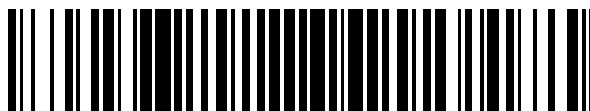


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 906**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2005 E 05763367 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 1753872**

54 Título: **Sensores electroquímicos de urea y métodos para fabricar los mismos**

30 Prioridad:

**09.06.2004 US 864908**

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

**08.04.2014**

73 Titular/es:

**INSTRUMENTATION LABORATORY COMPANY  
(100.0%)  
180 Hartwell Road  
Bedford, MA 01730 , US**

72 Inventor/es:

**SHIN, JUNGWON y  
COSOFRET, VASILE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 453 906 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

Sensores electroquímicos de urea y métodos para fabricar los mismos

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de los sensores electroquímicos, particularmente a sensores que miden urea en muestras analíticas.

### Información sobre los antecedentes

10 Los investigadores y los médicos clínicos a menudo necesitan medir la concentración de varios analitos en muestras biológicas. Estos analitos incluyen gases disueltos (por ejemplo, dióxido de carbono), iones (por ejemplo, hidrogeno, sodio, potasio, calcio, litio, amonio y magnesio), y moléculas biológicamente activas (por ejemplo, urea). En muchos casos, la muestra biológica es un fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, saliva, y/o orina) tomada del paciente durante una visita a la consulta o mientras se les somete a cirugía. El diagnóstico y tratamiento apropiados a menudo dependen de la exactitud de estas medidas y de la velocidad con la que se obtienen.

15 Un sistema de sensor electroquímico es una herramienta analítica que se puede usar para medir la concentración de un analito en una muestra biológica. El sensor electroquímico contiene un transductor físico, tal como un electrodo metálico, separado de la muestra analítica por lo menos por una membrana semipermeable. Los sensores de enzima, que detectan y/o miden metabolitos biológicos (tales como carbohidratos, péptidos, lípidos, nucleótidos, o urea, por ejemplo) en una muestra analítica, incluyen una capa enzimática que cubre la membrana semipermeable. La capa enzimática contiene por lo menos una enzima que reacciona con el analito de interés para producir un subproducto químico, que puede migrar a través de la membrana semipermeable y ser detectado por el electrodo. Un ejemplo de un sensor de enzima es un sensor de urea, que puede contener una enzima, tal como ureasa, que hidroliza urea para formar iones amonio.

20 Los sensores de urea existentes generalmente tienen una corta vida útil comparado con otros tipos de sensores (por ejemplo, sensores de iones). Esto es debido al hecho de que la capa enzimática de los sensores de urea existentes está en contacto directo con la muestra analítica, que permite que la enzima y otros componentes de la membrana se filtren dentro de la muestra y/o los contaminantes en la muestra degraden o destruyan la enzima en la capa de enzima.

25 El documento US 4.713.165 A describe un sensor que tiene un electrodo selectivo de iones.

30 El documento US 5.326.449 A describe una membrana compuesta para un dispositivo de sensor para medir la concentración de un analito en disolución.

El documento GB 2194843 A describe una membrana de electrodo de enzima y un método para fabricar la misma. El documento WO 02/097419 A describe una matriz de enzima reticulada.

### Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona un sensor de urea en el que la capa enzimática no está en contacto directo con la muestra, lo que da como resultado un sensor que permite múltiples y continuas determinaciones de la concentración de urea en muestras. Además, el sensor de urea de la presente invención es susceptible de miniaturización y se puede incorporar en tarjetas de sensores que contienen otros sensores electroquímicos miniaturizados usados para análisis a largo plazo continuos de múltiples analitos sin comprometer la vida útil total de la tarjeta de sensores.

40 En general, en un aspecto, la presente invención presenta un sensor para detectar urea en una muestra que incluye un electrodo, una capa enzimática, y una capa de difusión externa. La capa de difusión externa es permeable a la urea y está dispuesta entre la capa enzimática y la muestra. Previendo el contacto directo entre la capa enzimática y la muestra, la capa de difusión externa inhibe la degradación y/o pérdida de la enzima, extendiendo de este modo la vida del sensor de urea. El sensor de urea se puede usar para determinar la concentración de urea de muestras de sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, saliva, y/o orina, por ejemplo.

45 Las realizaciones de este aspecto de la invención pueden incluir las siguientes características. El electrodo puede ser un electrodo metálico, tal como un electrodo de plata/cloruro de plata. La capa enzimática puede contener una enzima tal como ureasa, que cataliza la hidrólisis de urea a iones amonio. La capa enzimática puede contener también uno o más estabilizantes de enzima, que incluyen, por ejemplo, polipéptidos (por ejemplo, glutatión) y proteínas inertes (por ejemplo, seroalbúmina bovina). En una realización particular, la capa enzimática incluye ureasa reticulada con glutatión. En otras realizaciones, la capa enzimática incluye una o más proteínas inertes, tales como seroalbúmina bovina, reticulada con por lo menos una de ureasa y glutatión. La capa de difusión externa puede incluir un polímero, tal como poliuretano, un ionómero de poli(tetrafluoroetileno), poli(metacrilato de 2-hidroximetilo), poli(cloruro de vinilo), poli(cloruro de vinilo) carboxilado, poli(cloruro de vinilo) hidroxilado, policarbonato, acetato de celulosa y sus mezclas.

5 El sensor de urea incluye adicionalmente una membrana selectiva de iones dispuesta entre el electrodo y la capa enzimática. Por ejemplo, la membrana selectiva de iones puede ser una membrana selectiva de iones amonio que incluye una matriz de polímero en la que está dispuesto un ionóforo selectivo de amonio. La matriz de polímero puede incluir, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo), poli(cloruro de vinilo) carboxilado, poli(cloruro de vinilo) hidroxilado, poliuretano, poli(tetrafluoroetileno), poli(metacrilato de metilo), caucho de silicona, y sus mezclas. Los ejemplos de ionóforos selectivos de iones amonio apropiados incluyen nonactina, monactina, dinactina, trinactina, tetranactina, narasina, benzoéteres corona, depsipéptidos cíclicos, y sus mezclas.

En otro aspecto, la presente invención presenta una tarjeta de sensores que incluye uno o más sensores descritos anteriormente dispuestos en o sobre un sustrato.

10 En otro aspecto más, la presente invención proporciona métodos para formar un sensor descrito anteriormente. En un enfoque, el método incluye las etapas de proporcionar un electrodo, aplicar por lo menos a una superficie del electrodo una capa enzimática, y aplicar una capa de difusión externa sobre la capa enzimática. En otro enfoque, el método incluye las etapas de proporcionar un electrodo, aplicar a por lo menos una superficie del electrodo una membrana selectiva de iones, aplicar a la membrana selectiva de iones una capa enzimática, y aplicar una capa de  
15 difusión externa sobre la capa enzimática.

El anterior y otros objetivos, aspectos, características, y ventajas de la invención se volverán más evidentes con la siguiente descripción y con las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

20 En los dibujos, los caracteres de referencia similares generalmente se refieren a las mismas partes en todas las diferentes vistas. Además, los dibujos no están necesariamente a escala, haciendo hincapié en su lugar generalmente en ilustrar los principios de la invención.

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de los componentes de una realización de un sistema de sensor electroquímico según la invención, que incluye un cartucho sensor con una tarjeta de electrodos y una entrada de muestra, una bomba peristáltica, y un microprocesador.

25 La FIG. 2 ilustra una vista frontal de una realización de una tarjeta de electrodos según la invención.

La FIG. 3 ilustra una vista de un corte transversal de una realización de un electrodo selectivo de iones (ISE) según la invención.

La FIG. 4 ilustra una vista de un corte transversal de una realización de un electrodo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) según la invención.

30 La FIG. 5 ilustra una vista de un corte transversal de una realización de un electrodo de enzima según la invención.

La FIG. 6 es una tabla que contiene ejemplos de componentes de membrana polimérica y sus respectivos porcentajes en peso para cuatro ISEs diferentes.

35 La FIG. 7 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye un ISE de sodio con una membrana polimérica que contiene poli(cloruro de vinilo) de alto peso molecular (HMW-PVC), con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra que contiene sodio contaminada con 10 mg/dl de tiopental de sodio (tiopental).

40 La FIG. 8 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de sodio con una membrana polimérica que contiene poli(cloruro de vinilo) carboxilado (PVC-COOH) según la invención, con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra que contiene sodio contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

La FIG. 9 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye un ISE de potasio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC, con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra que contiene potasio contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

45 La FIG. 10 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de potasio con una membrana polimérica que contiene PVC-COOH según la invención, con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra que contiene potasio contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

50 La FIG. 11 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye un ISE de calcio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC, con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra que contiene calcio contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

La FIG. 12 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de calcio con una membrana polimérica que contiene PVC-COOH según la invención, con

medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra que contiene calcio contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

5 La FIG. 13 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye un electrodo de pH con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC, con medidas tomadas antes y después de ensayar un pH de una muestra tamponada contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

La FIG. 14 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye cinco electrodos de pH con una membrana polimérica que contiene PVC-COOH según la invención, con medidas tomadas antes y después de ensayar un pH de una muestra tamponada contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

10 La FIG. 15 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye un electrodo de CO<sub>2</sub> con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC, con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

15 La FIG. 16 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas de una tarjeta de electrodos que incluye cuatro electrodos de CO<sub>2</sub> con una membrana polimérica que contiene PVC-COOH según la invención, con medidas tomadas antes y después de ensayar una muestra contaminada con 10 mg/dl de tiopental.

La FIG. 17 es una representación gráfica de la resistencia en volumen (bulk) de la membrana para un ISE con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC.

La FIG. 18 es una representación gráfica de la resistencia en volumen de la membrana para un ISE con una membrana polimérica que contiene PVC-COOH.

20 La FIG. 19 es una representación gráfica que compara los valores de la concentración de sodio en muestras de sangre entera determinados por un ISE de sodio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC con aquellos determinados con una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de sodio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención.

25 La FIG. 20 es una representación gráfica que compara los valores de la concentración de potasio en muestras de sangre entera determinados por un ISE de potasio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC con aquellos determinados con una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de potasio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención.

La FIG. 21 es una representación gráfica del desvío negativo de potencial con el tiempo de un ISE de sodio con una membrana polimérica que contiene PVC-COOH según la invención.

30 La FIG. 22 es una representación gráfica de la respuesta de un sensor de urea según la invención a dos diferentes disoluciones de calibración.

35 La FIG. 23 es una representación gráfica que compara los valores de concentración de urea en muestras de plasma determinados por un analizador químico clínico comercialmente disponible con aquellos en muestras correspondientes de sangre entera determinados por una tarjeta de electrodos que incluye un sensor de urea según la invención

### Descripción

Un sensor electroquímico según la invención se puede incorporar en un sistema de sensor electroquímico. Refiriéndonos a la FIG. 1, en una realización según la invención, el sistema 1 de sensor electroquímico tiene una entrada 2 en la que se introduce la muestra biológica en el sistema 1 de sensor electroquímico. Una bomba 4  
40 peristáltica mueve una muestra, tal como una muestra de fluido corporal, a través de la entrada 2 y dentro de una tarjeta 6 de electrodos. La tarjeta 6 de electrodos contiene uno o más electrodos 8 que detectan y miden analitos de interés en la muestra. Una interfase 10 eléctrica conecta la tarjeta 6 de electrodos a un microprocesador 12. Las señales de la tarjeta 6 de electrodos pasan al microprocesador 12 para permitir el almacenamiento y muestra de las  
45 señales. Las señales del microprocesador 12 pasan a la tarjeta 6 de electrodos para permitir el control de las condiciones de medida, tales como el voltaje de polarización de un electrodo. En una realización según la invención, la entrada 2 de muestra y la tarjeta 6 de electrodos están contenidos dentro de un cartucho 13 desechable que puede estar separado de los restantes elementos del sistema 1 de sensor electroquímico y se reemplazan después del uso.

50 Refiriéndonos a la FIG. 2, en una realización según la invención, la tarjeta 6 de electrodos incluye una tarjeta rígida sustancialmente rectangular hecha de poli(cloruro de vinilo) (PVC). Un canal 20 está situado dentro de la tarjeta 6 de electrodos, a través del cual puede fluir una muestra biológica o una disolución de referencia. Uno o más electrodos 8 se pueden incrustar dentro del canal 20. Cuando pasa una muestra a través de la tarjeta 6 de electrodos, fluye a través del canal 20 y sobre los electrodos 8, permitiendo la detección y/o medida del(de los) analito(s) de interés.

Refiriéndonos a la FIG. 2, los electrodos 8 que se pueden incorporar en la tarjeta 6 de electrodos incluyen electrodos selectivos de iones (ISEs) 100, electrodos para analizar gases disueltos (electrodos de gas), y electrodos que usan un sistema de detección basado en enzimas (electrodos de enzimas). Por ejemplo, los electrodos pueden detectar sodio 26, calcio 28, potasio 30, pH 32, litio 34, magnesio 36, amonio 38, dióxido de carbono 40, y urea 42.

5 Refiriéndonos a la FIG. 3, en una realización según la invención, un ISE 100 comprende un elemento 105 metálico, una capa 110 de disolución interna, una membrana 115 polimérica. El elemento 105 metálico está incrustado en el PVC de una tarjeta 6 de electrodos, y la capa 110 de disolución interna cubre el extremo expuesto del elemento 105 metálico. La capa 110 de disolución interna puede contener, por ejemplo, tampón de ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico (MES). La membrana 115 polimérica es una membrana selectiva de iones que separa la  
10 capa 110 de disolución interna de una muestra analítica (por ejemplo, una muestra de fluido corporal) que pasa a través del canal 20 en la tarjeta 6 de electrodos. La composición de la membrana 115 polimérica determina la selectividad del ISE 100 para un ion particular. En una realización particular según la invención, el PVC-COOH es un componente de la membrana 115 polimérica.

15 Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 2, para medir la concentración de un ion en una muestra analítica, un ISE 100 debe funcionar en tándem con un electrodo 44 de referencia. Si el ion que el ISE 100 está diseñado para detectar está presente en la muestra analítica, se genera un potencial eléctrico a través de la membrana 115 polimérica que depende de la diferencia entre la concentración del analito en la capa 110 de disolución interna, ilustrada en la FIG. 3, y su concentración en la muestra analítica. La diferencia en potencial eléctrico entre el ISE 100 y el electrodo 44 de referencia es directamente proporcional al cambio en el logaritmo de la concentración del ion medido en la  
20 muestra analítica.

Refiriéndonos a la FIG. 4, en una realización según la invención, un electrodo 40 de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), un tipo de electrodo de gas, comprende un elemento 125 metálico, una capa 130 de disolución interna, y una membrana 135 polimérica. El electrodo 40 de CO<sub>2</sub> es funcionalmente similar a un ISE 100, excepto que la capa 130 de disolución interna del electrodo 40 de CO<sub>2</sub> debe funcionar en tándem con un electrodo 32 de pH.

25 Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 4, cuando el CO<sub>2</sub> permea la membrana 135 polimérica del electrodo 40 de CO<sub>2</sub>, se disuelve en el tampón de bicarbonato de la capa 130 de disolución interna y cambia el pH del tampón, que cambia el potencial eléctrico del electrodo 40 de CO<sub>2</sub>. La capa de disolución interna del electrodo 32 de pH, sin embargo, no es afectada por el CO<sub>2</sub> en la muestra analítica, de modo que el potencial del electrodo de pH permanece constante. La diferencia en potencial eléctrico entre el electrodo 40 de CO<sub>2</sub> y el electrodo 32 de pH es proporcional a la  
30 concentración de CO<sub>2</sub> en la muestra. En una realización según la invención, el PVC-COOH puede ser un constituyente de la membrana 135 polimérica de un electrodo 40 de CO<sub>2</sub>.

La FIG. 5 ilustra otra realización según la invención, un electrodo 150 de enzima para detectar la presencia y concentración de metabolitos biológicos (tales como un carbohidrato, péptido, lípido, nucleótido, o urea, por ejemplo) en una muestra analítica. El electrodo 150 de enzima comprende un elemento 155 metálico incrustado en una tarjeta  
35 6 de electrodos y una membrana 160 compuesta, que está localizada entre el elemento 155 metálico y una muestra analítica que fluye a través de un canal 20 en la tarjeta 6 de electrodos. La membrana 160 compuesta incluye una membrana 165 de difusión externa adyacente al canal 20, una capa 170 enzimática, una membrana 175 polimérica selectiva de iones, y una capa 180 de disolución interna adyacente al elemento 155 metálico. La membrana 165 de difusión externa controla la difusión del analito en la capa 170 de enzima y protege los otros componentes del  
40 electrodo 150 de enzima del contacto directo con la muestra analítica en el canal 20. La capa 170 de enzima puede incluir por lo menos una enzima, o una mezcla de varias enzimas, proteínas, y estabilizantes que reacciona con un analito particular. Si el analito se difunde a través de la membrana 165 de difusión externa, puede reaccionar con la(s) enzima(s) en la capa 170 de enzima para producir un subproducto químico, que puede migrar a través de la membrana 175 polimérica selectiva de iones. En el caso de un sensor de urea, el subproducto químico puede ser  
45 iones amonio, por ejemplo. Se genera un potencial eléctrico a través de la membrana 160 compuesta que depende de la concentración del subproducto químico, que es proporcional a la concentración del analito de interés en la muestra analítica. En una realización según la invención, el PVC-COOH es un constituyente de la membrana 175 polimérica selectiva de iones.

50 En una realización particular, un sensor de urea según la invención incluye una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a iones amonio, que se detectan a continuación por medio de un electrodo selectivo de iones amonio. Un ejemplo de una enzima apropiada es ureasa. Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 5, la membrana 160 compuesta del sensor de urea incluye una membrana 165 de difusión externa, una capa 170 enzimática que contiene ureasa, una membrana 175 polimérica selectiva de iones amonio, y una capa 180 de disolución externa adyacente a un elemento 155 metálico.

55 La membrana 165 de difusión externa se formula para servir para varias funciones. Primero, la membrana 165 de difusión externa asegura la capa 170 enzimática a la membrana 175 polimérica selectiva de iones, previniendo que la capa 170 enzimática se separe por lavado por el flujo de disolución de calibración o la muestra sobre la capa de enzima que ocurriría si no sin la membrana 165 de difusión externa protectora. Segundo, la membrana 165 de difusión externa restringe la difusión de contaminantes desde la muestra a la capa 170 enzimática, extendiendo  
60 ventajosamente la vida útil del sensor. En una realización particular la membrana 165 de difusión externa se formula

para restringir la difusión de urea a la capa 170 enzimática, permitiendo de este modo que una fracción más pequeña pero proporcional de la urea en la muestra reaccione con la enzima. Restringiendo la cantidad de urea que llega a la capa 170 enzimática no solo extiende el intervalo lineal del sensor de urea, sino que también inhibe que se incremente el pH de la capa 170 enzimática, que extiende adicionalmente el intervalo lineal superior del sensor.

5 La membrana 165 de difusión externa generalmente incluye uno o más polímeros. Los polímeros apropiados incluyen, pero no están limitados a, poliuretano, ionómeros de poli(tetrafluoroetileno) (por ejemplo, el ionómero de perfluorosulfonato vendido con el nombre comercial NAFION por E.I. Du Pont De Nemours & Co., Wilmington, Del.), poli(metacrilato de 2-hidroximetilo), poli(cloruro de vinilo), derivados de poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, poli(cloruro de vinilo) carboxilado y poli(cloruro de vinilo) hidroxilado), policarbonato, acetato de celulosa, y sus mezclas y copolímeros. Un polímero preferido para su uso en la membrana 165 de difusión externa es poliuretano hidrófilo (disponible, por ejemplo, de Thermedics, Inc. Woburn, Mass.). En una realización, la membrana 165 de difusión externa incluye una mezcla o copolímero de dos o más polímeros. En otra realización, la membrana 165 de difusión externa incluye dos o más capas distintas de idénticos o diferentes polímeros y/o idénticos o diferentes copolímeros.

15 La capa 170 enzimática incluye una enzima que cataliza la reacción de urea a iones amonio, tal como, por ejemplo, ureasa. En una realización, la capa 170 enzimática incluye uno o más estabilizantes de enzima, que incluyen, por ejemplo, proteínas inertes (por ejemplo, proteínas de suero, que incluyen seroalbúmina bovina), polipéptidos (por ejemplo, glutatión), y disolventes. En una realización particular, el glutatión se usa junto con una o más proteínas inertes para estabilizar la urea en la capa 170 enzimática. Además, la ureasa puede estar reticulada con glutatión y/o una o más proteínas inertes usando un agente de reticulación (por ejemplo, glutaraldehído) para prevenir la migración de la enzima y/o los estabilizantes fuera de la capa 170 enzimática. La reticulación también asegura la capa 170 enzimática a la capa 175 polimérica selectiva de iones subyacente. Durante la fabricación de la capa 170 enzimática, los estabilizantes de enzima se añaden generalmente a la disolución que contiene la enzima previamente a la adición del agente de reticulación para asegurar que los estabilizantes se reticulan junto con la enzima.

La capa 175 polimérica selectiva de iones amonio incluye un ionóforo selectivo de iones amonio dispuesto en una matriz polimérica. Los ionóforos apropiados incluyen, pero no están limitados a, nonactina, monactina, dinactina, trinactina, tetranactina, narasina, benzoéteres corona (véase, por ejemplo, Anal. Chem., 2000, 72, 4683-4688), depsipéptidos cíclicos (véase, por ejemplo, Anal. Chem. 2003, 75, 152-156), y sus mezclas. La matriz polimérica puede incluir, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo), derivados de poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, poli(cloruro de vinilo) carboxilado y poli(cloruro de vinilo) hidroxilado), poliuretano, poli(tetrafluoroetileno), poli(metacrilato de metilo), caucho de silicona y sus mezclas y copolímeros. Además, la capa 175 polimérica selectiva de iones amonio puede contener otros aditivos, tales como plastificantes y aditivos de sal lipófila, como se discute aquí.

30 Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 3, la membrana polimérica de un ISE regula la selectividad del ISE 100 hacia un analito de interés. La membrana 115 polimérica incluye por lo menos cuatro elementos, un polímero, un plastificante, un ionóforo, y un aditivo de sal lipófila.

En una realización según la invención, el PVC-COOH es un componente polimérico de la membrana 115 polimérica. El PVC-COOH es un polímero de poli(cloruro de vinilo) (PVC) que tiene un porcentaje de sus átomos de cloro reemplazados por grupos carbonilo (COOH). En una realización según la invención, el PVC-COOH puede contener entre 0,1 y 5% de COOH en peso, y en una realización particular de la invención el PVC-COOH contiene 1,8% de COOH en peso. El PVC-COOH previene que especies aniónicas lipófilas (tales como analgésicos y anestésicos, por ejemplo) en la muestra analítica permeen la membrana 115 polimérica e interfieran con el ISE 100. Tales especies aniónicas lipófilas pueden incluir tiopental de sodio (tiopental), feniloína, ibuprofeno, fenoprofeno, salicilato, valproato, y  $\epsilon$ -aminocaproato, por ejemplo. El PVC-COOH se puede mezclar con otro polímero (tal como HMW-PVC o poliuretano, por ejemplo) para formar el componente polimérico de la membrana polimérica. En una realización particular de la invención, el PVC-COOH no está mezclado con otro polímero y es el único componente polimérico de la membrana polimérica.

La membrana 115 polimérica que incluye PVC-COOH exhibe también propiedades adhesivas mejoradas para plataformas sólidas, que es importante para la larga duración y estabilidad potencial de un sensor electroquímico. Además, un sensor electroquímico que emplea PVC-COOH en su membrana 115 polimérica muestra mejor estabilidad potencial y reproducibilidad de las medidas del sensor debido a una significativa reducción de la resistencia de la membrana conferida por la relativamente polar membrana 115 polimérica, como se ilustra por el Ejemplo 6 a continuación. La precisión y exactitud de un sensor de PVC-COOH es comparable a la de los ISEs conocidos, que incluyen sensores basados en poli(cloruro de vinilo) de alto peso molecular (HMW-PVC), como se ilustra por el Ejemplo 7 a continuación.

El componente plastificante de la membrana 115 polimérica proporciona la movilidad iónica dentro de la membrana que es necesaria para obtener una transferencia de iones efectiva. El plastificante debe ser compatible con el componente polimérico y debe ser un disolvente para el ionóforo. El plastificante debe ser también suficientemente insoluble en agua de modo que no migre significativamente dentro de una muestra acuosa en contacto con la superficie de la membrana 115 polimérica. También es deseable que el plastificante sea sustancialmente no volátil

para extender la vida útil del electrodo. Los plastificantes útiles incluyen sebacato de bis(2-etilhexilo) (DOS) y o-nitrofenil-octil-éter (NPOE).

El ionóforo usado en la membrana 115 polimérica es capaz de asociarse selectivamente con un ion específico. Esta característica del ionóforo es responsable de la selectividad de iones de un ISE. Los ejemplos de ionóforos apropiados para un ISE de sodio incluyen éster metílico de monensina, derivados de calixareno, y otros compuestos sensibles al sodio. Un antibiótico monocíclico (tal como, valinomicina, por ejemplo) se puede usar como ionóforo para un ISE de potasio. Un ionóforo para un ISE de calcio puede ser, por ejemplo, (-)-(R,R)-N,N'-(bis(11-etoxicarbonil)undecil)-N,N'-4,5-tetrametil-3,6-dioxaoctanodiamida; N,N'-[(4R,5R)-4,5-dimetil-1,8-dioxo-3,6-dioxaoctametileno]-bis(12-metilaminododecanoato) de dietilo (ETH 1001). Un ejemplo de un ionóforo apropiado para un electrodo de pH y/o un electrodo de dióxido de carbono es tridodecilamina (TDDA).

El aditivo de sal lipófila usado en la membrana 115 polimérica sirve para reducir la resistencia de la membrana y para reducir la interferencia de aniones. Los aditivos de sal lipófila útiles incluyen, por ejemplo, tetraquis(4-clorofenil)borato de potasio (KTPCIPB) y tetraquis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato de potasio (K TTFPB). El aditivo de sal lipófila, sin embargo, no siempre es esencial para la función de la membrana 115 polimérica y se puede omitir cuando se analizan ciertos analitos.

La eficiencia de la membrana 115 polimérica para rechazar contaminantes de fármaco de anión lipófilo se mejora cuando se optimiza la composición de la membrana 115 polimérica respecto a la relación PVC-COOH/plastificante por medio de una selección apropiada del tipo y relaciones de ionóforo y aditivo de sal lipófila. Por ejemplo, la membrana 115 polimérica para un ISE de sodio puede contener 25-35% de PVC-COOH, 60-70% de DOS, 2-8% de derivado de calixareno, y 1-3% de KTTFPB en peso. La membrana 115 polimérica para un ISE de potasio puede contener, por ejemplo, 25-35% de PVC-COOH, 60-70% de DOS, 1-5% de valinomicina, y 0-1% de KTPCIPB en peso. La membrana 115 polimérica para un ISE de calcio puede contener, por ejemplo, 25-35% de PVC-COOH, 60-70% de DOS/NPOE 1:1, 1-5% de ETH 1001, y 0,2-2% de KTPCIPB en peso. La membrana 115 polimérica para un ISE de pH o CO<sub>2</sub> puede contener, por ejemplo, 25-35% de PVC-COOH, 60-70% de DOS, 2-7% de TDDA, y 1-4% de KTPCIPB en peso. La FIG. 6 ilustra ejemplos de realizaciones particulares de componentes de membrana 115 polimérica apropiada y sus respectivas relaciones en peso para varios sensores electroquímicos.

Refiriéndonos aún a la FIG.3, una membrana 115 polimérica según la presente invención se puede formar disolviendo las cantidades apropiadas de polímero, plastificante, ionóforo, y aditivo de sal lipófila en un disolvente, típicamente tetrahidrofurano (THF) o ciclohexanona, y aplicando esta disolución a la superficie expuesta de un elemento 105 metálico incrustado en una tarjeta 6 de electrodos. Por ejemplo, un ISE de potasio se puede fabricar mezclando PVC-COOH (1,8% en peso de COOH), DOS, valinomicina y KTPCIPB según la relaciones listadas en la FIG. 6 para hacer una masa total de 630-650 mg. La mezcla se disuelve en 3-3,5 ml de THF, y 0,75 µl de la disolución se aplican al extremo expuesto del elemento 105 metálico (por ejemplo, un alambre de plata clorado) incrustado en una tarjeta 6 de electrodos. Una vez que se evapora el disolvente, se aplica el mismo volumen de la disolución de membrana dos veces adicionales con un tiempo adecuado de secado entre cada aplicación. Una vez que se ha evaporado el disolvente de la última aplicación, se forma la membrana 115 polimérica y se une a la tarjeta 6 de electrodos.

Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 5, en una realización, se fabrica un sensor de urea según la presente invención aplicando primero la capa 180 de disolución interna (por ejemplo, una disolución tampón de MES) a la superficie expuesta de un elemento 155 metálico (por ejemplo, plata/cloruro de plata o platino) incrustado en una tarjeta 6 de electrodos. A continuación, se añade una disolución de nonactina, poli(cloruro de vinilo), y uno o más plastificantes sobre la capa 180 de disolución interna para formar la capa 175 polimérica selectiva de iones. La capa 170 de enzima se forma añadiendo una disolución de ureasa, glutatión, seroalbúmina bovina, y glutaraldehído a la superficie de la capa 175 polimérica selectiva de iones. Finalmente, se añade una disolución de poliuretano hidrófilo sobre la capa 170 de enzima para formar la capa 165 de difusión externa.

Un ISE según la presente invención mide cambios en el potencial eléctrico, medido en milivoltios (mV), de una muestra analítica que son debidos a los cambios en las concentraciones de analitos dentro de la muestra. Similarmente, un electrodo de gas según la presente invención mide cambios en el potencial eléctrico de una muestra analítica que son debidos a cambios en la presión parcial del gas disuelto en la muestra. Como los expertos en la técnica son conscientes, los valores del potencial eléctrico están relacionados con los valores de la concentración o la presión parcial según la ecuación de Nernst. En una realización particular según la invención, se puede incluir software en el sistema de sensor electroquímico para convertir los valores de potencial eléctrico medidos por el electrodo en valores de concentración o presión parcial del analito medido usando la ecuación de Nernst.

En otro aspecto, la invención es un método para detectar la presencia y/o medir la concentración de un analito en un fluido corporal (tal como sangre, por ejemplo) en presencia de una especie aniónica lipófila (tal como tiopental, por ejemplo) sin interferencia de la especie aniónica lipófila al detectar y/o medir el analito. El método de la invención proporciona un sensor electroquímico para detectar y/o medir un analito de interés en un fluido corporal que incluye PVC-COOH como componente polimérico de la membrana polimérica del sensor. Una muestra de fluido corporal que contiene el analito de interés y un contaminante aniónico lipófilo se colocan en contacto con el sensor

electroquímico que incluye PVC-COOH como componente polimérico de la membrana polimérica del sensor. El analito de interés en la muestra de fluido corporal se mide y/o detecta a continuación por el sensor electroquímico con interferencia reducida del contaminante aniónico lipófilo.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no limitar, la invención.

#### 5 **Ejemplo 1**

La FIG. 7 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas de una tarjeta de electrodos que incluye un ISE de sodio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC. Una muestra analítica que contiene una concentración conocida de sodio se introdujo en la tarjeta de electrodos, y el ISE midió que la concentración de sodio era 142 mM. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de sodio más 10 mg/dl de tiopental, y el ISE dio un valor de concentración de sodio de 137 mM.

La FIG. 8 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas de una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de sodio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención. Una muestra analítica que contiene una concentración conocida de sodio se introdujo en la tarjeta de electrodos y los cinco ISEs midieron que la concentración de sodio era 139 mM. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de sodio más 10 mg/dl de tiopental, y los cinco electrodos dieron valores de concentración de sodio de 139 mM. Los ISEs de sodio basados en PVC-COOH no exhibían la desviación de potencial mostrada por el ISE de sodio basado en HMW-PVC después de analizar una muestra contaminada con tiopental, lo que ilustra la eficacia del PVC-COOH para prevenir la interferencia con las medidas de sodio causada por contaminantes aniónicos lipófilos.

#### 20 **Ejemplo 2**

La FIG. 9 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye un ISE de potasio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC. Una muestra analítica que contiene una concentración conocida de potasio se introdujo en la tarjeta de electrodos, y el ISE midió que la concentración de potasio era 3,2 mM. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de potasio más 10 mg/dl de tiopental, y el ISE dio un valor de concentración de potasio de 2,8 mM.

La FIG. 10 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de potasio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención. Una muestra analítica que contiene una concentración conocida de potasio se introdujo en la tarjeta de electrodos, y los cinco ISEs midieron que la concentración de potasio era 3,3 mM. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de potasio más 10 mg/dl de tiopental, y los cinco electrodos dieron valores de concentración de potasio de 3,3 mM. Los ISEs basados en PVC-COOH exhibían desviaciones de potencial despreciables después de analizar una muestra contaminada con tiopental comparado con la desviación mostrada por el ISE de potasio basado en HMW-PVC, que ilustra la eficacia del PVC-COOH para prevenir la interferencia con las medidas de potasio causada por contaminantes aniónicos lipófilos.

#### 35 **Ejemplo 3**

La FIG. 11 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye un ISE de calcio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC. Una muestra analítica que contiene una concentración conocida de calcio se introdujo en la tarjeta de electrodos, y el ISE midió que la concentración de calcio era 0,93 mM. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de calcio más 10 mg/dl de tiopental, y el ISE dio un valor de concentración de calcio de 0,81 mM.

La FIG. 12 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de calcio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención. Una muestra analítica que contiene una concentración conocida de calcio se introdujo en la tarjeta de electrodos, y los cinco ISEs midieron que la concentración de calcio era 0,87 mM. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de calcio más 10 mg/dl de tiopental, y los cinco electrodos dieron valores de concentración de calcio de 0,85, 0,85, 0,86, 0,86 y 0,85 mM. Los ISEs basados en PVC-COOH no exhibían una desviación de potencial tan grande como la mostrada por el ISE de calcio basado en HMW-PVC después de analizar una muestra contaminada con tiopental, que ilustra la eficacia del PVC-COOH para prevenir la interferencia con las medidas de calcio causada por contaminantes aniónicos lipófilos.

#### 50 **Ejemplo 4**

La FIG. 13 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye un electrodo de pH con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC. Una muestra analítica que contiene una disolución tampón de pH conocido se introdujo en la tarjeta de electrodos, y el electrodo



midió que el pH era 7,63. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma disolución tampón más 10 mg/dl de tiopental, y el electrodo dio un valor de pH de 7,68.

La FIG. 14 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye cinco electrodos de pH con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención. Una muestra analítica que contiene una disolución tampón de pH conocido se introdujo en la tarjeta de electrodos, y los cinco electrodos midieron que el pH era 7,66. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma disolución tampón más 10 mg/dl de tiopental, y los cinco electrodos dieron valores de pH de 7,68. Los electrodos de pH basados en PVC-COOH no exhibían una desviación de potencial tan grande como la mostrada por el electrodo de pH basado en HMW-PVC después de analizar una muestra contaminada con tiopental, que ilustra la eficacia del PVC-COOH para prevenir la interferencia con las medidas de pH causada por contaminantes aniónicos lipófilos.

#### Ejemplo 5

La FIG. 15 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye un electrodo de CO<sub>2</sub> con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC. Una muestra analítica que contiene una disolución tampón se introdujo en la tarjeta de electrodos. Se tomaron dos medidas de la presión parcial de CO<sub>2</sub>, y los resultados se promediaron para dar un valor de 66 mmHg. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma disolución tampón más 10 mg/dl de tiopental, y el electrodo dio un valor de la presión parcial de CO<sub>2</sub> de 115 mmHg.

La FIG. 16 es una representación gráfica de las respuestas cronopotenciométricas registradas con una tarjeta de electrodos que incluye cuatro electrodos de CO<sub>2</sub> con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención. Una muestra analítica que contiene una disolución tampón se introdujo en la tarjeta de electrodos. Se tomaron dos medidas de la presión parcial de CO<sub>2</sub> en la disolución con cada uno de los cuatro electrodos, y los resultados para cada electrodo se promediaron para dar valores de 67,9, 68,0, 68,0 y 68,2 mmHg. En el tiempo t, la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma disolución tampón más 10 mg/dl de tiopental, y los cuatro electrodos dieron valores de presión parcial de CO<sub>2</sub> de 70,4, 68,8, 68,8, y 73,4 mmHg. Los electrodos de CO<sub>2</sub> basados en PVC-COOH exhibían desviaciones de potencial despreciables después de analizar una muestra contaminada con tiopental comparado con la desviación mostrada por el electrodo de CO<sub>2</sub> basado en HMW-PVC, que ilustra la eficacia del PVC-COOH para prevenir la interferencia con las medidas de CO<sub>2</sub> causada por contaminantes aniónicos lipófilos.

#### Ejemplo 6

La FIG. 17 es una representación gráfica de la resistencia en volumen de la membrana de una membrana polimérica de ISE que incluye HMW-PVC como componente polimérico, como se sabe en la técnica. Según la FIG. 17, la membrana de HMW-PVC tiene una resistencia en volumen de alrededor de  $2,4 \times 10^7$  ohm. En comparación, la FIG. 18 muestra que la resistencia en volumen de la membrana de una membrana polimérica de ISE que incluye PVC-COOH como componente polimérico según la invención es alrededor de  $1,25 \times 10^6$  ohm, que es alrededor de diecinueve veces más baja que la de un ISE que contiene HMW-PVC. Rebajando la resistencia en volumen de la membrana, un ISE fabricado que usa PVC-COOH en su membrana polimérica exhibe mejorada estabilidad de potencial y reproducibilidad de las medidas.

#### Ejemplo 7

La FIG. 19 es una representación gráfica que compara valores de concentración de sodio en muestras de sangre entera determinados por un conocido ISE de sodio con una membrana polimérica que contiene HMW-PVC con los determinados por una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de sodio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención. Los valores de la concentración de sodio para noventa y nueve muestras de sangre entera distintas que representan un amplio intervalo de niveles de sodio se determinaron primero con un ISE de sodio basado en HMW-PVC, a continuación con un ISE de sodio basado en PVC-COOH. Como se ilustra en la FIG. 19, los valores obtenidos del ISE de sodio basado en PVC-COOH se correlacionan bien con aquellos obtenidos usando el ISE de sodio basado en HMW-PVC ( $r=0,9983$ ), lo que indica que el ISE de sodio basado en PVC-COOH mide sodio con igual precisión y exactitud que un electrodo de sodio conocido.

La FIG. 20 ilustra un experimento similar usando un ISE de potasio basado en PVC-COOH. Se determinaron primero valores de concentración de potasio para 127 diferentes muestras de sangre entera que representan un amplio intervalo de niveles de potasio usando un ISE de potasio basado en HMW-PVC, a continuación un ISE de potasio basado en PVC-COOH. Como se ilustra en la FIG. 20, los valores obtenidos del ISE de potasio basado en PVC-COOH se correlacionan bien con aquellos obtenidos usando el electrodo basado en HMW-PVC ( $r=0,9995$ ), lo que indica que el ISE de potasio basado en PVC-COOH mide potasio con igual precisión y exactitud que un electrodo de potasio conocido.

#### Ejemplo 8

La FIG. 21 es una representación gráfica de la estabilidad con el tiempo de un ISE de sodio basado en PVC-COOH

según la invención. El día 1, una muestra analítica que contiene una concentración conocida de sodio se introdujo en una tarjeta de electrodos que incluye cinco ISEs de sodio con membranas poliméricas que contienen PVC-COOH según la invención, y se midió la concentración de sodio. A continuación la muestra analítica se cambió por una disolución que contiene la misma concentración de sodio más 10 mg/dl de tiopental, y se midió de nuevo la concentración de sodio. La diferencia entre las dos medidas ( $\Delta$ EMF), que representa la desviación del potencial del electrodo debido a la interferencia del tiopental, se calculó, y la muestra analítica se retiró de la tarjeta del sensor. Este procedimiento se repitió los días 2, 4, 6, 9, 12, 14 y 20, y se calcularon los valores de  $\Delta$ EMF. Como ilustra la FIG. 21, el efecto que una especie aniónica lipófila tal como tiopental tiene sobre un ISE de sodio basado en PVC-COOH según la invención permanece muy bajo a lo largo de toda la vida del electrodo.

### 10 Ejemplo 9

Se fabricó un sensor de urea según la invención como sigue. Se preparó una disolución tampón de MES que contiene 50,9 mmol/l de sal de potasio de MES, 46,6 mmol/l de ácido libre de MES, y 2 mmol/l de cloruro de potasio, y 0,05  $\mu$ l de esta disolución se aplicaron al extremo de un alambre de plata/cloruro de plata incrustado en una tarjeta de electrodos de PVC. A continuación, se preparó una disolución de membrana selectiva de iones combinando 150 mg de PVC, 100  $\mu$ l de sebacato de dioctilo, 100  $\mu$ l de 2-nitrofenil-octil-éter, 110  $\mu$ l de tetraquis(4-clorofenil)borato de potasio al 1% en THF, y 300  $\mu$ l de nonactina al 5% en THF en 8 ml de THF. Se aplicaron dos alícuotas de 0,75  $\mu$ l de esta disolución secuencialmente sobre la capa de tampón de MES para formar la membrana selectiva de iones. A continuación se preparó una disolución de enzima que contiene 50 mg/ml de ureasa (Biozyme, San Diego, Calif.), 20 mg/ml de glutatión, 10 mg/ml de seroalbúmina bovina, y glutaraldehído al 0,12% en tampón de fosfato 0,1 M a un pH de 7,2, y 0,075  $\mu$ l de esta disolución se aplicaron a la membrana selectiva de iones. Finalmente, se preparó una disolución de membrana externa que contiene 0,12 g/ml de poliuretano (Thermedics, Inc., Woburn, Mass.) en THF, y 0,5  $\mu$ l de esta disolución se aplicaron sobre la capa de enzima para formar la membrana externa. El sensor de urea se montó en un cartucho desechable y se ensayó en un analizador GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, Mass.).

Durante el uso, los sensores de urea según la invención se calibran automáticamente usando disoluciones de calibración incluidas en el cartucho desechable según un protocolo predeterminado en toda la vida de uso del sensor. La calibración se efectúa para determinar la sensibilidad del sensor de urea a la urea (es decir, la pendiente de la curva de respuesta de la urea) y el coeficiente de selectividad del sensor para urea frente al potasio. Para determinar la sensibilidad de los sensores de urea según la invención, el sensor de urea descrito anteriormente se calibró con dos diferentes disoluciones de calibración. La primera disolución de calibración (Cal B), que contenía 1,0 mmol/l de urea y 2,0 mmol/l de potasio, se introdujo en el canal de la muestra del cartucho, y se registró la señal del sensor de urea. A continuación se reemplazó Cal B por la segunda disolución de calibración (Cal D), que contenía 7,5 mmol/l de urea y 15 mmol/l de potasio, y se registró la respuesta del sensor. Finalmente, la disolución de calibración se cambió de nuevo a Cal B, y se registró de nuevo la respuesta del sensor. El sensor está siempre empapado en la disolución Cal B, excepto durante la calibración y análisis de la muestra. Como se muestra en la FIG. 22, el sensor de urea respondió rápidamente y de una manera estable a cambios en las concentraciones de urea y potasio, lo que indica que los sensores de urea según la invención son capaces de análisis rápido de muestras analíticas.

A continuación, se evaluó el rendimiento analítico del sensor de urea analizando la concentración de urea de sesenta y dos muestras de sangre entera ensayadas durante un periodo de tres semanas. Las muestras de sangre se analizaron el cuarto, noveno, decimocuarto, y vigesimosegundo día del estudio. Para cada ensayo, se recogieron muestras de sangre entera heparinizada de individuos sanos y se enriquecieron con una disolución de urea concentrada para dar muestras con concentraciones de urea que varían de 5 a 70 mmol/l. El valor de la concentración de urea para cada muestra se determinó a continuación usando un sensor de urea según la invención como se describe anteriormente. Para comparación, cada alícuota se centrifugó después del análisis para aislar el plasma, y la concentración de urea en plasma se determinó usando un analizador químico clínico convencional (MONARCH, Instrumentation Laboratory Company, Lexington, Mass.). El analizador Monarch usa un método espectrofotométrico en combinación con una reacción bioenzimática de ureasa, glutamato deshidrogenasa, y NADH para detectar la concentración de urea en una muestra. Debido a que el analizador Monarch solo puede medir hasta 35 mmol/l de urea, las muestras de plasma se diluyeron con disolución salina previamente al análisis. Los resultados de los experimentos se resumen en la FIG. 23.

Como indica la FIG. 23, los valores de la concentración de urea obtenidos del sensor de urea de la presente invención se correlacionan bien con aquellos obtenidos usando el analizador Monarch ( $r=0,995$ ), lo que indica que el sensor de urea de la presente invención mide urea con igual precisión y exactitud que un analizador químico convencional. Los sensores de urea según la presente invención tienen el beneficio añadido de ser menos caros y más fáciles de usar que el analizador Monarch. Además, los experimentos indican que el sensor de urea tiene una vida útil de por lo menos dos semanas.

### Ejemplo 10

Las membranas selectivas de ion amonio de los sensores de urea según la invención pueden ser al menos parcialmente permeables a iones potasio, lo que puede conducir a valores erróneos de la concentración de urea. Un

5 método para corregir el valor de la concentración de urea por la interferencia del potasio implica medir independientemente la concentración de potasio en la muestra (usando, por ejemplo, un ISE de potasio como se describe aquí), determinando un factor de corrección basado en la concentración de potasio y el coeficiente de selectividad del sensor de urea frente a potasio, y a continuación restar el factor de corrección del valor medido de la concentración de urea para obtener el valor real de la concentración de urea de la muestra.

10 Para determinar si la interferencia del potasio se puede corregir para usar sensores de urea según la invención, se fabricaron dos sensores de urea según el método descrito en el Ejemplo 9 y se incorporaron en un cartucho desechable que también contenía un ISE de potasio. El coeficiente de selectividad de cada sensor de urea se determinó calibrando con dos disoluciones de calibración: Cal A (1,0 mmol/l de urea, 7,5 mmol/l de potasio) y Cal B (1,0 mmol/l de urea, 2,0 mmol/l de potasio). Cinco muestras de sangre entera se enriquecieron con diferentes cantidades de potasio, dando muestras con concentraciones de potasio que variaban de 8 a 24 mmol/l. Una muestra sin enriquecer tenía una concentración de potasio de 4,2 mmol/l, y una concentración de urea de 5,0 mmol/l. Cada muestra se introdujo en el cartucho, y se registraron los valores de la concentración de potasio y urea. Los valores de la concentración de urea se corrigieron basado en el coeficiente de selectividad y las concentraciones de potasio. 15 Los resultados de los experimentos se resumen en la Tabla 1, a continuación

Tabla 1

Concentración de potasio (mmol/l)	Concentración de urea corregida, Sensor 1 (mmol/l)	Concentración de urea corregida, Sensor 2 (mmol/l)
4,2	5,0	5,0
8,5	5,0	5,0
12,1	5,0	5,0
16,0	5,0	5,0
20,0	5,0	5,0
24,3	5,0	5,0

Como indica la Tabla 1, la interferencia de potasio se puede eliminar selectivamente para los sensores de urea según la presente invención.

20 Variaciones, modificaciones y otras implementaciones de lo que se describe aquí se les ocurrirán a los experiencia media en la técnica sin apartarse del alcance de la invención según se reivindica. Por consiguiente, la invención se va a definir no por la descripción ilustrativa precedente sino por el alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sensor para detectar urea en una muestra, que comprende:  
un electrodo;  
5 una membrana selectiva de iones que comprende una matriz de polímero que comprende un ionóforo selectivo de iones amonio;  
una capa enzimática dispuesta sobre la superficie de la membrana selectiva de iones, comprendiendo dicha capa enzimática ureasa; y  
una capa de difusión externa para entrar en contacto con una muestra, en la que la capa de difusión externa está dispuesta sobre la capa enzimática, es permeable a urea, y comprende poliuretano hidrófilo.
- 10 2. El sensor de la reivindicación 1, en el que el electrodo comprende un electrodo metálico, y en cuyo caso opcionalmente en el que el electrodo comprende un electrodo de plata/cloruro de plata.
3. El sensor de la reivindicación 1, en el que la capa enzimática:  
(a) cataliza la hidrólisis de urea a iones amonio; o  
(b) comprende adicionalmente uno o más estabilizantes de enzima; y en cuyo caso opcionalmente en el que el estabilizante de enzima se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos y proteínas inertes; y en el que opcionalmente: en el que el polipéptido comprende glutatión, o en el que la proteína inerte comprende seroalbúmina bovina; o  
(c) comprende ureasa reticulada con glutatión; y en cuyo caso opcionalmente comprende adicionalmente una o más proteínas inertes reticuladas con por lo menos una de la ureasa y el glutatión; y en cuyo caso opcionalmente en el que la proteína inerte comprende seroalbúmina bovina.
- 15 4. El sensor de la reivindicación 1, en el que la matriz de polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(cloruro de vinilo), poli(cloruro de vinilo) carboxilado, poli(cloruro de vinilo) hidroxilado, poliuretano, poli(tetrafluoroetileno), poli(metacrilato de metilo), caucho de silicona, y sus mezclas.
- 20 5. El sensor de la reivindicación 1, en el que el ionóforo se selecciona del grupo que consiste en nonactina, monactina, dinactina, trinactina, tetranactina, narasina, benzoéteres corona, depsipéptidos cíclicos, y sus mezclas.
- 25 6. El sensor de la reivindicación 1, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, saliva y orina.
7. Una tarjeta de sensores que comprende:  
un sustrato; y  
30 uno o más sensores de la reivindicación 1 dispuestos sobre o en el sustrato.
8. Un método para formar el sensor de la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de:  
proporcionar un electrodo;  
aplicar una capa de disolución interna al electrodo;  
aplicar sobre la capa de disolución interna una membrana selectiva de iones;  
35 aplicar a la membrana selectiva de iones una capa enzimática; y  
aplicar una capa de difusión externa sobre la capa enzimática,  
en el que el sensor detecta o mide urea en una muestra.
9. Un sensor para detectar urea en una muestra, que comprende:  
un electrodo y una membrana compuesta, comprendiendo dicha membrana compuesta  
40 una capa de disolución interna adyacente al electrodo;  
una membrana selectiva de iones colocada junto a la capa de disolución interna, comprendiendo dicha membrana selectiva de iones una matriz de poli(cloruro de vinilo) y nonactina;  
una capa enzimática dispuesta sobre la superficie de la membrana selectiva de iones, comprendiendo dicha capa

enzimática glutaraldehído, y ureasa reticulada con glutatión; y  
una capa de difusión externa permeable a urea y dispuesta sobre la capa enzimática,  
en el que la capa de difusión externa es para entrar en contacto con una muestra y comprende poliuretano hidrófilo.

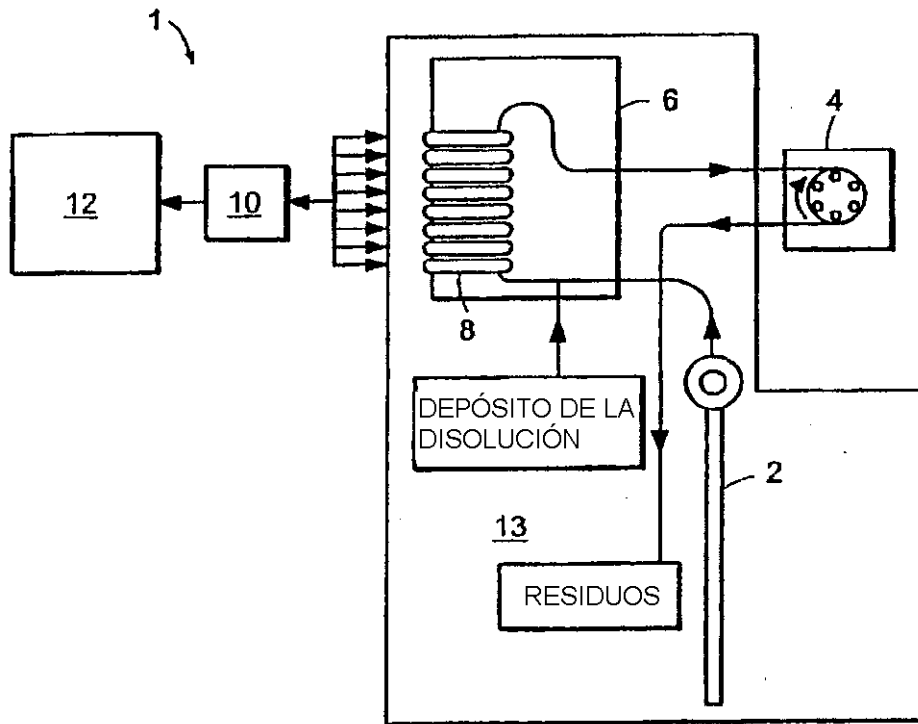


Fig. 1

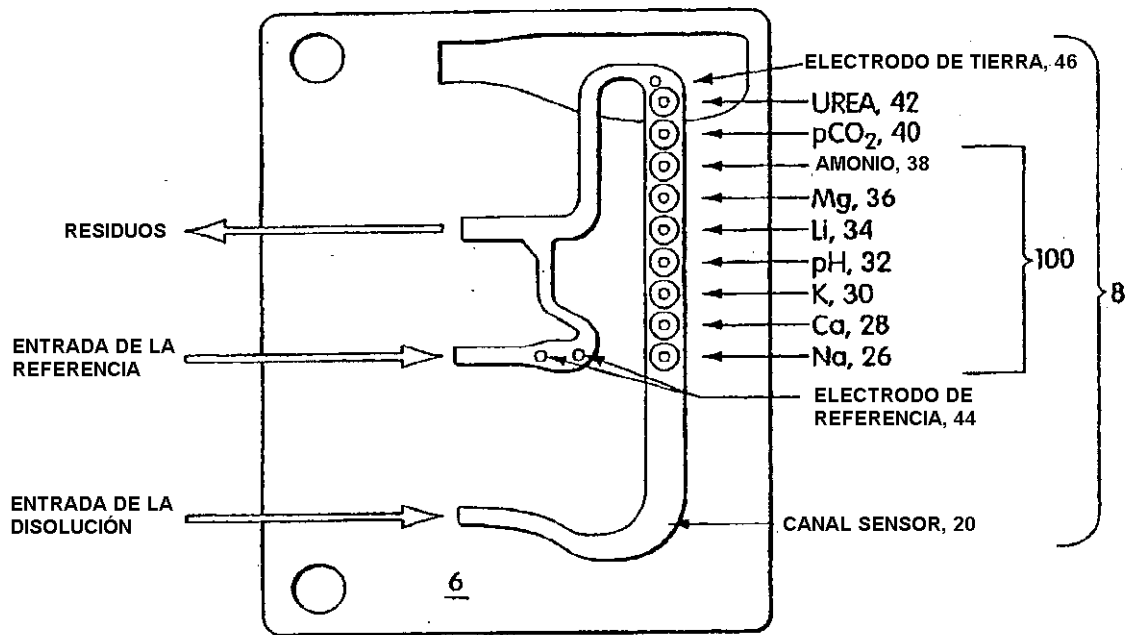


Fig. 2

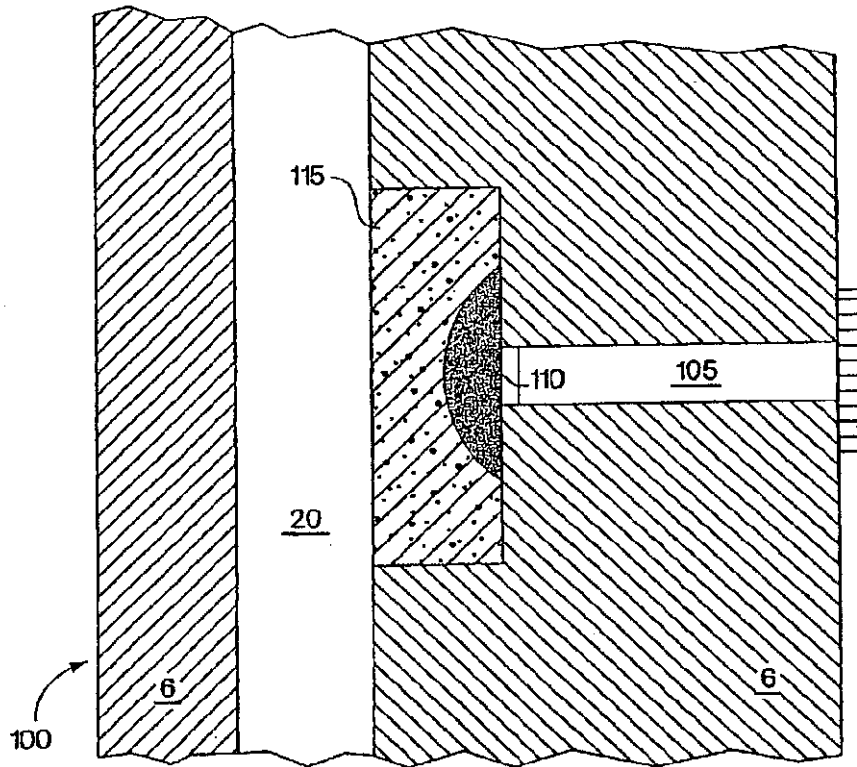


Fig. 3



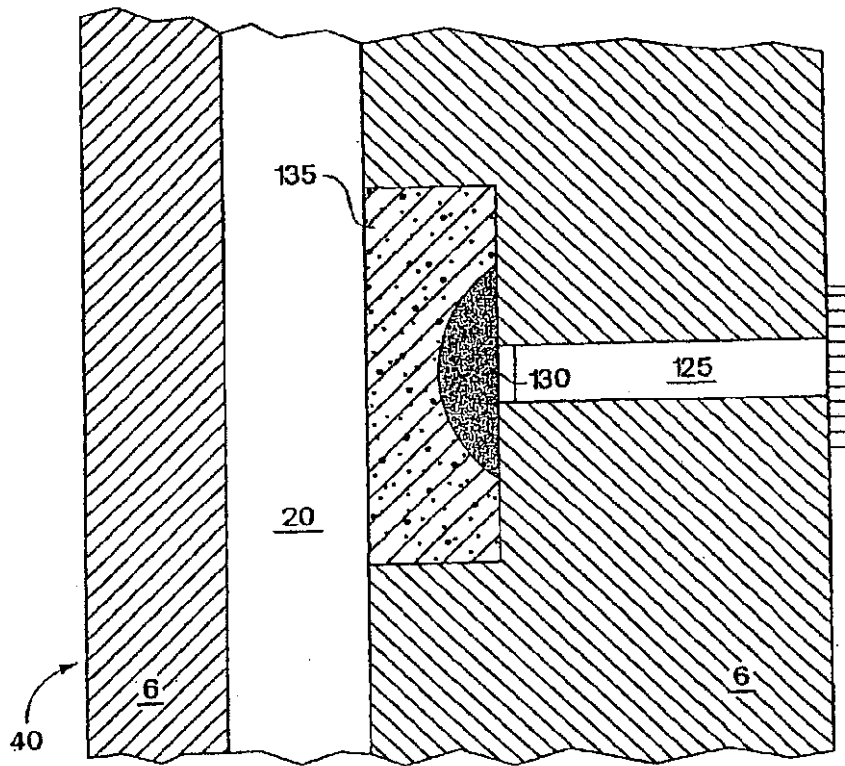


Fig. 4

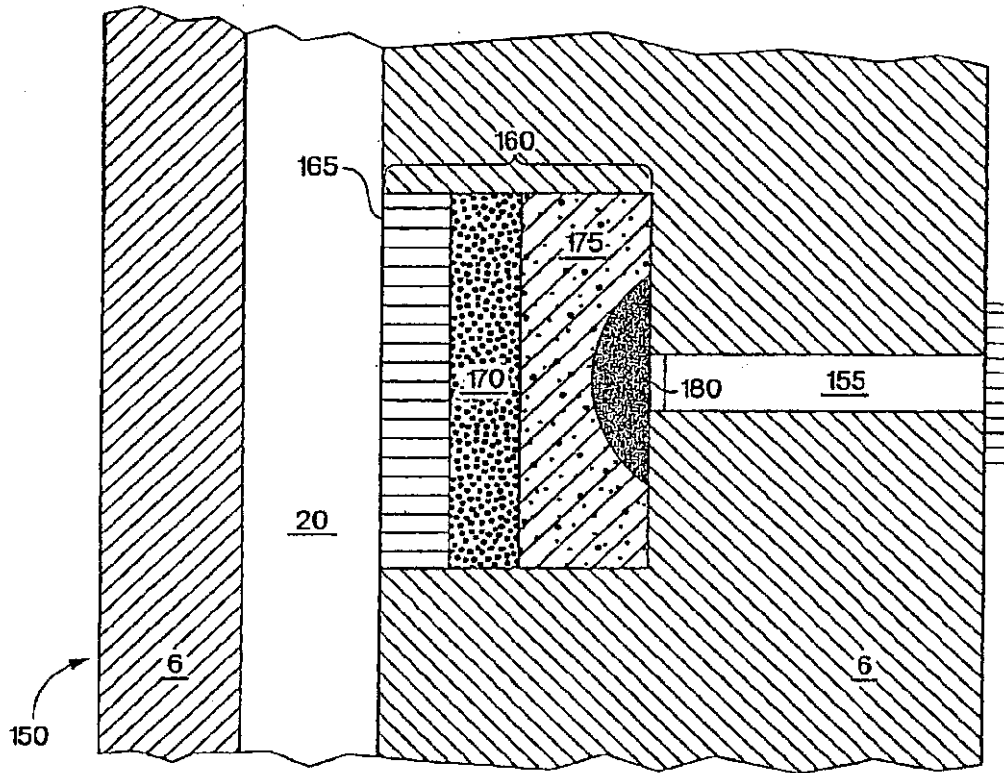


Fig. 5

**Tipo de Electrodo Selectivo de Iones**

Componente de membrana polimérica	Sodio	Potasio	Calcio	pH/Dióxido de carbono
Polímero	30 % <sup>1</sup> PVC-COOH <sup>2</sup>	32 % PVC-COOH <sup>2</sup>	32 % PVC-COOH <sup>2</sup>	30 % PVC-COOH <sup>2</sup>
Plastificante	61 % DOS <sup>3</sup>	64 % DOS <sup>3</sup>	63 % 1:1 DOS/NPOE <sup>4</sup>	61 % DOS <sup>3</sup>
Ionóforo	6.8 % Derivado de calixareno	3.5 % Valinomicina	3.6 % ETH 100 <sup>15</sup>	5.6 % TDDA <sup>6</sup>
Aditivo de sal lipófila	2.2 % KTTPB <sup>7</sup>	0.5 % KTpCIPB <sup>8</sup>	1.4 % KTpCIPB <sup>8</sup>	3.4 % KTpCIPB <sup>8</sup>

1. Todos los porcentajes son en % peso/peso  
 2. Poli(cloruro de vinilo) carboxilado, 1,8% en peso de COOH  
 3. Sebacato de bis(2-etilhexilo).  
 4. Mezcla 1:1 de sebacato de bis(2-etilhexilo) y o-nitrofenil-octil-éter  
 5. (-)-[R,R]-N,N'-(bis(11-etoxicarbonil)undecil)-N,N'-4,5-tetrametil-3,6-dioxaoctanodidecanoato; N,N'-[(4R,5R)-4,5-dimetil-1,8-dioxo-3,6-dioxaoctametileno]-bis(12-metilaminododecanoato) de dietilo.  
 6. Tridodecilamina  
 7. Tetraquis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato de potasio  
 8. Tetraquis[4-clorofenil]borato de potasio

Fig. 6

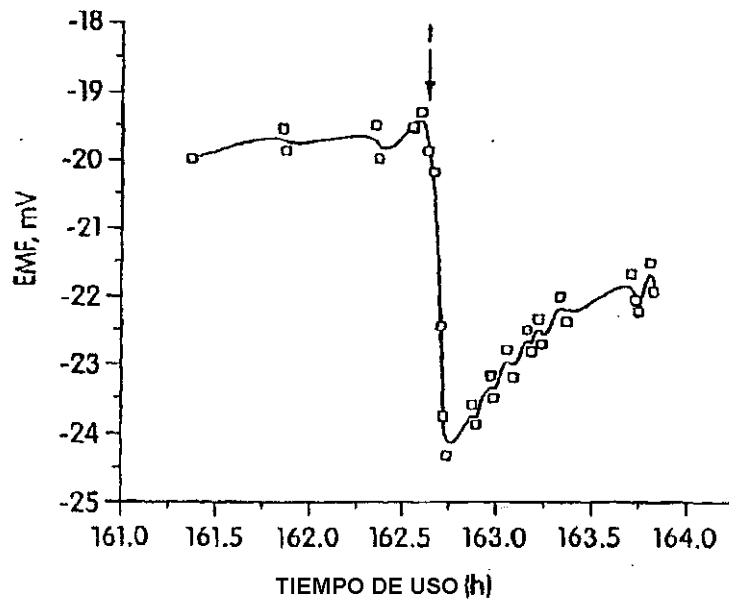


Fig. 7

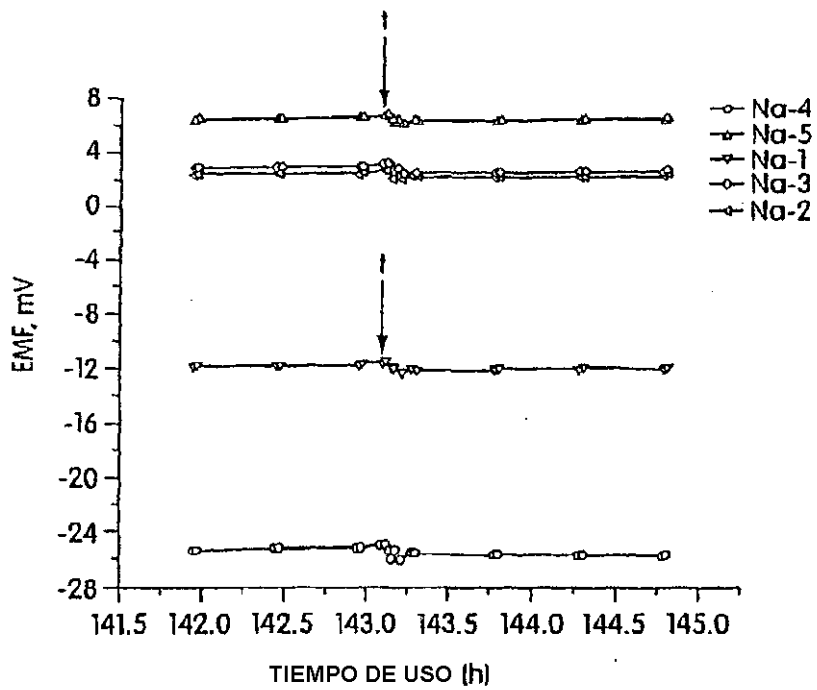


Fig. 8

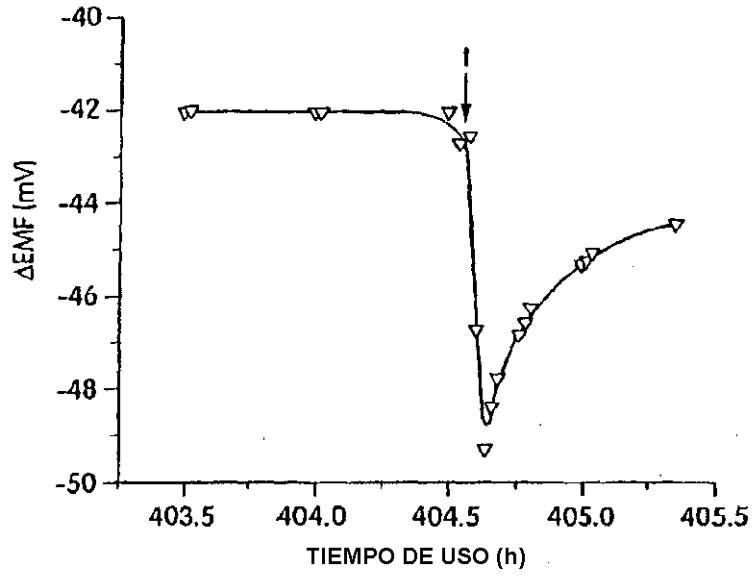


Fig. 9

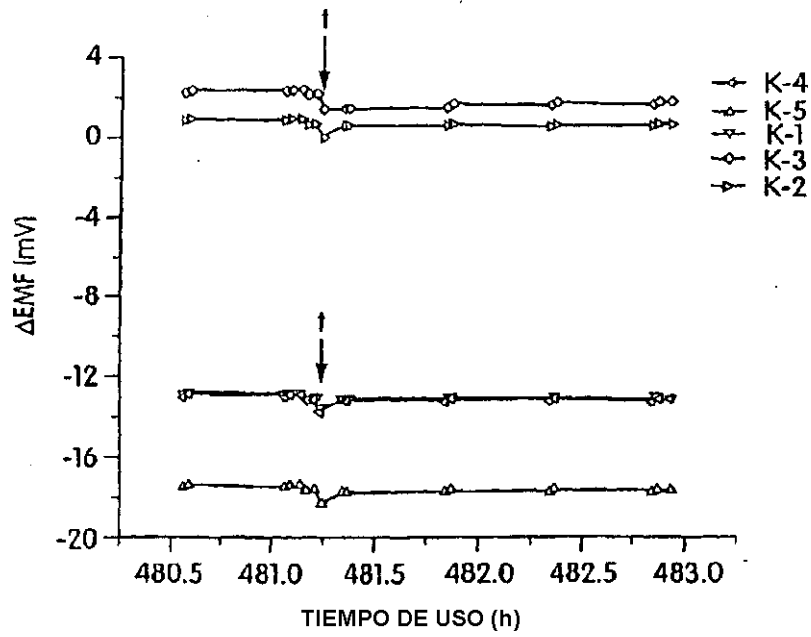


Fig. 10

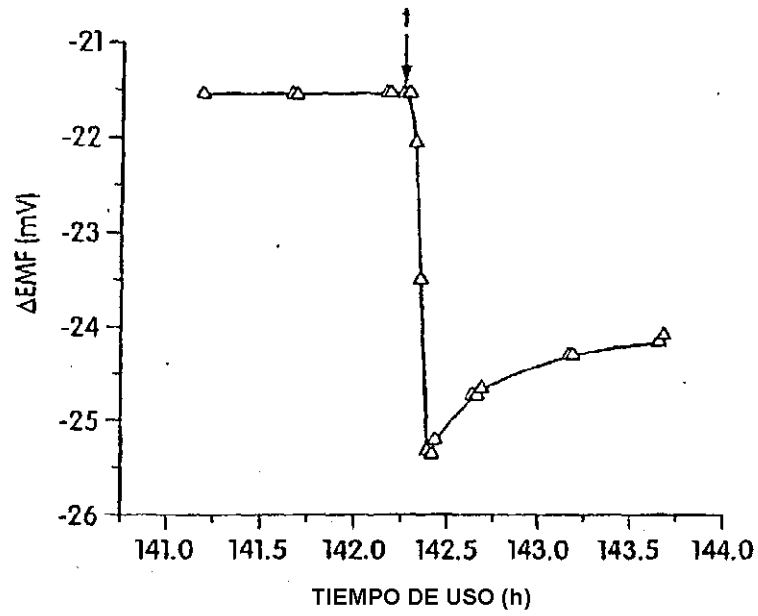


Fig. 11

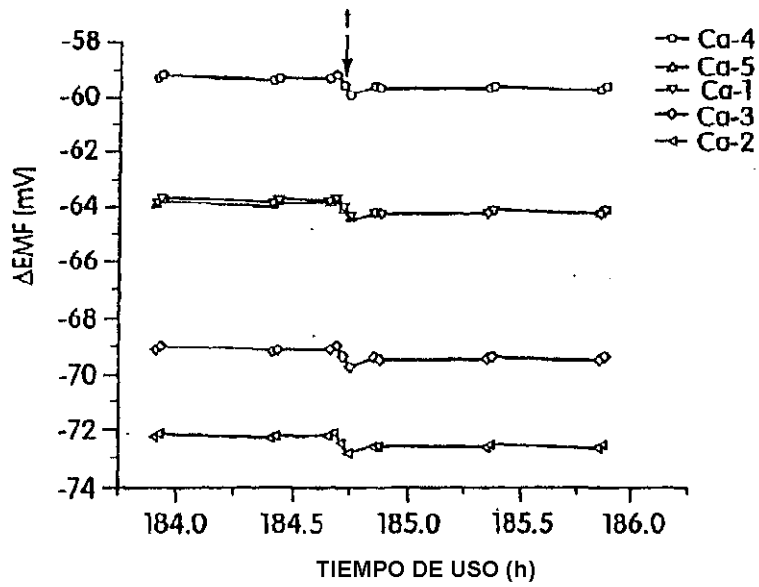


Fig. 12

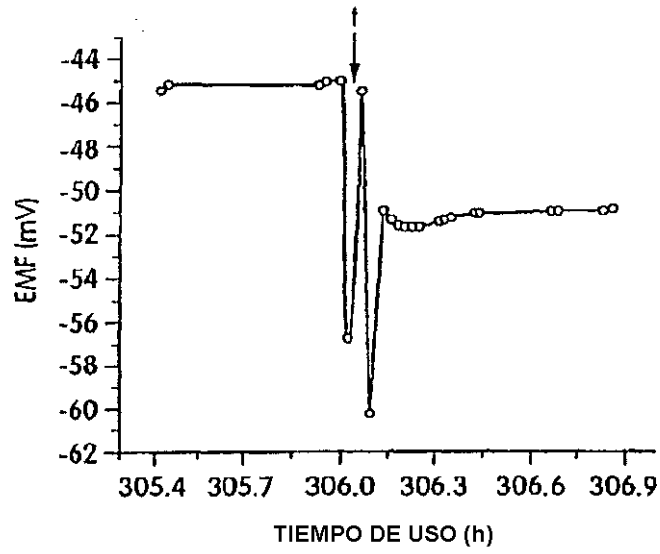


Fig. 13

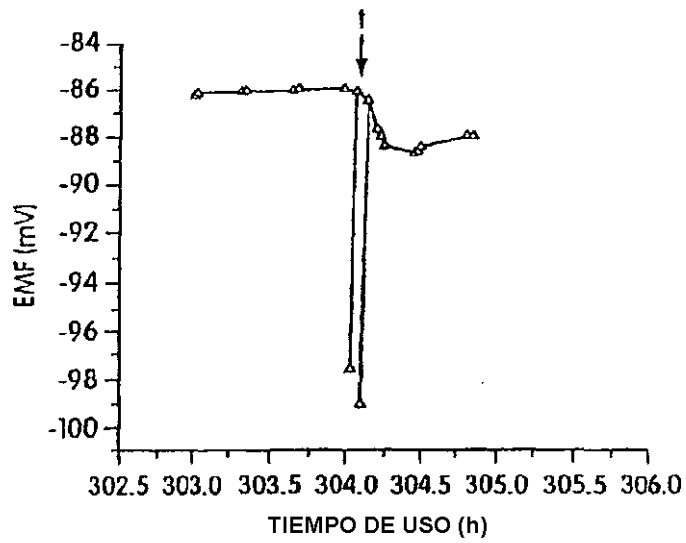


Fig. 14

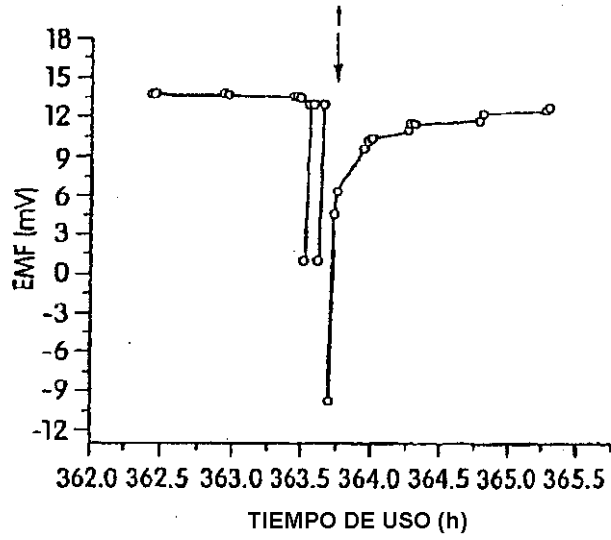


Fig. 15

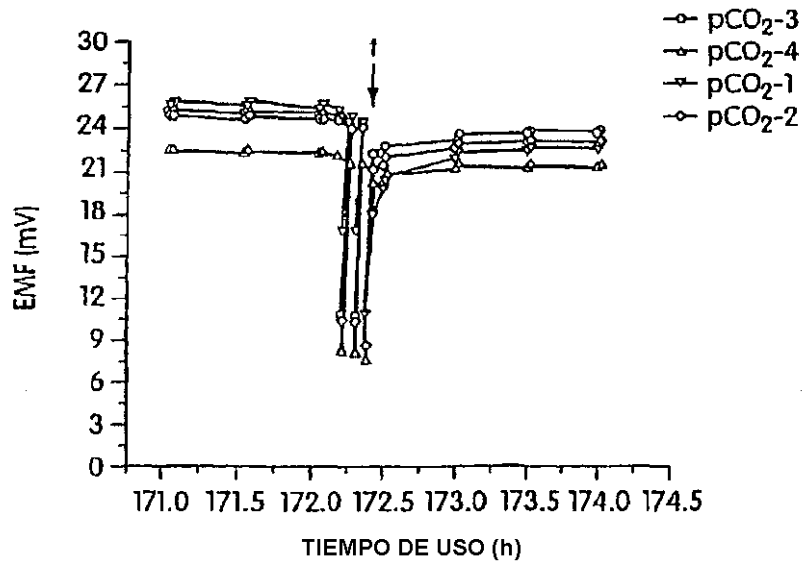


Fig. 16



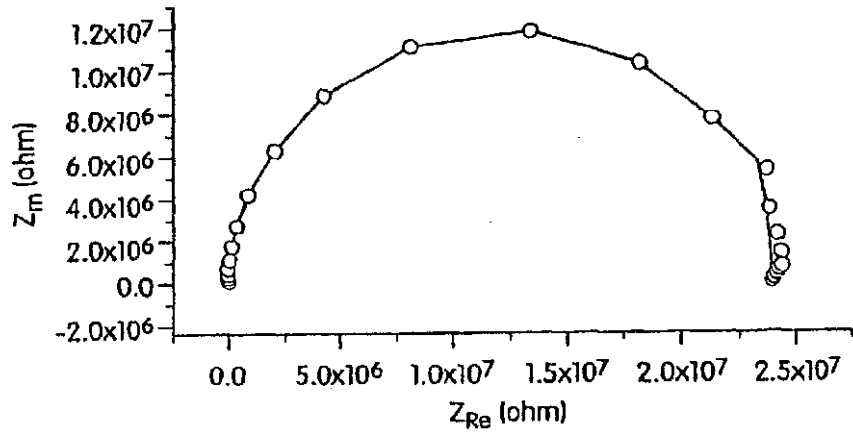


Fig. 17

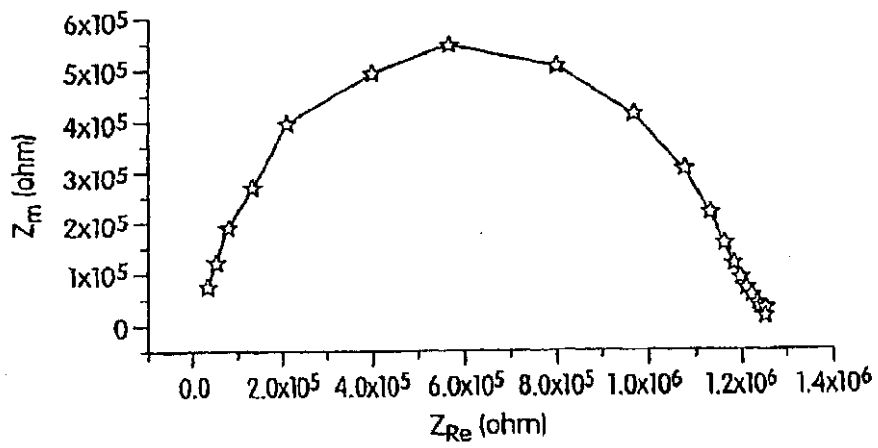


Fig. 18

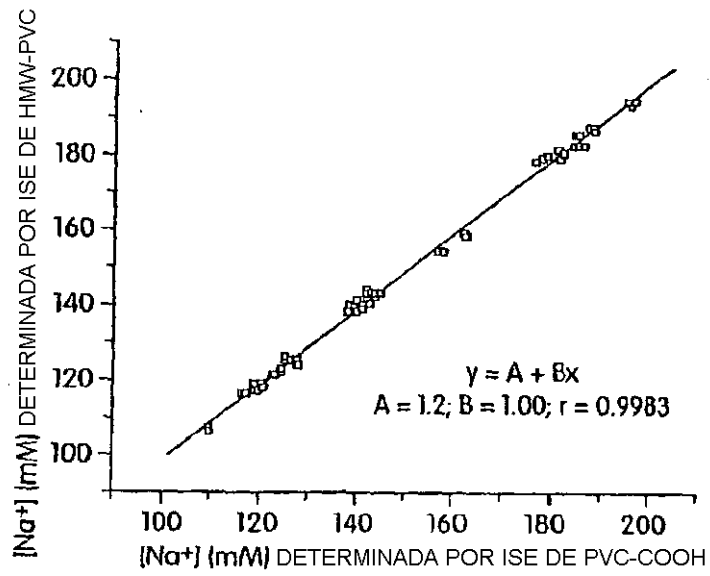


Fig. 19

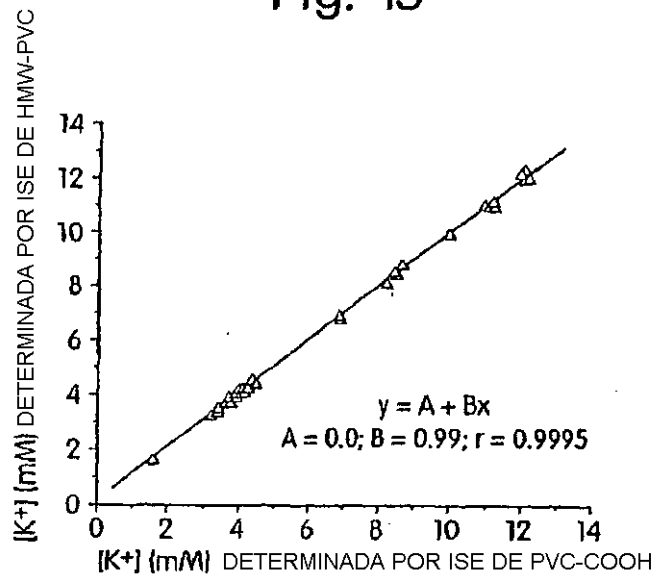


Fig. 20

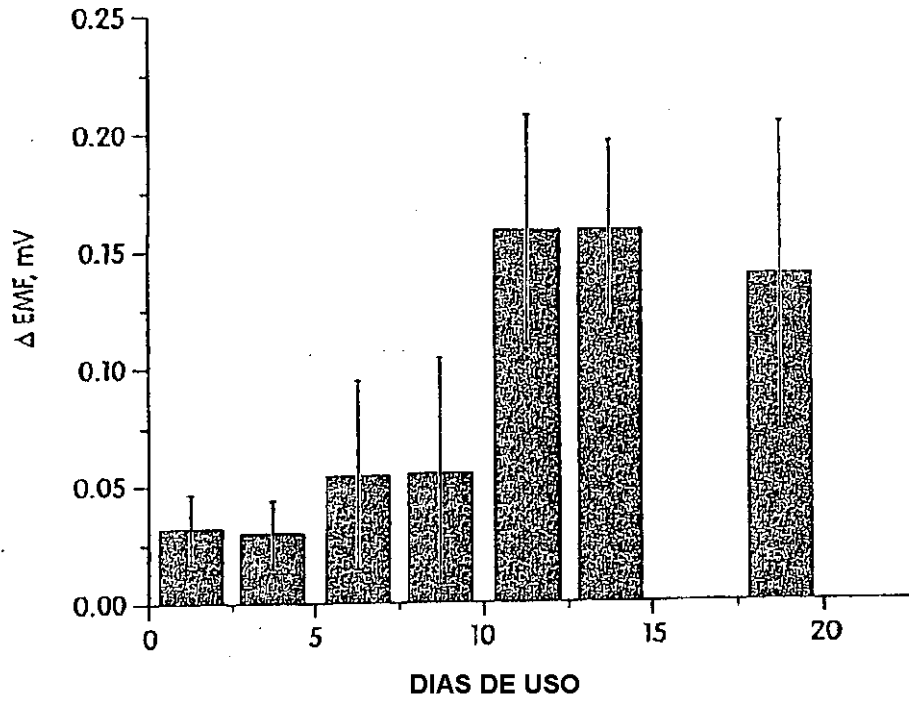


Fig. 21

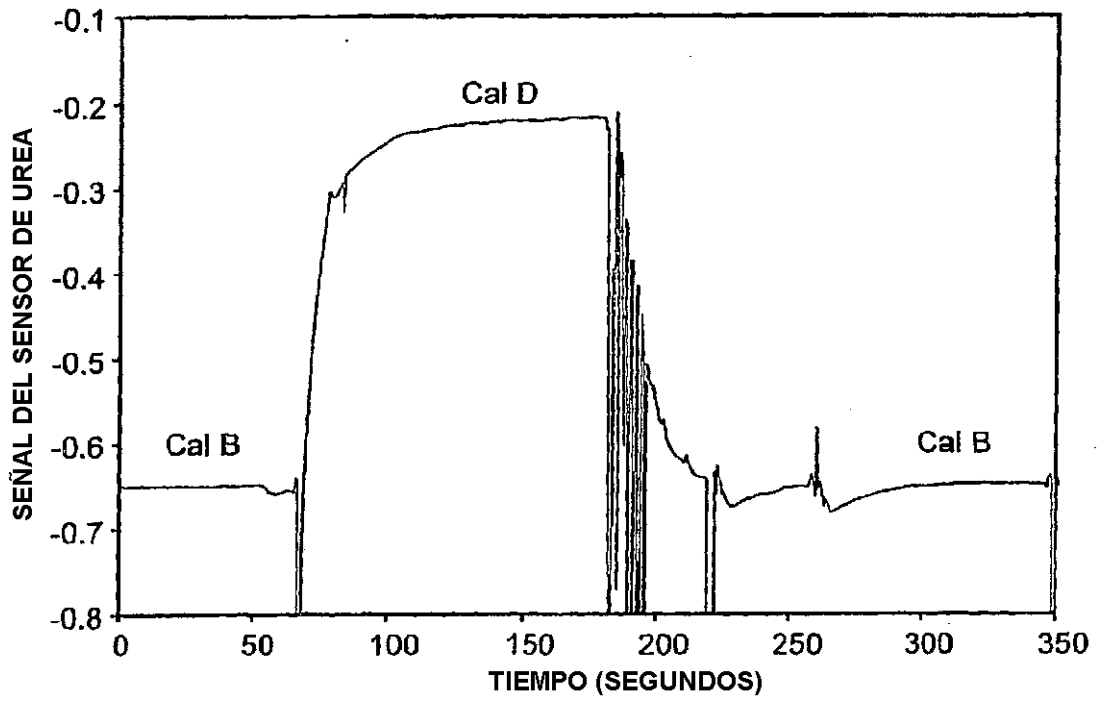


Fig. 22

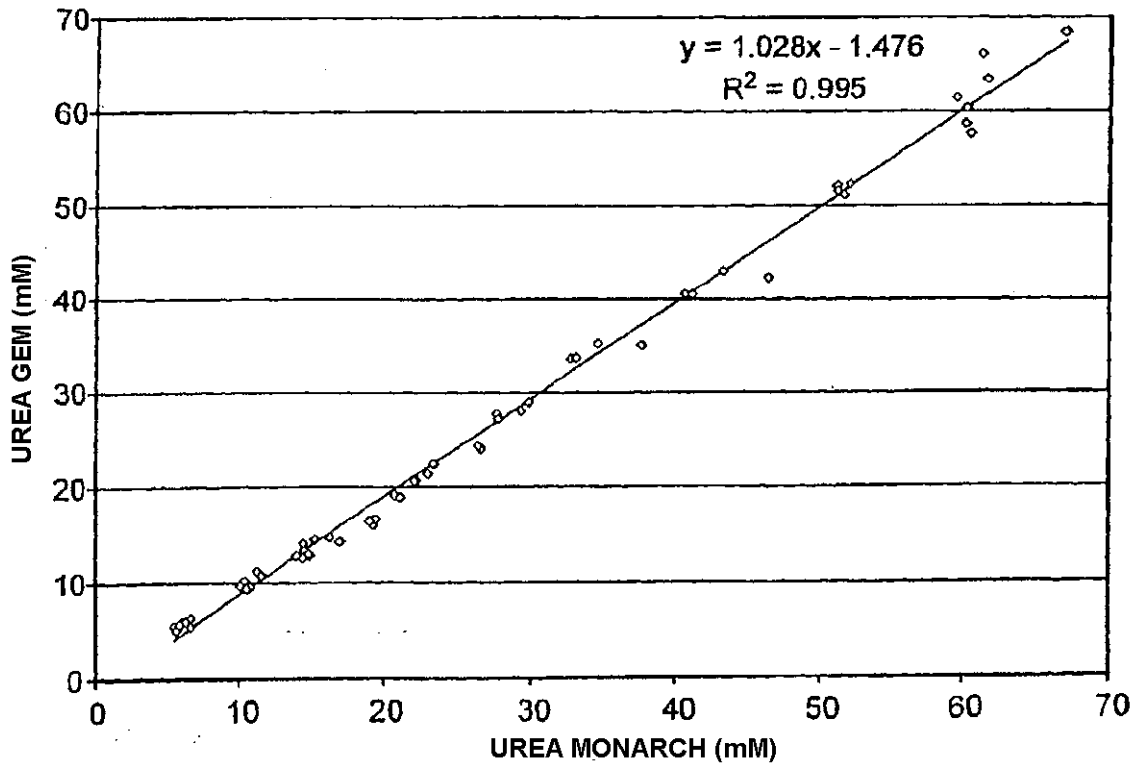


Fig. 23