



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112534058 B

(45) 授权公告日 2024.12.27

(21) 申请号 201980043624.2

(22) 申请日 2019.06.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112534058 A

(43) 申请公布日 2021.03.19

(30) 优先权数据
62/830,191 2019.04.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/035153 2019.06.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/204973 EN 2020.10.08

(73) 专利权人 仪器实验室公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 徐晓贤 P.帕米迪 H.严

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 詹承斌 宋莉

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

(56) 对比文件
KR 20060131311 A, 2006.12.20
US 2004256227 A1, 2004.12.23

审查员 谷城橙

权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

脲生物传感器和脲生物传感器在室温下的
稳定化

(57) 摘要

公开了在环境温度下稳定的脲生物传感器，
及其制造方法。

1. 生物传感器,其包含:
铵离子选择性电极,固定在离子选择性电极上的脲酶,电极表面上的扩散阻隔物,和
多糖,
其中所述生物传感器通过包括以下步骤的方法获得:
提供铵离子选择性电极;
将在溶液中的脲酶流延在PVC铵离子选择性电极的外表面上以形成酶层;
将扩散阻隔物施加在所述酶层的表面上;
将多糖溶液施加至铵离子选择性电极;
将电极干燥以形成生物传感器,
其中多糖选自蔗糖,以及
其中蔗糖溶液包含10%至15%的蔗糖。
2. 权利要求1的生物传感器,其中所述铵离子选择性电极包含选自银、铂和金的金属电极。
3. 权利要求1的生物传感器,其中所述铵离子选择性电极包含银/氯化银内部参比电极。
4. 权利要求1的生物传感器,其中铵离子选择性电极包含:
聚合物基体和
置于聚合物基体上的铵选择性离子载体。
5. 权利要求4的生物传感器,其中聚合物基体选自:聚氯乙烯,聚氨酯,聚四氟乙烯,聚甲基丙烯酸甲酯,硅橡胶,及其混合物。
6. 权利要求4的生物传感器,其中聚合物基体包含聚氯乙烯。
7. 权利要求4的生物传感器,其中铵选择性离子载体选自:无活菌素,单活菌素,二活菌素,三活菌素,四抗菌素,甲基盐霉素,六氧杂七环四十三烷,苯并冠醚,环状缩肽,及其混合物。
8. 权利要求4的生物传感器,其中离子载体包含无活菌素。
9. 权利要求1的生物传感器,其中所述脲酶是交联的。
10. 权利要求1的生物传感器,其中生物传感器能够测量脲。
11. 权利要求1的生物传感器,其中扩散阻隔物包含聚合化合物,其选自:聚氨酯,聚四氟乙烯离聚物,聚-2-羟甲基甲基丙烯酸酯,聚氯乙烯,乙酸纤维素,及其混合物和共聚物。
12. 权利要求11的生物传感器,其中聚四氟乙烯离聚物为全氟磺酸盐离聚物 NAFION®。
13. 权利要求1的生物传感器,其中多糖包含10%蔗糖。
14. 制造稳定的脲生物传感器的方法,其包括:
提供铵离子选择性电极;
将在溶液中的脲酶流延在PVC铵离子选择性电极的外表面上以形成酶层;
将扩散阻隔物施加在所述酶层的表面上;
将多糖溶液施加至铵离子选择性电极;
将电极干燥以形成稳定的脲生物传感器,
其中多糖选自蔗糖,

其中蔗糖溶液包含10%至15%的蔗糖。

15. 权利要求14的方法,其中所述脲酶是交联的。

16. 权利要求14的方法,其中脲酶通过选自以下的化学品交联:戊二醛,1,4-二异氰酸根丁烷,1,2,7,8-二环氧辛烷和1,2,9,10-二环氧癸烷,及其组合。

17. 权利要求14的方法,其中所述铵离子选择性电极选自由以下组成的电极的组:银,铂和金。

18. 权利要求14的方法,其中所述铵离子选择性电极包含银/氯化银电极。

19. 权利要求14的方法,其中生物传感器能够测量脲酶。

20. 权利要求14的方法,其中施加扩散阻隔物包括施加:聚氨酯,聚四氟乙烯离聚物,聚-2-羟甲基甲基丙烯酸酯,聚氯乙烯,乙酸纤维素,及其混合物和共聚物。

21. 权利要求20的方法,其中聚四氟乙烯离聚物为全氟磺酸盐离聚物 NAFION®。

22. 权利要求14的方法,其中施加多糖包括使电极暴露于多糖溶液至少30分钟。

23. 权利要求14的方法,其中生物传感器在环境温度下干储存5个月和21天使用后保持稳定的脲测量性能。

24. 容纳脲传感器的一次性盒,所述脲传感器包含:铵选择性电极,脲酶,电极表面上的扩散阻隔物,和多糖,

其中所述传感器通过包括以下步骤的方法获得:

提供铵离子选择性电极;

将在溶液中的脲酶流延在PVC铵离子选择性电极的外表面上以形成酶层;

将扩散阻隔物施加在所述酶层的表面上;

将多糖溶液施加至铵离子选择性电极;

将电极干燥以形成脲传感器,

其中多糖选自蔗糖,以及

其中蔗糖溶液包含10%至15%的蔗糖。

25. 权利要求24的一次性盒,进一步包含多个传感器的阵列和校准试剂。

26. 权利要求14的方法,其中在将脲酶酶溶施加至铵离子选择性电极之前,将多糖溶液添加至脲酶酶溶液。

27. 权利要求14的方法,其中在将扩散阻隔物施加至酶层之后,将多糖溶液添加至铵离子选择性电极。

28. 权利要求14的方法,其中在将酶溶液施加至铵离子选择性电极之前,将多糖溶液添加至酶溶液,并且在施加扩散阻隔物之后,将多糖溶液添加至铵离子选择性电极。

29. 权利要求14的方法,其中多糖溶液包含10%蔗糖。

脲生物传感器和脲生物传感器在室温下的稳定化

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2019年4月5日提交的美国临时申请No. 62/830,191的优先权和权益,并且出于所有意图和目的通过引用将其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及脲生物传感器及其制造方法,其具有在室温下的酶稳定性和延长的保存寿命和使用寿命。

背景技术

[0004] 酶生物传感器用于检测患者体液样品(比如血液)中的许多分析物,比如肌酸酐、肌酸、葡萄糖、脲和乳酸盐/酯。同样地,酶生物传感器在协助患者疾病的定点照护(point-of-care)诊断中是特别重要的。

[0005] 然而,酶生物传感器的缺点之一(特别是在定点照护应用中)是其在连续使用中和其在环境温度下的保存寿命(典型地小于15天)中的酶活性的损失。因此,保存寿命短是限制酶生物传感器(比如脲生物传感器)的实际应用的关键因素。

[0006] 保存寿命特别成问题的酶生物传感器是脲生物传感器。测量脲对患者管护是重要的,因为其在患者中确定肾功能不良是有帮助的。

[0007] 脲传感器是包含酶改性的铵离子选择性电极的生物传感器。脲水解是测量患者样品(比如血液、血清或血浆)中的脲的必要步骤,其通过脲传感器中的脲酶如下被催化:

[0008] $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{脲酶}} \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4\text{OH}$

[0009] 通过脲酶催化的脲水解之后产生的产物是铵离子。

[0010] 脲酶通过交联试剂(例如,戊二醛),或通过物理吸收(例如以水凝胶滞留(entrapment))而固定在铵离子选择性电极的表面上,以形成电极上的酶层。产物铵(NH_4^+)随后通过铵传感器以电位法检测,典型地在位于基底或卡上的传感器阵列中的传感器类型中的一种。传感器电位相对于卡参比电极(Ag/Ag^+)而测量并且基于能斯特方程与脲浓度的对数是成比例的。

[0011] 在形成在电极上固定的酶层之后,将渗透性的外部聚合物型膜施加在电极的酶层的顶部之上以保护酶(在此情况中是脲酶)在与患者体液样品接触时免于变性和限制脲底物从患者体液样品进入酶层的流(流量)。

[0012] 对于上述脲传感器的商业化、大量生产和准确地测量生物样品中的脲的实际应用,必须要克服一个主要的挑战。所述挑战是获得脲酶在范围为15-25°C、优选18-24°C、更优选20-24°C和24°C的环境温度下在至少5个月至一年或更长的储存(保存寿命)的长期稳定性。

[0013] 从设计原理来看,测量脲的脲传感器灵敏度(斜率)与生物传感器的电极上的固定的酶混合物的剩余活性直接相关。已知的是,生物活性组分(比如酶)是非常脆弱的(delicate)并且在环境温度下在延长的时间内是不稳定的。脲生物传感器因蛋白质变性导

致的灵敏度快速衰减(斜率损失),以及在高浓度下测量底物脲的准确度劣化(线性度损失)是其不稳定性和非常有限的使用寿命或保存寿命的基础。

[0014] 全血液分析仪,例如GEM Premier®分析仪(Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA),使用多用途、单消耗型盒,例如在转让给Instrumentation Laboratory Company (Bedford, MA)的并且出于所有意图和目的通过引用以其全文并入本文的美国专利No. 6,960,466和美国专利公开No2004/0256227A1中描述的盒。所述盒含有全部关键组件(传感器阵列、参比溶液、冲洗液和校准试剂),包括用于血液分析物的血液测量的至少一个脲传感器,并且需要环境温度储存至少5个月。

[0015] 具有类似设计的大多数市售脲传感器通过冷藏生物传感器的关键部件来解决脲传感器的短使用寿命和保存寿命,以延长其保存寿命。然而,该方法为医院的定点照护位置处的现场操作员的仪器操作添加复杂性。对于GEM®PAK盒(Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA),例如,生物传感器是盒的组成特征和关键特征。脲酶传感器是盒的组成部分,并且由于以下原因,将整个盒储存在冷藏中是不切实际的:盒尺寸和试剂稳定性,例如,参比溶液的试剂稳定性和校准溶液的气体 pO_2 和 pCO_2 的稳定化。

[0016] 已经尝试过的维持脲传感器中的脲酶活性的其他方法包括将酶固定方法从化学交联固定变为物理吸附(用聚氨酯滞留脲酶)。所述滞留方法一般提供不了如通过交联的化学键合那样的脲酶的强固定,并且在聚氨酯中混合酶还可影响脲传感器响应时间。

[0017] 文献中已经报道了可用单糖或多糖维持处于游离形式的干阶段(stage)或溶液形式的生物活性物质(比如酶)的活性。

[0018] 糖类可用作稳定剂来维持在冷冻干燥(冻干)期间的游离形式的酶。然而,使一种酶最佳地稳定化的特定糖是基于糖的结构、酶的亲水性/疏水性及其与水和稳定剂的相互作用。

[0019] 据推测在水的存在下,糖中含有的多羟基基团可与水形成复合物,并且此复合物能够渗透入酶结构中,甚至在交联阶段也是如此。据信,所述复合物可减少导致变性的酶结构的展开,并且由此保持酶的活性。

[0020] 然而,将酶脲酶在脲传感器中夹在两个聚合物层之间带来了酶和两个聚合物层中的组分(离子载体、增塑剂、亲脂盐、有机溶剂等)之间的更复杂的相互作用,引起在传感器的制备期间或在环境温度下保存储存期间的酶的不稳定性。这些相互作用导致低于预期的性能。本文描述的本发明的目的是解决脲传感器由于酶与其他化学组分的交叉相互作用产生的不稳定性,目的是提高脲传感器储存期间脲酶的稳定性的。本文描述的本发明提高并且涉及至少5个月的在室温下的稳定的脲传感器的储存。

发明内容

[0021] 本发明涉及在室温下稳定的脲生物传感器、制造方法和容纳所述稳定的脲生物传感器的盒。术语传感器和生物传感器在全文中可互换使用。

[0022] 在一个方面,本发明涉及制造脲生物传感器的方法,所述生物传感器具有在环境温度下至少5个月保存寿命的稳定性和额外三周的使用寿命。所述方法包括:提供电极,如在美国专利公开No. 2004/0256227A1 (EP1753872B1) (其通过引用而并入本文)中描述的那样在覆盖有AgCl和作为内部参比电极的内部层的银电极表面上制备聚氯乙烯(PVC)基铵离

子选择性膜,在PVC膜的外表面上流延在溶液中的脲酶酶,即,酶混合物,以形成酶层,将扩散阻隔物施加在酶层的表面上,将多糖溶液施加至脲传感器,并且干燥传感器以形成稳定的脲生物传感器。

[0023] 生物传感器的内部参比电极选自例如由以下组成的金属的组:银,铂或金,并且覆盖有AgCl和电解质内部层。内部电介质层通过在Ag/AgCl电极表面上流延内部溶液而形成,所述内部溶液包含MES缓冲液、氯化钠、氯化铵和羟乙基纤维素(HEC)。

[0024] 脲生物传感器能够测量体液样品(比如血液、血浆或血清)中的脲。

[0025] 在多个实施方式中,将多糖溶液施加至脲生物传感器的步骤包括施加一种或多种多糖,比如但不限于,二糖蔗糖、海藻糖和乳糖醇,三糖棉子糖,和其他多糖。可在用酶混合物对传感器流延之前将多糖添加至酶混合物,或者在将外部扩散膜施加至传感器之后将多糖添加到溶液中,或作为以上步骤的组合而添加。在组装之后,可将脲生物传感器浸入到多糖溶液中,干燥,并且再次浸入到多糖溶液中,随后每次都进行干燥。任选地,将脲生物传感器浸入到多糖溶液中可重复多次,随后每次都进行干燥。溶液中多糖的浓度范围为大于0%至约25%,并且多糖处理的持续时间为三十分钟或更长。

[0026] 施加扩散阻隔物包括向电极施加聚合化合物以形成与引入到体液样品流室(在其中测量脲)的体液样品接触的外部扩散膜,所述聚合化合物选自:聚氨酯,聚(四氟乙烯)离聚物(全氟磺酸盐离聚物,NAFION®),聚(2-羟基甲基甲基丙烯酸酯),聚氯乙烯,乙酸纤维素,及其混合物和共聚物。酶层位于外部扩散膜和铵选择性PVC膜之间。

[0027] 在环境温度下至少5个月储存和21天使用之后,根据本发明的方法的稳定的脲生物传感器保持稳定的脲测量性能。

[0028] 在另一方面,本发明涉及脲生物传感器,其包含:铵选择性电极,作为酶层的固定在铵选择性聚合物膜上的脲酶,酶层的表面上的扩散阻隔物,和多糖。在上文描述了电极、铵选择性聚合物膜、酶、交联剂、多糖、扩散阻隔物和脲生物传感器的稳定性。

[0029] 在又一方面,本发明涉及容纳处于传感器阵列中的至少一个脲传感器的盒,所述至少一个脲传感器包含:铵选择性膜,包含脲酶的酶层,邻近体液样品流室的在酶层的表面上的扩散阻隔物,和多糖。在上文描述了脲传感器和脲生物传感器的稳定性,所述脲传感器包含:电极,铵选择性聚合物膜,酶,交联剂,多糖,扩散阻隔物。在根据本发明的一个实施方式中,除了具有包括根据本发明的酶生物传感器的传感器阵列的卡之外,所述盒还容纳处于传感器阵列中的上文描述的至少一个脲传感器,以及还额外包括:参比溶液,流体通道,校准试剂,冲洗液和与临床分析仪操作性地对接的电子组件,和其他关键组件。

附图说明

[0030] 图1是根据本发明的脲生物传感器的一个实施方式的横截面图解说明。

[0031] 图2A是在二十二个脲传感器中蔗糖处理对脲测量的线性度的影响的图例;样品中的高脲浓度(70mg/dL)测量相对于盒寿命(age,年龄),具有在蔗糖处理后3小时干燥时间;

[0032] 图2B是在图2A中的二十二个脲传感器上,对于两个或三个蔗糖处理因素(从传感器制造到传感器二糖处理的时间延迟(天);二糖处理浸泡时间的长度(小时);二糖处理的传感器干燥时间的长度小时)的组合而言,蔗糖处理对脲测量(mg/dl)的影响的图例;

[0033] 图3A是在两周的短传感器保存寿命之后和最高达3周的使用寿命中,测量的高脲

浓度 (95mg/dL) 相对于十二个脲生物传感器的盒寿命的图例;在3周使用寿命中的高脲样品 (95mg/dL) 中的每日的脲浓度测量;

[0034] 图3B是在环境温度下储存5个月和最高达3周的使用寿命中,测量的高脲浓度 (95mg/dL) 相对于十二个脲生物传感器的盒寿命的图例。在3周使用寿命中高脲样品 (95mg/dL) 中的每日的脲浓度测量。

具体实施方式

[0035] 以下描述的发明涉及用于增强可用于体外诊断、特别是定点照护应用的临床分析仪中的脲生物传感器的酶稳定性和延长其保存寿命和使用寿命的装置和相关方法。

[0036] 根据本发明,多糖(例如二糖,比如蔗糖)是维持脲生物传感器系统的稳定性和活性并且延长其保存寿命和使用寿命的最优成分。其他多糖比如海藻糖(α -D-吡喃葡萄糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷)、棉子糖(O- α -D-半乳吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-吡喃葡萄糖基 β -D-呋喃果糖苷)和乳糖醇(4-O- β -D-半乳吡喃糖基-D-葡萄糖醇)(全部多糖都从Sigma获得)还改进了脲生物传感器中的脲酶的稳定性和活性,延长了其保存寿命和使用寿命。

[0037] 为简单起见,10%蔗糖用作以下呈现的研究的示例多糖。凭借蔗糖稳定化,观察到在环境温度下保持脲酶的活性的显著改进。在蔗糖处理酶稳定化之后在室温下储存脲传感器时,实现了至少5个月的稳定保存寿命。

[0038] 如下文所描述,发明人确定二糖(例如,蔗糖)是用于维持和使脲生物传感器的活性具有稳定性的最佳组分之一。其他多糖比如海藻糖、棉子糖和乳糖醇也对脲传感器具有类似的效果,改进稳定性。

[0039] 图1中所示的典型的脲生物传感器150包含嵌在电极卡6中的金属元件155和复合膜160,复合膜160位于金属元件155和流动通过电极卡6中的通道20的分析样品之间。复合膜160包括:邻近患者样品通道20的外部扩散膜165,酶层170,铵选择性聚合物膜175,和邻近金属元件155的内部溶液层180。

[0040] 外部扩散层165控制分析物向酶层170中的扩散并且保护脲生物传感器150的其他组分免于与通道20中的分析样品直接接触。酶层170可包括至少一种酶或多种酶的混合物、蛋白质和与特定的分析物(即,患者样品中的脲)反应的稳定剂。如果分析物扩散通过外部扩散膜165到酶层中,则其可与酶层170中的酶反应以产生化学副产物,在脲的情况下为铵离子。跨复合膜160产生电势,所述电势取决于化学副产物的浓度,所述化学副产物的浓度与分析样品中的脲的浓度成比例。PVC可为铵选择性聚合物膜175的构成成分。

[0041] 在本发明的一个实施方式中,制造根据本发明的稳定的二糖处理的脲传感器的步骤包括:

[0042] (i) 在覆盖有AgCl和内部溶液层180的银表面155上制造聚氯乙烯(PVC)基铵离子选择性传感器以形成内部参比电极,PVC铵离子选择性膜175组成描述在美国专利公开No.2004/0256227中,出于所有意图和目的将其通过引用并入本文;然后

[0043] (ii) 固定脲酶,以在PVC膜175的外表面上形成酶层170,例如通过施加交联试剂进行,如果施加的话,交联剂例如选自:戊二醛,二异氰酸根丁烷,二异氰酸根,1,2,7,8-二环氧辛烷,1,2,9,10-二环氧癸烷,及其组合;替代地,在PVC膜175的外表面上固定一种或多种酶可通过物理吸收(例如用水凝胶滞留)实现;然后

[0044] (iii) 向酶层170施加亲水性聚氨酯层以形成外部扩散膜165用于酶保护和扩散控制,或施加一种或多种以下聚合物,比如:聚(四氟乙烯)离聚物(全氟磺酸盐离聚物, NAFION[®]),聚(2-羟基甲基甲基丙烯酸酯),聚氯乙烯,乙酸纤维素,或其混合物和共聚物;然后,

[0045] (iv) 使脲传感器150暴露于多糖溶液,比如蔗糖溶液或替代地海藻糖、棉子糖或乳糖醇的溶液,浓度(w/v)范围为>0%至2%,2%至25%,2%至20%,5%至15%,10%至15%,优选10%的溶液,达至少30分钟至24小时,至少30分钟至240分钟,至少30分钟至120分钟,至少30分钟至60分钟,优选至少30分钟;然后

[0046] (v) 空气干燥多糖处理的脲传感器150;和

[0047] (vi) 在环境条件下储存脲传感器150直到使用,例如,5个月或更长。

[0048] 在制造稳定的脲生物传感器150的替代实施方式中,所述步骤包括;

[0049] (i) 在覆盖有AgCl和内部溶液层180的银表面155上制造聚氯乙烯(PVC)基铵离子选择性传感器以形成内部参比电极,PVC铵离子选择性膜175组成如上所述;

[0050] (ii) 制备在多糖溶液中的脲酶,所述多糖溶液为比如蔗糖溶液或替代地海藻糖、棉子糖、或乳糖醇的溶液,浓度(w/v)范围为>0%至2%,2%至25%,2%至20%,5%至15%,10%至15%,优选10%的溶液

[0051] (iii) 施加在步骤(ii)中描述的脲酶-多糖溶液并且使在多糖溶液中的酶脲酶固定在PVC膜175的外表面上以形成酶层170,例如通过施加交联试剂进行,如果施加的话,交联剂例如选自:戊二醛,二异氰酸根丁烷,二异氰酸根,1,2,7,8-二环氧辛烷,1,2,9,10-二环氧癸烷,及其组合;然后

[0052] (iv) 向酶层170施加亲水性聚氨酯层165或一种或多种以下聚合物用于酶保护和扩散控制,所述聚合物为比如:聚(四氟乙烯)离聚物(全氟磺酸盐离聚物, NAFION[®]),聚(2-羟基甲基甲基丙烯酸酯),聚氯乙烯,乙酸纤维素,或其混合物和共聚物;然后

[0053] (v) 在环境条件下储存脲传感器150直到使用,例如,5个月或更长。

[0054] 在制造稳定的脲生物传感器150的另一个实施方式中,所述步骤包括:

[0055] (i) 在覆盖有AgCl和内部溶液层180的银表面155上制造聚氯乙烯(PVC)基铵离子选择性传感器以形成内部参比电极,PVC铵离子选择性膜175组成如上所述;

[0056] (ii) 制备在多糖溶液中的脲酶酶溶液,所述多糖溶液为比如在水中的蔗糖溶液或替代地海藻糖、棉子糖或乳糖醇的溶液,浓度(w/v)范围为>0%2%至25%,2%至20%,5%至15%,10%至15%,优选10%的溶液;

[0057] (iii) 施加在步骤(ii)中描述的脲酶酶-多糖溶液并且使在多糖溶液中的酶脲酶固定在PVC膜175的外表面上以形成酶层170,例如通过施加交联试剂进行,如果施用的话,交联剂例如选自:戊二醛,二异氰酸根丁烷,二异氰酸根,1,2,7,8-二环氧辛烷,1,2,9,10-二环氧癸烷,及其组合;然后

[0058] (iv) 向酶层170施加亲水性聚氨酯层165或一种或多种以下聚合物用于酶保护和扩散控制,所述聚合物为比如:聚(四氟乙烯)离聚物(全氟磺酸盐离聚物, NAFION[®]),聚(2-羟基甲基甲基丙烯酸酯),聚氯乙烯,乙酸纤维素,或其混合物和共聚物;然后

[0059] (v) 使脲传感器150暴露于多糖溶液,比如蔗糖溶液或替代地海藻糖、棉子糖或乳

糖醇的溶液,浓度(w/v)范围为>0%至2%,2%至25%,2%至20%,5%至15%,10%至15%,优选10%的溶液,达至少30分钟至24小时,至少30分钟至240分钟,至少30分钟至120分钟,至少30分钟至60分钟,优选至少30分钟;然后

[0060] 空气干燥多糖处理的脲传感器150;任选地重复使传感器暴露于多糖溶液的步骤一次,两次,3-4次,5-8次,以及9-10次,然后

[0061] 在环境条件下储存脲传感器150直到使用,例如,五个月或更长。

[0062] 实施例

[0063] 实施例1

[0064] 以下描述的实施例1提供了制造以蔗糖稳定化的脲传感器的方法的一种实施方式。

[0065] 1.根据本发明的一个方法,例如,在THF中制备用于铵选择性聚合物膜的溶液并且其按重量计含有:25-35%PVC,60-70%DOS,1-5%无活菌素,和0-1%KTpClPB。

[0066] 无活菌素是具有对铵的特定选择性的离子载体。其他试剂,例如,单活菌素、二活菌素、三活菌素、四抗菌素、甲基盐霉素、苯并冠醚、环状缩肽以及前述物质的混合物,也可用于此目的。

[0067] DOS(二(2-乙基己基)癸二酸酯)是增塑剂。邻硝基苯基辛醚(NPOE)是另一种常用的增塑剂。

[0068] KTpClPB(四[4-氯苯基]硼酸钾)是亲脂盐。四[3,5-双(三氟甲基)苯基]硼酸钾(KTTFPB)也可用于此目的。

[0069] 除PVC之外,聚合物膜还可包括,例如:聚氨酯,聚(四氟乙烯),聚(甲基丙烯酸甲酯),硅橡胶,和以上物质的混合物。

[0070] THF(四氢呋喃)是溶剂。环己酮也可用于此目的。

[0071] 2.铵传感器是平面的并且通过在Ag/AgCl金属电极和内部电解质层上流延如上所述制备的铵选择性聚合物膜溶液而形成,并且所述内部电解质层形成嵌在固体基底(例如,但不限于PVC)中的内部参比电极。内部电解质层通过在Ag/AgCl电极表面上流延内部溶液而形成。所述内部溶液含有,例如,在水中的65%MES缓冲液、1%氯化钠、1%氯化铵和33%HEC(重量百分数)。

[0072] 3.酶层通过在铵选择性PVC膜的外表面上流延酶溶液而形成。所述酶溶液包括脲酶、酶稳定剂谷胱甘肽、惰性蛋白质牛血清白蛋白、交联试剂戊二醛和溶剂。谷胱甘肽与一种或多种惰性蛋白质(例如牛血清白蛋白)一起使用,以使得酶层中的脲酶稳定化。交联还将酶层束缚至下面的离子选择性聚合物层。在制造酶层期间,一般在添加交联试剂之前将酶稳定剂添加至含有酶的溶液,以确保稳定剂与酶交联在一起。在pH为7.2的0.1M磷酸盐缓冲液中制备典型的酶溶液,其含有50mg/mL脲酶、20mg/mL谷胱甘肽、10mg/mL牛血清白蛋白和0.12%戊二醛,并且将溶液施加至铵离子选择性PVC膜的顶部。

[0073] 4.聚氨酯(PU)是在医疗装置中的许多成功的体内和体外应用中具有优异的生物相容性的聚合物中的一种。为此应用选择的优化的具体的亲水性医疗级聚氨酯类别为来自Lubrizol(Wickliffe,Ohio)的TecophlicTM和TecoflexTM。这些市售聚合物树脂是脂族的、聚醚基聚氨酯,其可溶解在有机溶剂或溶剂(比如二甲基乙酰胺(DMA)、四氢呋喃(THF)等)的混合物中。在这些聚氨酯类别中,存在可用的具有用于不同应用的多种硬度和吸水率水

平的组合的不同级别的材料。在多个实施方式中,与患者样品接触的脲生物传感器的外部扩散膜包括一个或多个相同或不同的聚合物和/或相同或不同的共聚物的不同的层。在THF中制备典型的外部扩散膜溶液,其含有0.12g/ml聚氨酯(Lubrizol,Wickliffe,Ohio)。在酶层上施加外部扩散膜溶液以形成外部扩散膜。除了聚氨酯之外,以下聚合物中的一种或多种也可作为外部扩散膜的候选者: **NAFION®** (聚(四氟乙烯)离聚物),聚(2-羟基甲基甲基丙烯酸酯),聚氯乙烯,聚碳酸酯,和乙酸纤维素。

[0074] 5.在本发明的一个实施方式中,随后将具有内部层-PVC层-酶层-聚氨酯层的复合膜的脲传感器沉浸在二糖溶液中,例如蔗糖溶液中,浓度(w/v)范围为>0%至2%,2%至25%,2%至20%,5%至15%,10%至15%,优选10%的溶液,达至少30分钟至24小时,至少30分钟至240分钟,至少30分钟至120分钟,至少30分钟至60分钟,优选至少30分钟。蔗糖溶液在7.4的生物pH下缓冲。

[0075] 6.所述传感器在室温下干燥0.5小时至3小时。任选地,蔗糖处理重复多次,然后每次都进行空气干燥。然后将传感器储存在环境温度直到使用。

[0076] 实施例2.

[0077] 实施例2是使用多因素实验设计评估蔗糖处理对上述脲传感器在环境温度下的稳定化的效果的研究,所述多因素实验设计用三种主因素(每个因素在两种条件下)进行以研究- (i) 在传感器制造和使制造的传感器暴露于蔗糖溶液之间的延迟时间(2或7天), (ii) 浸泡时间(2或16小时),其为传感器暴露于蔗糖溶液的持续时间,和在完成蔗糖暴露之后的干燥时间(0.5或3小时)。脲传感器的子组(subgroup)组装成盒,并且对于使用寿命稳定性,在**GEM®** Premier临床分析仪中测量脲浓度。在盒中的脲传感器上每日测量具有高浓度的脲(70mg/dL)的水性样品以评估脲传感器测量的线性度。

[0078] 参照图2A,提供了当干燥时间固定在3小时时,各个被测试的脲传感器在多种施加的实验条件下的使用寿命稳定性。图2B说明了对脲测量的实验条件的影响。

[0079] 图2A中所示的结果易于汇总。以较短的延迟时间(2天)和在10%蔗糖溶液中的较长的浸泡时间(16小时)施加的条件在传感器的使用寿命中提供了最稳定的性能和最一致的传感器到传感器之间的性能。与在10%蔗糖溶液中的较短的浸泡时间(2小时)相组合的较长的延迟时间(7天)的条件产生了最差的稳定化性能。其他两种条件提供了与7天延迟时间/2小时浸泡时间的最差性能相比更好的性能,但也表现出传感器到传感器之间的不一致性(7天,16小时),或在使用寿命(2天,2小时)中的性能劣化。图2B说明了脲测量和对于三种蔗糖处理条件因素而言的有利的方向:较短的延迟时间,较长浸泡时间和较长的干燥时间。

[0080] 这些结果证实了二糖处理的脲生物传感器中的脲酶活性持续经理衰减,甚至在脲酶固定在传感器上时也是如此。制造的传感器更快地暴露于蔗糖处理,脲酶活性维持得越好。这些研究还表明去除所有水分(例如通过干燥)对长期的酶稳定性是关键的。

[0081] 实施例3

[0082] 实施例3在三周使用寿命稳定性和5个月保存寿命稳定性研究中,提供了根据本发明制造的从多个生产批次获得的脲传感器在环境温度下的稳定性数据。

[0083] 对这些盒在3周使用寿命中每日在具有高浓度的脲(95mg/dL)的水性样品中测量脲以评估随时间的传感器脲测量线性度。

[0084] 图3A以图示的方式说明了在选自三个批次的蔗糖处理的传感器的十二个脲传感

器中和在两周的环境温下的短保存寿命储存中测量的脲。以短的传感器保存寿命在三周使用寿命中每日测量高脲浓度 (95mg/dL) 样品表现出稳定的使用寿命性能,其中测量的脲浓度一致为约95mg/dl。

[0085] 图3B以图示的方式说明了来自三个不同批次的蔗糖处理的脲传感器中的其他十二个脲传感器的结果。以5个月的环境温度保存的保存寿命在三周使用寿命中每日测量高脲浓度 (95mg/dL) 样品表现出相同的稳定的使用寿命性能,其中测量的脲浓度一致为约95mg/dl。

[0086] 通过施加多糖处理(蔗糖用作这些研究中的示例性多糖),在5个月的环境温度下的储存保存寿命下脲传感器活性和稳定性得以保持。

[0087] 以上描述的本发明可应用于在多种脲传感器平台上开发的脲生物传感器。

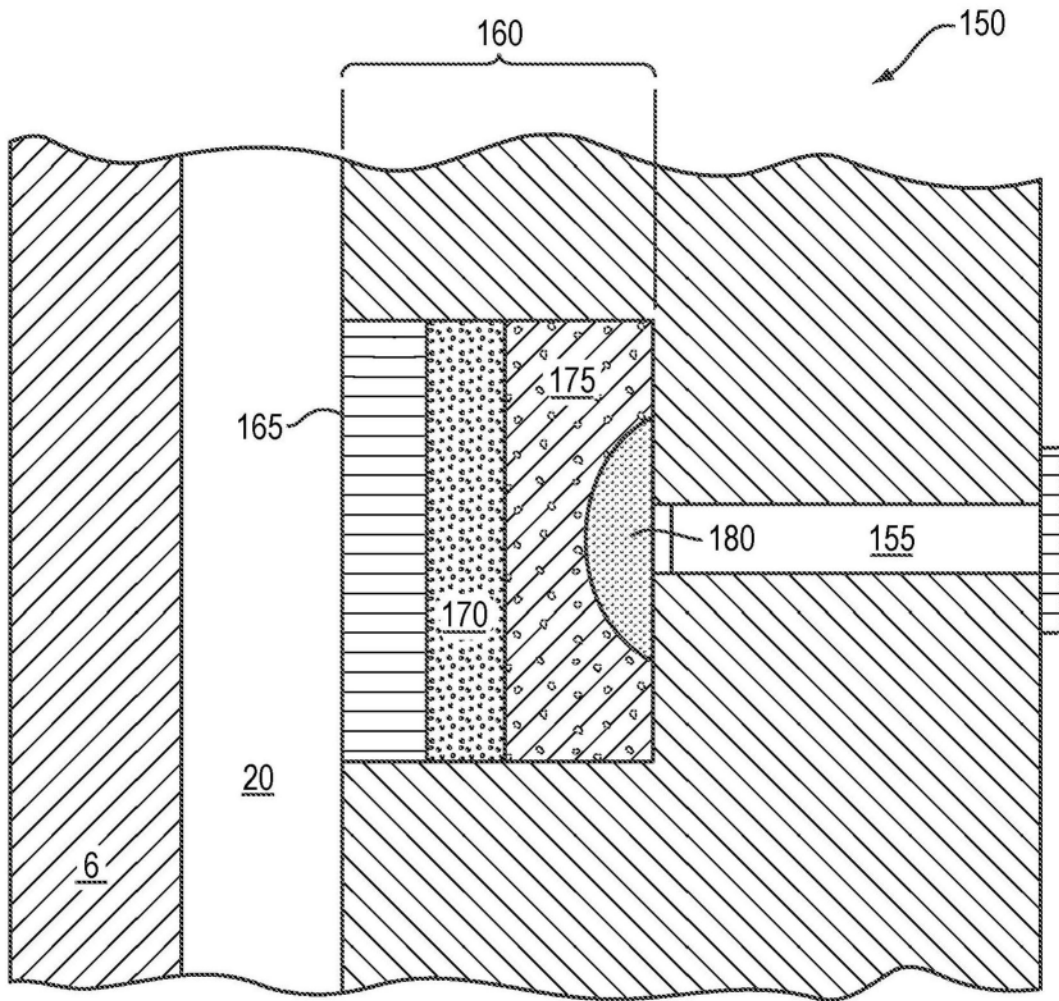


图1

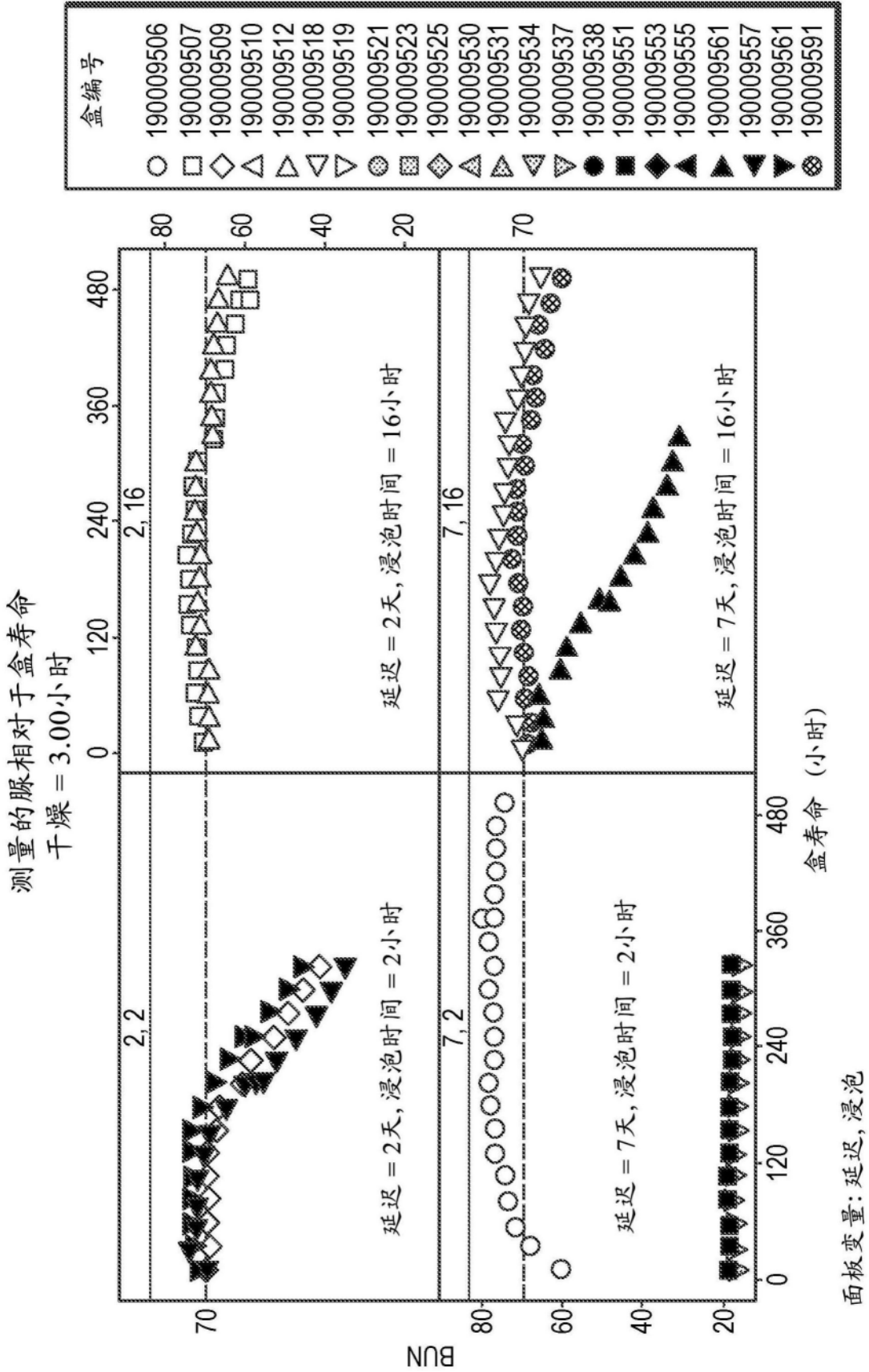


图2A

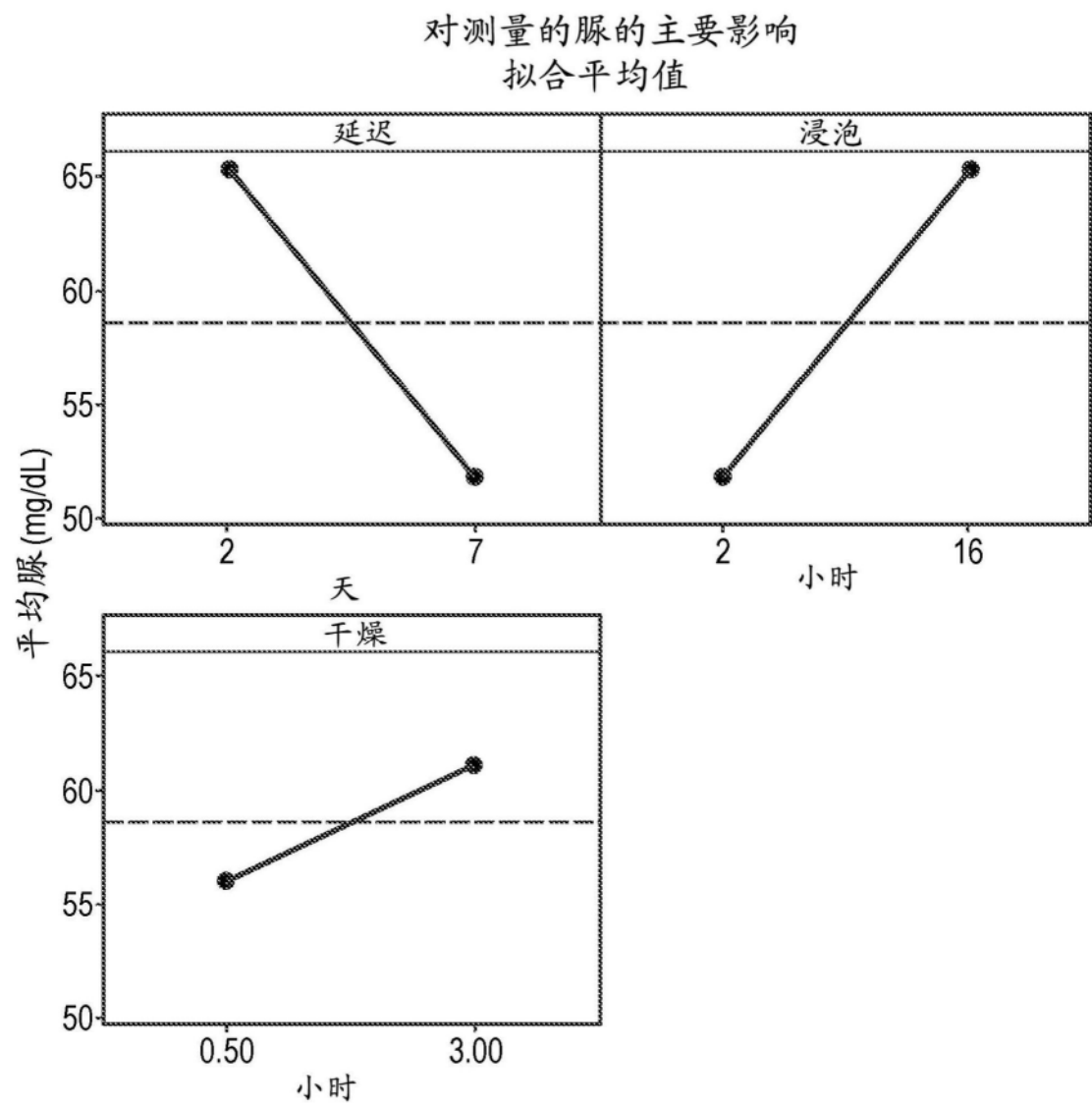


图2B

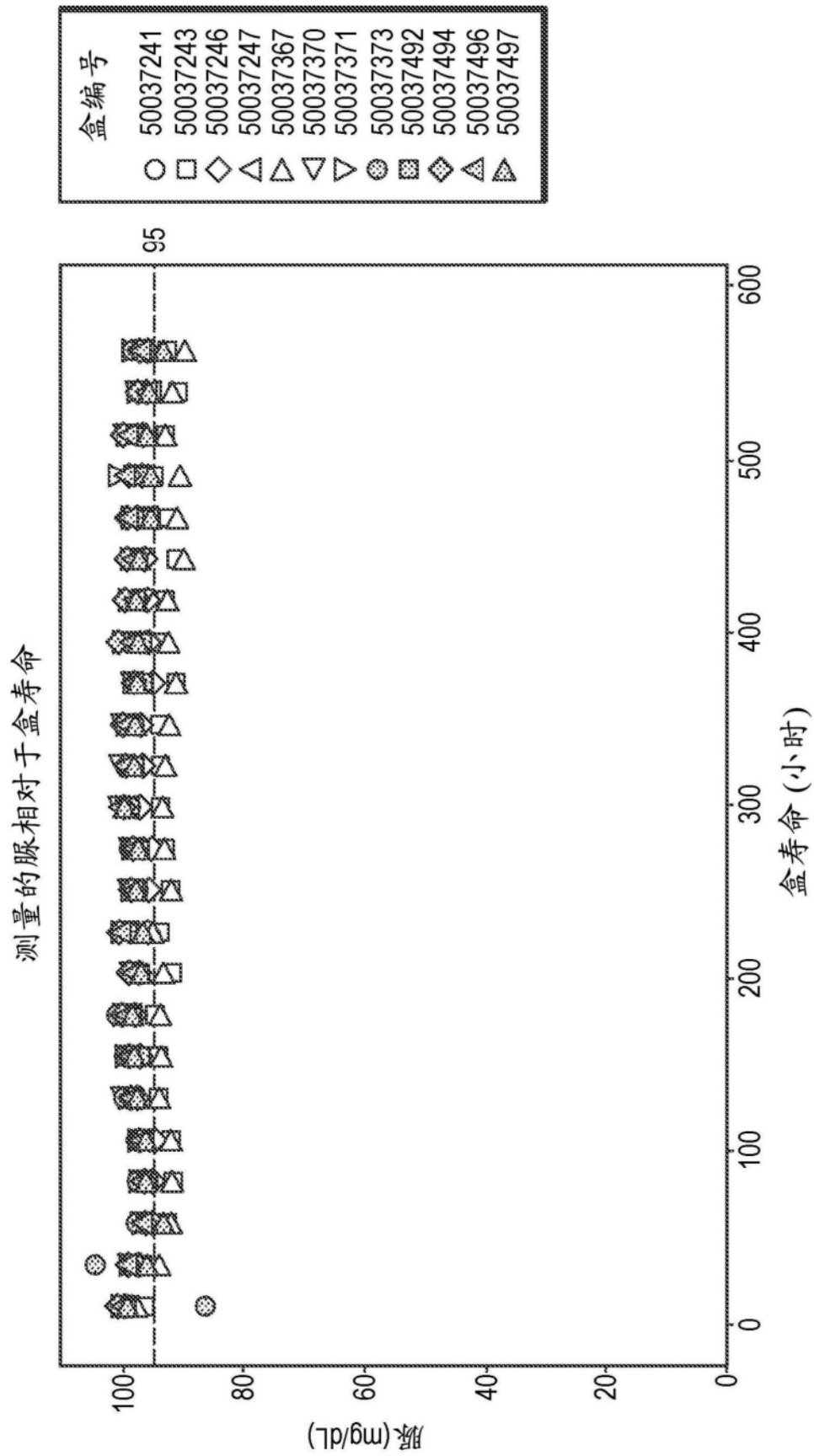


图3A

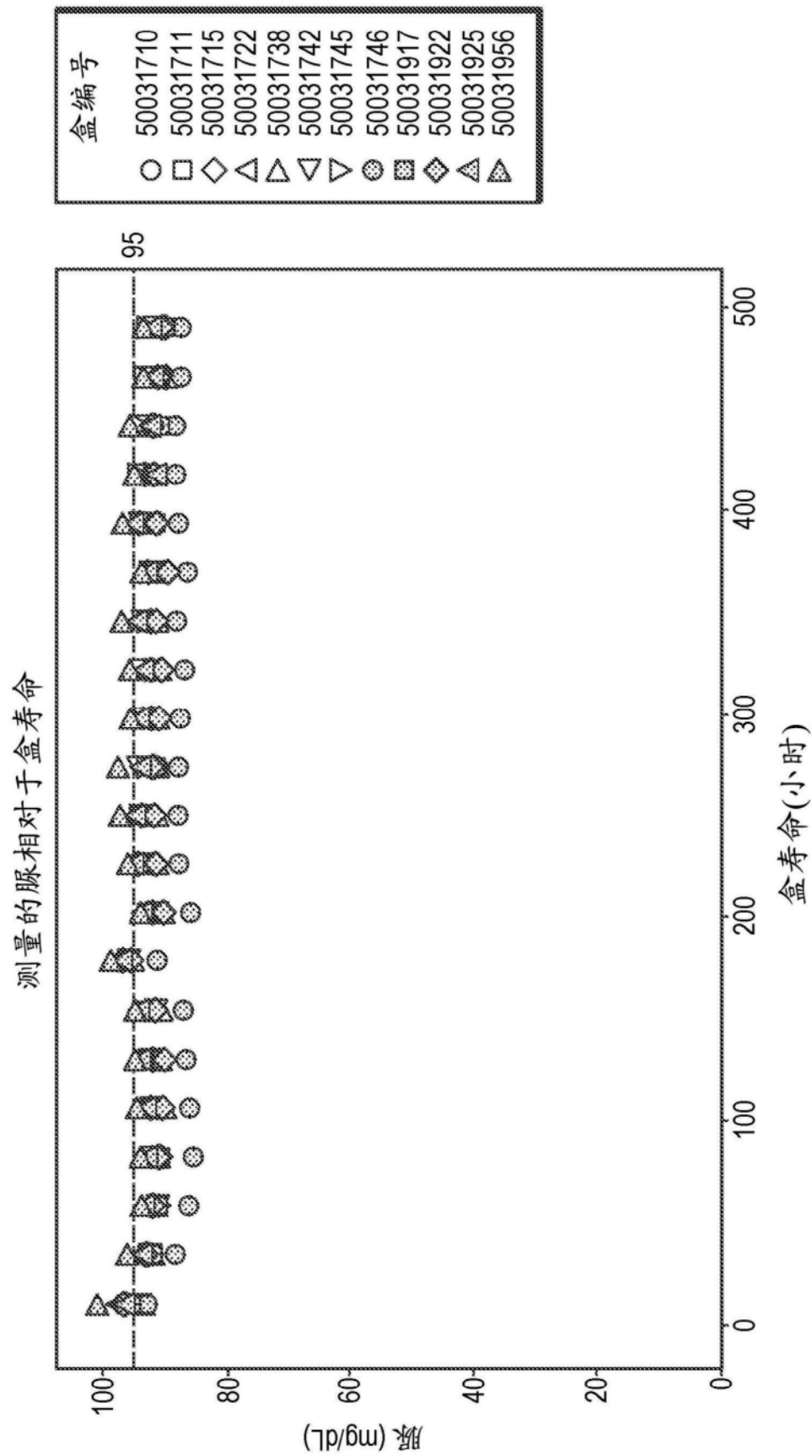


图3B