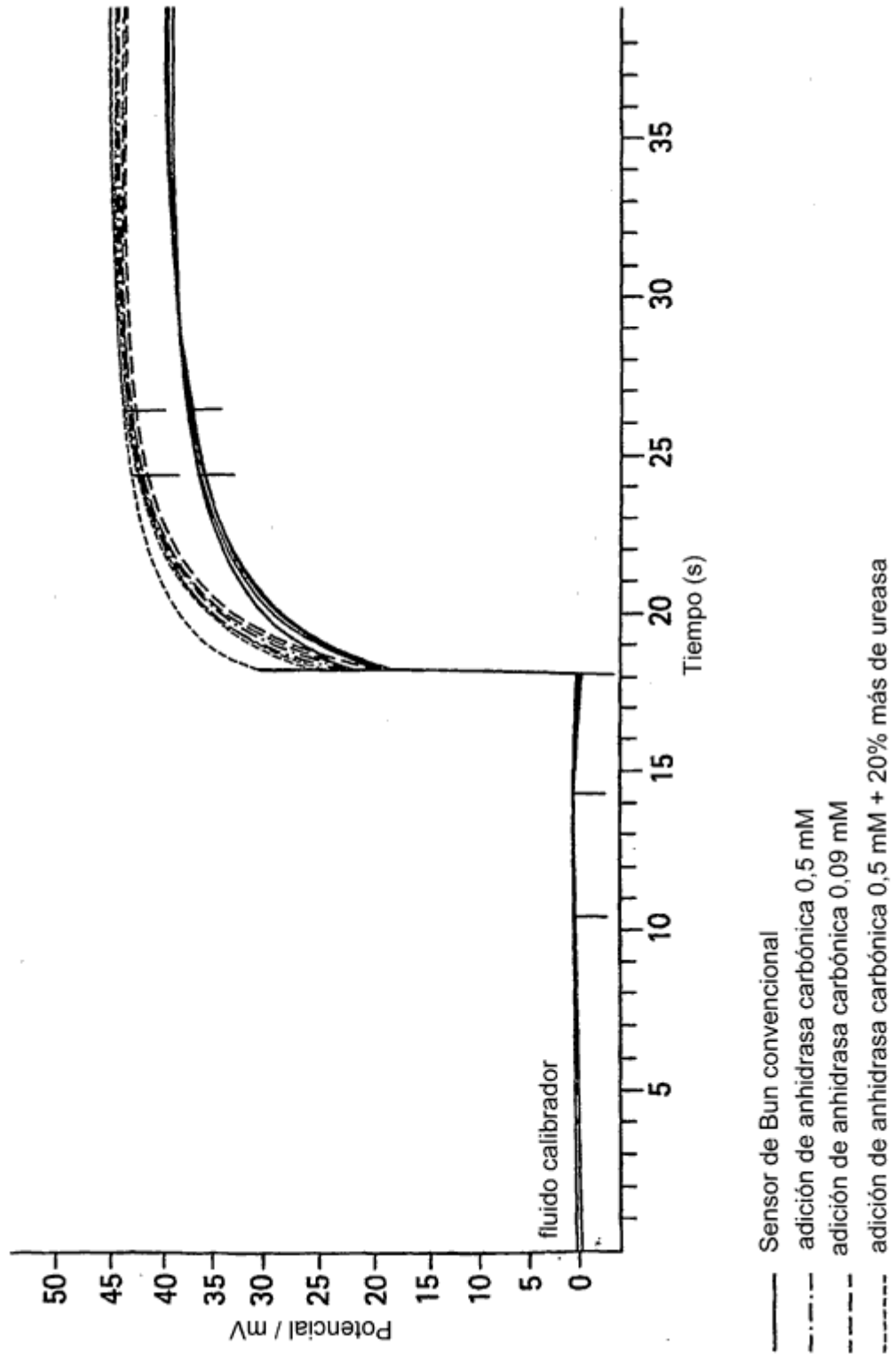


FIG. 8

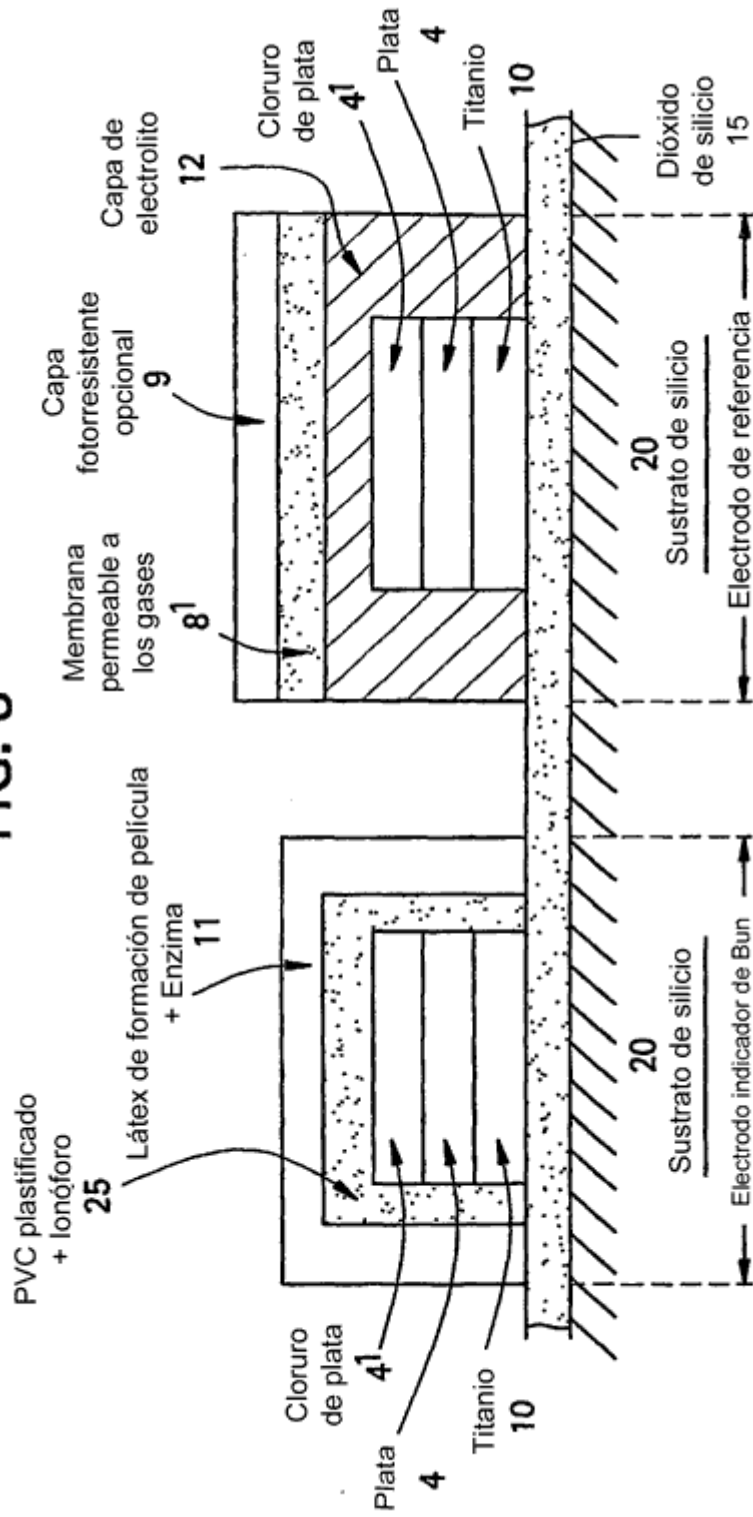


FIG. 9

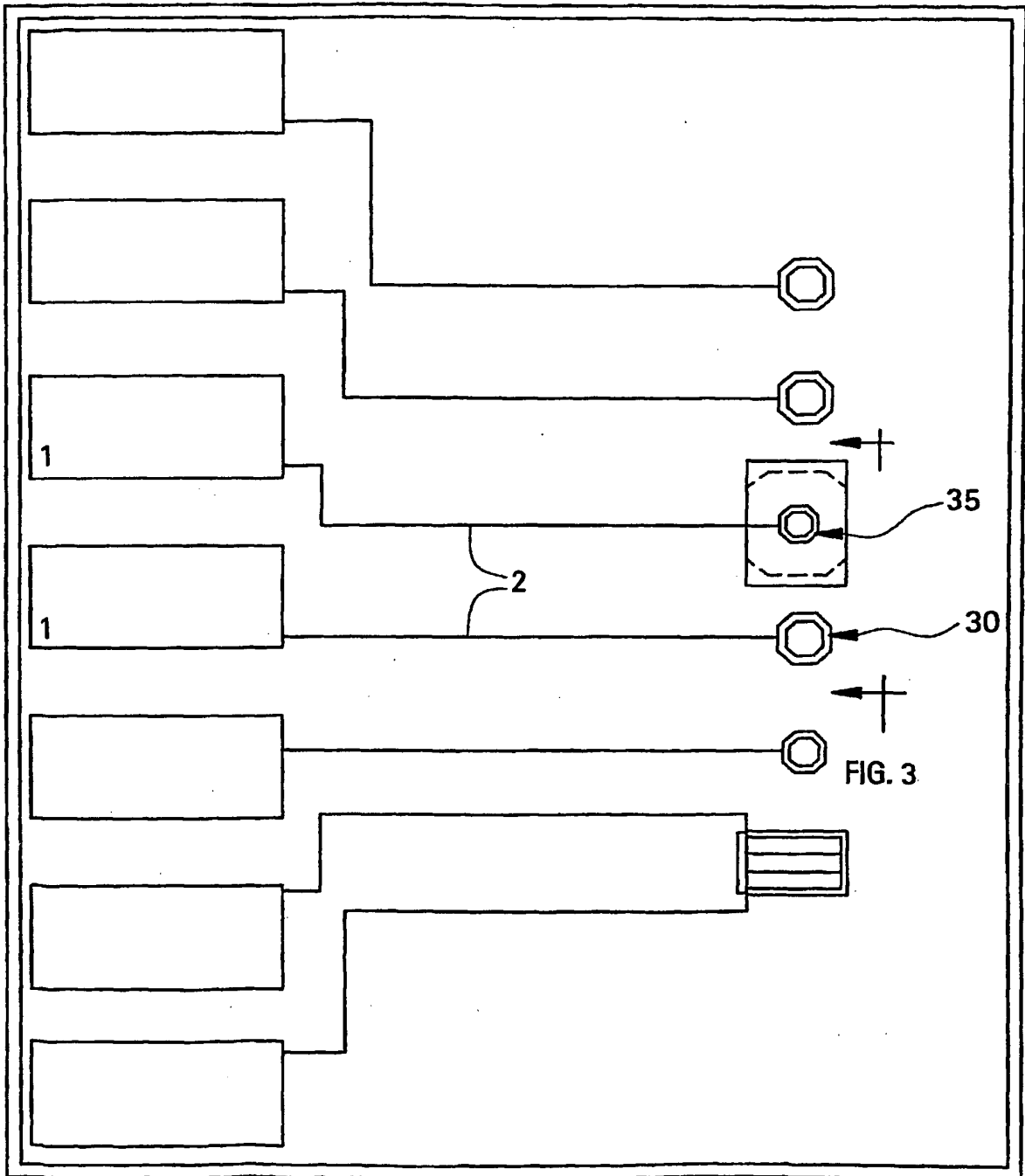


FIG. 10

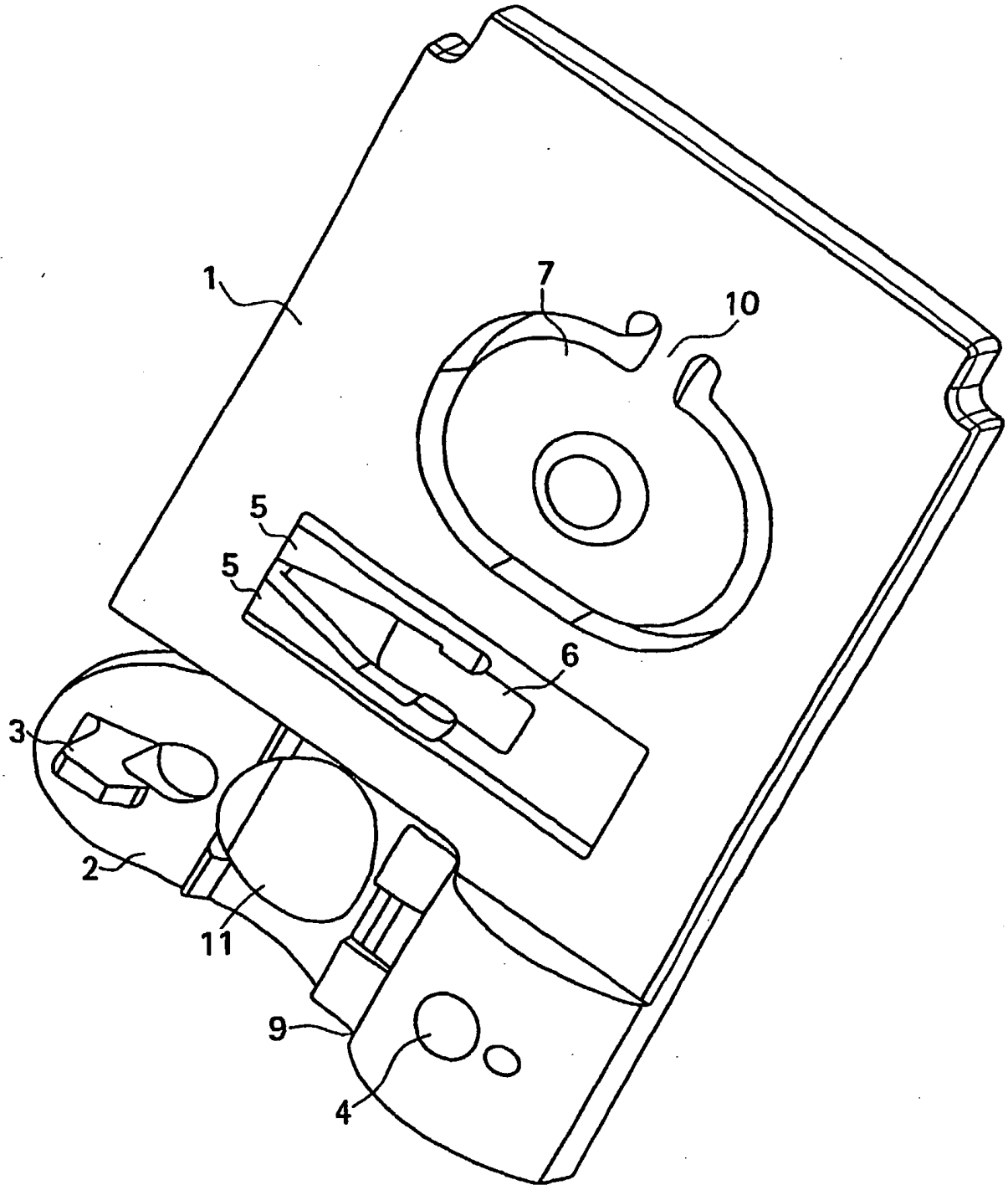


FIG. 11

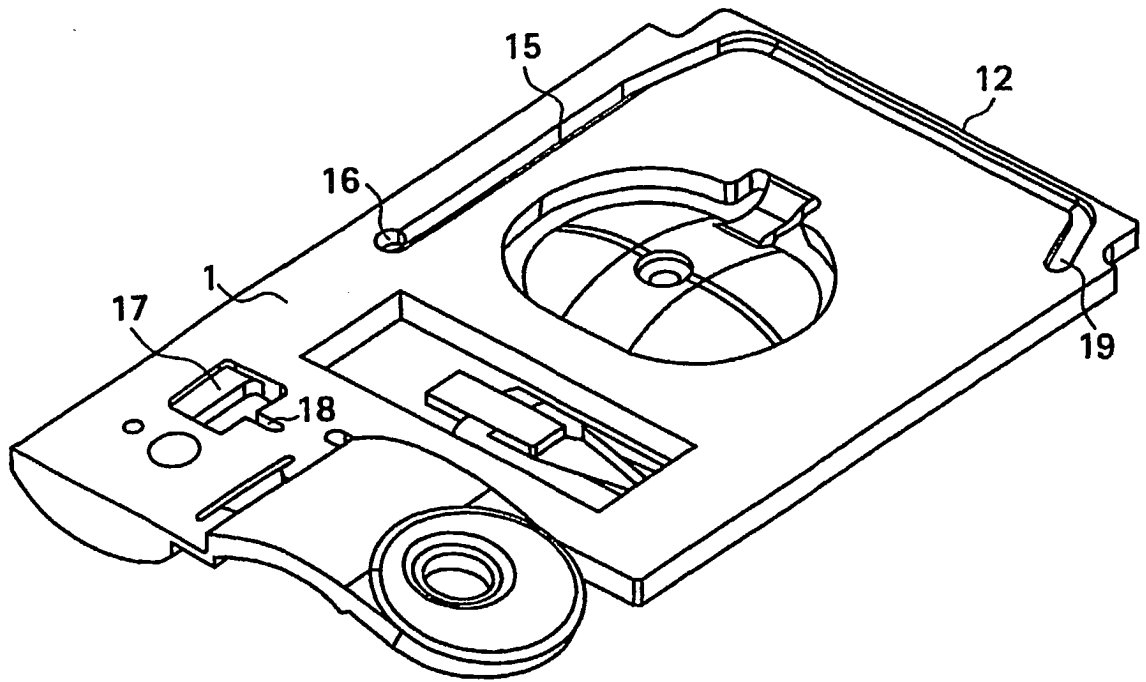


FIG. 12

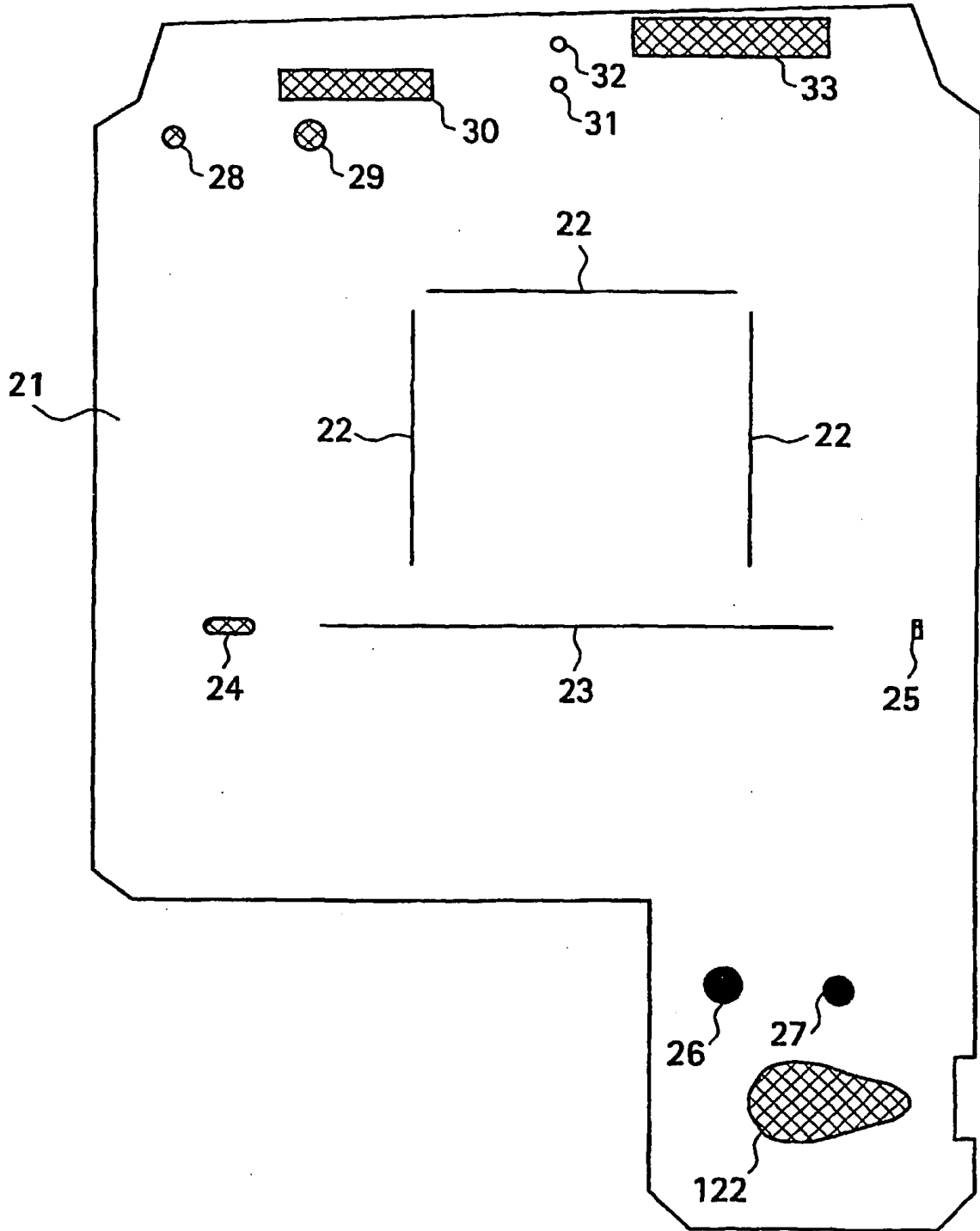


FIG. 13

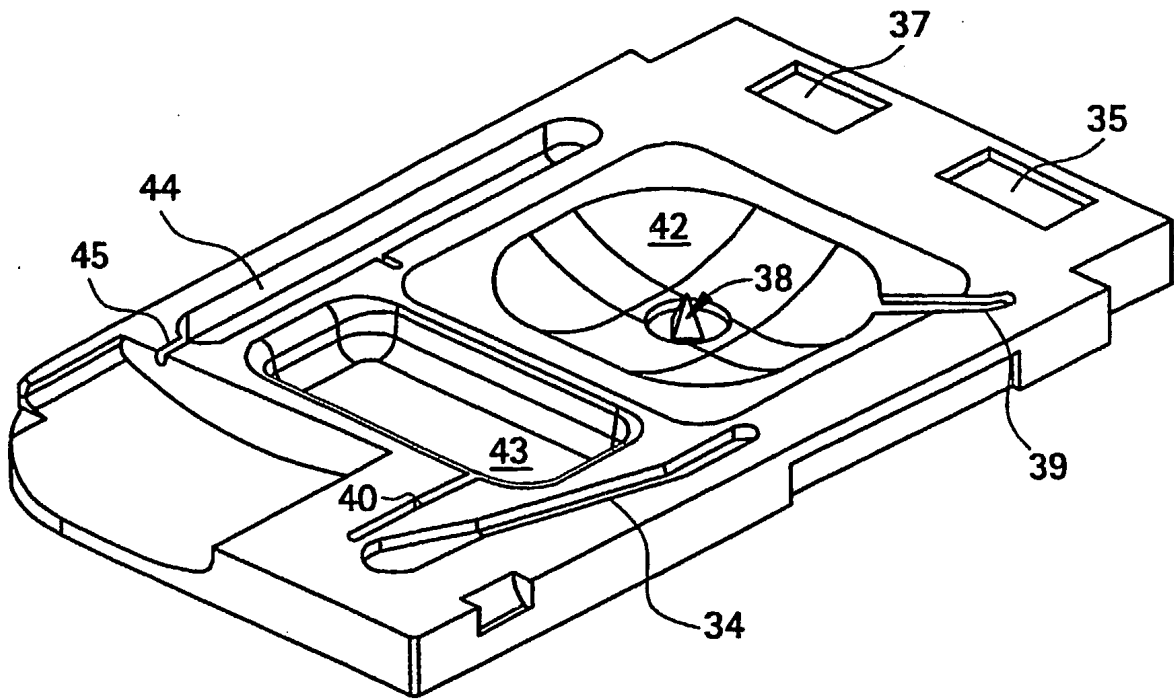


FIG. 14

Gel de proteínas de SDS-PAGE teñido con plata que muestra la enzima ureasa que carece de la banda de proteína de anhidrasa carbónica.

