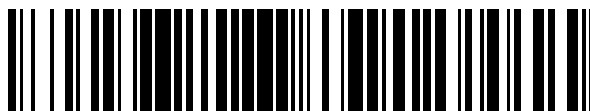


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 331**

51 Int. Cl.:
C08F 126/06 (2006.01)
G01N 27/40 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08004540 .4**
96 Fecha de presentación: **15.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1927602**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

54 Título: **Membranas de biosensores compuestas de polímeros que contienen nitrógenos heterocíclicos**

30 Prioridad:
15.05.2001 US 291215 P
14.05.2002 US 146518

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.03.2012

73 Titular/es:
ABBOTT DIABETES CARE INC.
1360 SOUTH LOOP ROAD
ALAMEDA, CA 94502, US

72 Inventor/es:
Mao, Fei y
Cho, Hyun

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 377 331 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

Membranas de biosensores compuestas de polímeros que contienen nitrógenos heterocíclicos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere, en general, a una membrana que limita el flujo de analitos. Más particularmente, la invención se refiere a una membrana tal compuesta de polímeros que contienen nitrógenos heterocíclicos. La membrana es un componente útil de biosensores y, más particularmente, de biosensores que pueden ser implantados en un cuerpo vivo.

Antecedentes de la invención

10 Aun cuando los biosensores, en sí mismos, no son conforme a la presente invención, los biosensores a base de enzimas son dispositivos en los que una señal de una reacción bioquímica que depende de la concentración de un analito es convertida en una señal física que puede medirse, tal como una señal óptica o eléctrica. Tales biosensores se utilizan profusamente en la detección de analitos en aplicaciones clínicas, medioambientales, agrícolas y de biotecnología. Los analitos que pueden medirse en análisis clínicos de fluidos del cuerpo humano incluyen, por ejemplo, glucosa, lactato, colesterol, bilirrubina y aminoácidos. La detección de analitos en fluidos biológicos, tales como la sangre, es importante para el diagnóstico y el seguimiento de muchas enfermedades.

20 Los biosensores que detectan analitos por medio de señales eléctricas, tales como corriente (biosensores amperométricos) o carga (biosensores coulombimétricos), tienen un interés especial debido a que en las reacciones bioquímicas de muchos bioanalitos importantes está implicada la transferencia de electrones. Por ejemplo, la reacción de glucosa con glucosa oxidasa lleva consigo la transferencia de electrones desde la glucosa a la enzima produciéndose gluconolactona y enzima reducida. En un ejemplo de un biosensor amperométrico de glucosa, la glucosa es oxidada por el oxígeno del fluido corporal mediante una reacción catalizada por glucosa oxidasa que genera gluconolactona y peróxido de hidrógeno, después de lo cual el peróxido de hidrógeno es electro-oxidado y está correlacionado con la concentración de glucosa del fluido corporal (Thomé-Buret, V., et al., Anal. Chem. 68, 3822 (1996) y patente de EE.UU. No. 5.882.494, de Van Antwerp.). En otro ejemplo de un biosensor amperométrico de glucosa, la electro-oxidación de glucosa a gluconolactona está mediada por un mediador redox polimérico que eléctricamente "alambrado" el centro de reacción de la enzima a un electrodo. (Csöregi, E., et al., Anal. Chem. 66, 3131 (1994); Csöregi, E., et al., Anal. Chem. 67, 1240 (1995); Schmidtke, D.W., et al., Anal. Chem. 68, 2845 (1996); Schmidtke, D.W., et al., Anal. Chem. 70, 2149 (1998); y Schmidtke, D.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 294 (1998).)

30 Los biosensores amperométricos emplean, típicamente, dos o tres electrodos, que incluyen al menos un electrodo de medida o electrodo de trabajo y otro electrodo de referencia. En los sistemas de dos electrodos, el electrodo de referencia sirve también como contra-electrodo. En los sistemas de tres electrodos, el tercer electrodo es un contra-electrodo. El electrodo de medida o electrodo de trabajo está compuesto de un conductor que no se corroe, de carbono o de metal, y está conectado al electrodo de referencia por medio de un circuito, tal como un potencióstato.

35 Aun cuando los biosensores, por sí mismos, no están en concordancia con la presente invención, algunos biosensores están diseñados para implantar en el cuerpo de un animal vivo, tal como un mamífero o un cuerpo humano, simplemente a título de ejemplo. En un biosensor amperométrico implantable, el electrodo de trabajo está construido, típicamente, con una capa de detección, que está en contacto directo con el material conductor del electrodo, y con una capa de membrana que limita la difusión, sobre la capa de detección. La capa de detección consiste, típicamente, en una enzima, un estabilizador enzimático tal como seroalbúmina bovina (BSA), y un agente entrecruzante (agente reticulante) que realiza el entrecruzamiento polimérico (reticulación) de los componentes de la capa de detección. Alternativamente, la capa de detección consiste en una enzima, un mediador polimérico, y un agente reticulante que entrecruza los componentes de la capa de detección, como en el caso del biosensor de "enzima alambrada" citado.

45 En un sensor amperométrico de glucosa implantable, la membrana es frecuentemente beneficiosa o necesaria para regular o limitar el flujo de glucosa hacia la capa de detección. A modo de explicación, en un sensor de glucosa sin una membrana, el flujo de glucosa hacia la capa de detección aumenta linealmente con la concentración de glucosa. Cuando toda la glucosa que llega a la capa de detección se ha consumido, la señal de salida medida es directamente proporcional al flujo de glucosa y, por tanto, a la concentración de glucosa. Sin embargo, cuando el consumo de glucosa está limitado por las características cinéticas de actividades químicas o electroquímicas de la capa de detección, la señal de salida medida no está regulada por el flujo de glucosa y no es directamente proporcional al flujo o a la concentración de glucosa. En este caso, solamente una fracción de la glucosa que llega a la capa de detección es consumida antes de que el sensor llegue a saturarse, después de lo cual la señal medida deja de aumentar, o aumenta solo ligeramente, con la concentración de glucosa. Por otra parte, en un sensor de glucosa provisto de una membrana que limita la difusión, la membrana reduce el flujo de glucosa hacia la capa de detección de modo que el sensor no llega a saturarse y, por tanto, puede operar eficazmente dentro de un intervalo mucho más amplio de concentraciones de glucosa.

Más particularmente, en estos sensores de glucosa provistos de membrana, la velocidad de consumo de glucosa está regulada por la difusión o flujo de glucosa a través de la membrana en lugar de por las características cinéticas de la capa de detección. El flujo de glucosa a través de la membrana está definido por la permeabilidad de la membrana a la glucosa, que es constante habitualmente, y por la concentración de glucosa de la solución o del fluido biológico que está siendo investigado. Cuando la totalidad de la glucosa que llega a la capa de detección se ha consumido, el flujo de glucosa a través de la membrana hacia la capa de detección varía linealmente con la concentración de glucosa de la solución, y determina la velocidad de conversión o señal de salida que se han medido de tal modo que esto también es directamente proporcional a la concentración de glucosa de la solución. Aun cuando no es necesario, una relación lineal entre la señal de salida y la concentración de glucosa de la solución es ideal para la calibración de un sensor implantable.

Los sensores amperométricos de glucosa implantables que se basan en la electro-oxidación de peróxido de hidrógeno, según se ha descrito antes, requieren un reactante de oxígeno en exceso para asegurar que la salida del sensor está regulada solamente por la concentración de glucosa existente en el fluido o el tejido corporal que está siendo investigado. Es decir, el sensor está diseñado de modo que no resulte afectado por el oxígeno típicamente presente en el fluido o el tejido corporal. En el tejido corporal en el que, típicamente, el sensor de glucosa es implantado, la concentración de oxígeno puede ser muy baja, tal como desde aproximadamente 0,02 mM hasta aproximadamente 0,2 mM, mientras que la concentración de glucosa puede ser tan alta como aproximadamente 30 mM o más. Sin una membrana que limite la difusión de glucosa, el sensor llegaría a saturarse muy rápidamente a concentraciones de glucosa muy bajas. Así pues, el sensor se beneficia de estar provisto de una membrana suficientemente permeable al oxígeno, que hace disminuir el flujo de glucosa hacia la capa de detección, de modo que se reduce al mínimo o se elimina el denominado "problema de deficiencia de oxígeno", un estado en el que existe insuficiente oxígeno para que tenga lugar una detección adecuada.

En sensores amperométricos de glucosa implantables que emplean electrodos de enzimas "alambradas", según se ha descrito anteriormente, no existe el problema de deficiencia de oxígeno, debido a que el oxígeno no es un reactante necesario. No obstante, estos sensores requieren membranas que limitan la difusión de glucosa debido a que, típicamente, para los sensores de glucosa que carecen de tales membranas, la salida de corriente alcanza un nivel máximo en torno o por debajo de una concentración de glucosa de 10 mM, que está muy por debajo del de 30 mM, el extremo alto de concentraciones de glucosa importantes desde el punto de vista clínico..

Una membrana que limita la difusión es beneficiosa también en un biosensor que emplea un electrodo de enzima alambrada, ya que la membrana reduce de modo importante la reactividad química y bioquímica de la capa de detección y, por tanto, reduce la producción de especies radicales que pudieran dañar la enzima. La membrana que limita la difusión puede actuar también como un protector mecánico que evita la fuga de componentes desde el sensor hacia fuera de la capa de detección, y disminuye el ruido asociado con el movimiento.

Ha habido diversas tentativas para desarrollar una membrana que limite la difusión de glucosa, que sea mecánicamente robusta, biocompatible y que se fabrique fácilmente. Por ejemplo, ha sido descrita una membrana microporosa estratificada con orificios mecánicos (patente de EE.UU. No. 4.759.828, de Young et al.) y también son conocidas membranas formadas a partir de poliuretano (Shaw, G.W., et al., *Biosensors and Bioelectronics* 6. 401 (1991); Bindra, D.S. et al., *Anal. Chem.* 63, 1692 (1991); Shichiri, M., et al., *Horm. Metab. Res., Suppl. Scr.* 20, 17 (1988)). Supuestamente, la glucosa difunde a través de los orificios mecánicos o fisuras de estas diversas membranas. Además, a título de ejemplo, han sido descritas una membrana heterogénea con regiones discretas, hidrófobas e hidrófilas (patente de EE.UU. No. 4.484.987 de Gough), y membranas homogéneas con ambas funcionalidades, hidrófoba e hidrófila (patentes de EE.UU. Nos. 5.284.140 y 5.322.063, de Allen et al.). Sin embargo, todas estas membranas conocidas son difíciles de fabricar y tienen propiedades físicas inadecuadas.

Una membrana mejorada formada a partir de una mezcla compleja de un diisocianato, un diol, una diamina y un polímero de silicona, ha sido descrita en las patentes de EE.UU. Nos. 5.777.060 (Van Antwerp), 5.786.439 (Van Antwerp et al.) y 5.882.494 (Van Antwerp). Según se describe en ellas, el material de la membrana es polimerizado y reticulado simultáneamente en un matraz; el material polimérico que resulta se disuelve en un disolvente orgánico fuerte, tal como tetrahidrofurano (THF) y la solución que resulta se aplica sobre la capa de detección para formar la membrana: Desafortunadamente, un disolvente orgánico muy fuerte tal como el THF, puede desnaturalizar la enzima de la capa de detección y también disolver materiales conductivos de tinta así como cualesquiera materiales plásticos que pueden formar parte del sensor. Además, dado que las reacciones de polimerización y reticulación son completadas en el matraz de reacción, no ocurren reacciones adicionales que produzcan uniones cuando la disolución se aplica a la capa de detección para formar la membrana. Como resultado, la adherencia entre la capa de membrana y la capa de detección puede no ser adecuada.

En la Solicitud (PCT) del Tratado de Cooperación de Patentes que sustenta la Publicación Internacional No. WO 01/57241 A2, Kelly y Schiffer describen un método de fabricación de una membrana que limita la difusión de glucosa, polimerizando fotolíticamente monómeros hidrófilos pequeños. Las sensibilidades de los sensores de glucosa que emplean tales membranas están, sin embargo, muy diseminadas, lo que indica falta de control en el proceso de fabricación de las membranas. Por otra parte, dado que la polimerización implica moléculas muy pequeñas, es bastante posible que moléculas pequeñas, solubles, permanezcan después de la polimerización, que

pueden lixiviar fuera del sensor. Por tanto, los sensores de glucosa que emplean tales membranas que limitan la difusión de glucosa, pueden no ser adecuados para implantar en un cuerpo vivo.

El documento US 4.929.313 describe dispositivos electroquímicos que pueden ser utilizados para convertir un flujo iónico en una corriente eléctrica, para la determinación de concentraciones iónicas. Los dispositivos se hacen operar sin necesidad de un electrodo de referencia y son específicos basados en agentes de transferencia iónica conocidos. La operación de los dispositivos lleva consigo el uso de pares de electrodos modificados con materiales redox electroactivos recubiertos con revestimientos iónicos selectivos. Un potencial aplicado entre un par de electrodos modificados apropiadamente, da como resultado la circulación de una corriente eléctrica entre los electrodos que depende de la concentración del ion a detectar. Los dispositivos construidos combinando electrodos recubiertos con polímeros electroactivos y diferentes películas selectivas de iones, permiten la determinación simultánea de diversos iones. Por ejemplo, estos dispositivos son útiles para medir la concentración de cationes totales, aniones totales, H^+ , Li^+ , K^+ , Ca^{++} , Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , otros cationes y aniones, y sus combinaciones. Los dispositivos son pequeños y suficientemente estables para poder ser utilizados *in vivo*, por ejemplo, como medios de determinación en la sangre o en comprobaciones a gran escala de la calidad del agua o en técnicas de purificación/separación.

El documento US 5.543.326 describe oxidorreductasas que están modificadas químicamente para cambiar su carga neta a un pH dado. Mediante tal modificación es regulada la adsorción de las enzimas sobre superficies, su retención en membranas de polímeros de carga similar u opuesta, y su unión con macromoléculas cargadas del mismo signo o de signo opuesto, en particular macromoléculas redox. Las enzimas modificadas, de las que la glucosa oxidasa recombinante modificada es un ejemplo, son útiles en los biosensores, por ejemplo de glucosa, como enzimas marcadoras de antígenos o anticuerpos en inmunodetección, y como etiquetas de secuencias de nucleótidos en sondas, por ejemplo, para secuencias de nucleótidos de DNA.

Kabanov et al., (1996), Journal of Controlled Release 39, 173-189, describen la interacción de poliiones con especies que simulan células. Vuillaume et al., (2000), Macromolecules 33, 781-790 describen la síntesis y caracterización de polimetacrilatos de piridinio rematados en una cola anfífila.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a membranas compuestas de polímeros reticulados que contienen grupos heterocíclicos nitrogenados, en particular polímeros de poli(vinilpiridina) y poli(vinilimidazol). Las membranas son útiles para limitar el flujo de un analito hacia el electrodo de trabajo de un sensor electroquímico de modo que el sensor responde linealmente a lo largo de un intervalo grande de concentraciones del analito y es calibrado fácilmente. Los sensores electroquímicos provistos de membranas de la presente invención demuestran sensibilidad y estabilidad considerables y una gran razón de señal a ruido, en una diversidad de condiciones.

Según un aspecto de la invención, la membrana es formada por reticulación *in situ* de un polímero, modificada con un resto zwitteriónico, un componente copolimérico no piridina, y, opcionalmente, otro resto que es o bien hidrófilo o bien hidrófobo, y/o tiene otras propiedades deseables, en una solución alcohólica de un tampón. El polímero modificado se produce a partir de un polímero precursor que contiene grupos heterocíclicos nitrogenados. Preferiblemente, el polímero precursor es poli(vinilpiridina) o poli(vinilimidazol). Cuando se utiliza en un sensor electroquímico, la membrana limita el flujo de un analito que alcanza la capa de detección del sensor, tal como la capa de detección que contiene enzima de un electrodo de "enzima alambrada", y además protege la capa de detección. Estas cualidades de la membrana amplían de modo importante el intervalo de detección lineal y la estabilidad del sensor.

En el proceso de formación de las membranas el componente del copolimérico que no es piridina intensifica generalmente la solubilidad del polímero y puede proporcionar, además, al polímero o a la membrana resultante propiedades físicas y químicas adicionales, deseables. Opcionalmente, pueden usarse modificadores hidrófilos o hidrófobos para "sintonía fina" de la permeabilidad de la membrana que resulta para un analito de interés. Pueden utilizarse para intensificar la biocompatibilidad del polímero o de la membrana que resulta, modificadores hidrófilos opcionales tales como polietilenglicol y modificadores hidroxilados o polihidroxilados. En la formación de una membrana de la presente invención, se cree que el resto zwitteriónico del polímero proporciona una capa adicional de reticulación, por medio de uniones electrostáticas intermoleculares, además de la reticulación básica atribuida, en general, a enlaces covalentes, y se opina, por tanto, que la membrana queda reforzada.

Otro aspecto de la invención concierne a la preparación de una membrana que limita la difusión de analitos, sustancialmente homogénea, que puede ser utilizada en un biosensor, tal como un biosensor amperométrico implantable. La membrana es formada *in situ* aplicando una solución alcohólica tamponada de un agente reticulante y un polímero modificado, sobre una capa de detección que contiene una enzima, y dejando que la solución cure durante uno o dos días. La solución de agente reticulante-polímero puede aplicarse a la capa de detección colocando sobre el sensor una o varias gotitas de la solución, sumergiendo el sensor en la solución, o de modo semejante. Generalmente, el grosor de la membrana está regulado por la concentración de la solución, por el número de gotitas de la solución que se han aplicado, por el número de veces que el sensor ha sido sumergido en la solución, o por cualquier combinación de estos factores. Los sensores amperométricos de glucosa provistos de

membranas que limitan la difusión, de la presente invención, demuestran una excelente estabilidad y una respuesta lineal, rápida, a la concentración de glucosa a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones de glucosa.

Descripción breve de los dibujos

5 La Figura 1 es una ilustración de una estructura típica de una sección de una membrana que limita la difusión de analitos, según la presente invención.

10 La Figura 2 es una ilustración esquemática de la vista lateral de una parte de un sensor de glucosa de dos electrodos que posee un electrodo de trabajo, un electrodo combinado, contra-electrodo/electrodo de referencia, y una membrana revestida por inmersión según la presente invención, que encapsula ambos electrodos. Las Figuras 2B y 2C son ilustraciones esquemáticas de vistas de la parte superior y de la parte del fondo, respectivamente, de la parte del sensor de glucosa de la Figura 2A. En esta memoria, puede aludirse colectivamente a las Figuras 2A, 2B y 2C como la Figura 2.

La Figura 3 es una gráfica de corriente frente a concentración de glucosa de sensores que poseen membranas que limitan la difusión de glucosa según la presente invención, y de sensores que carecen de tales membranas, basada en valores medios.

15 La Figura 4 es una gráfica de salida de corriente frente al tiempo, a concentración fija de glucosa, de un sensor que tiene una membrana que limita la difusión de glucosa, según la presente invención, y de un sensor que carece de tal membrana.

20 La Figura 5 es una gráfica de salida de corriente frente al tiempo a diferentes niveles de concentración de glucosa, de sensores que tienen membranas que limitan la difusión de glucosa según la presente invención, basada en valores medios.

La Figura 6 es una gráfica de salida de corriente frente al tiempo, a diferentes niveles de concentración de glucosa, con y sin agitación, de un sensor que tiene una membrana que limita la difusión de glucosa según la presente invención, y de un sensor que carece de tal membrana.

25 La Figura 7A es una gráfica de salida de corriente frente a concentración de glucosa de cuatro lotes de sensores, preparados por separado, que tienen membranas que limitan la difusión de glucosa según la presente invención, basada en valores medios. Las Figuras 7B-7E son gráficas de salida de corriente frente a concentración de glucosa, de sensores individuales de cada uno de los cuatro lotes de sensores a que se ha aludido antes, que tienen membranas que limitan la difusión de glucosa según la presente invención, respectivamente. En esta memoria, puede aludirse colectivamente a las Figuras 7A, 7B, 7C, 7D y 7E, como la Figura 7.

30 Descripción de la invención

Cuando se emplean en esta memoria, los términos y expresiones entrecorillados se definen como se explica a continuación.

35 El término "alquilo" incluye hidrocarburos alifáticos saturados, lineales o ramificados. Como ejemplos de grupos alquilo se incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo y semejantes. A menos que se indique de otro modo, el término "alquilo" incluye grupos alquilo y grupos cicloalquilo.

El término "alcoxi" describe un grupo alquilo unido al resto de la estructura mediante un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, butoxi, terc-butoxi, y semejantes. Además, a menos que se indique de otro modo, el término "alcoxi" incluye grupos alcoxi y grupos cicloalcoxi.

40 El término "alqueno" describe un hidrocarburo alifático insaturado, lineal o ramificado, que posee al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-metil-1-propenilo, y semejantes.

45 Un "grupo reactivo" es un grupo funcional de una molécula que es capaz de reaccionar con otro compuesto para acoplar al menos una parte de tal otro compuesto a la molécula. Los grupos reactivos incluyen carboxi, éster activado, haluro de sulfonilo, éster sulfonato, isocianato, isotiocianato, epóxido, aziridina, haluro, aldehído, cetona, amina, acrilamida, tiol, azida de acilo, haluro de acilo, hidrazina, hidroxilamina, haluro de alquilo, imidazol, piridina, fenol, sulfonato de alquilo, halotriazina, imido éster, maleimida, hidrazida, hidroxilo, y grupos azido arilo foto-reactivos. Los ésteres activados, como se entiende en la técnica, incluyen generalmente ésteres de succinimidilo, benzotriazolilo, o arilo sustituidos por grupos que capturan electrones tales como grupos sulfo, nitro, ciano o halo; ácidos carboxílicos activados por carbodiimidias.

50 Un grupo funcional "sustituido" (por ejemplo, un grupo alquilo, alqueno o alcoxi sustituido) incluye al menos un sustituyente seleccionado entre los siguientes: halógeno, alcoxi, mercapto, arilo, alcoxycarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, -OH, -NH₂, alquilamino, dialquilamino, trialkilamonio, alcanoilamino, arilcarboxamido, hidrazino, alquiltio, alqueno, y grupos reactivos.

Un "agente reticulante" (agente entrecruzante) es una molécula que contiene al menos dos grupos reactivos capaces de enlazar al menos dos moléculas, o enlazar al menos dos partes de la misma molécula. El enlace de al menos dos moléculas se denomina reticulación intermolecular, mientras que el enlace de al menos dos partes de la misma molécula se denomina reticulación intramolecular. Un agente reticulante que tenga más de dos grupos reactivos puede ser capaz tanto de reticulación intermolecular como intramolecular.

La expresión "polímero precursor" se refiere al polímero de partida antes de unir los diversos grupos modificadores para formar un polímero modificado.

La expresión "grupo heterocíclico nitrogenado" alude a una estructura cíclica que contiene un nitrógeno hibridado sp^2 en un anillo de la estructura.

El término "polivinilpiridina" se refiere a poli(4-vinilpiridina), poli(3-vinilpiridina), o poli(2-vinilpiridina), así como también a cualquier copolímero de vinilpiridina y un segundo o un tercer componente copolimérico.

El término "polivinilimidazol" se refiere a poli(1-vinilimidazol), poli(2-vinilimidazol), o poli(4-vinilimidazol)

Una "solución de membrana" es una solución que contiene todos los componentes necesarios de reticulación y formación de la membrana, con inclusión de un polímero modificado que contiene grupos heterocíclicos nitrogenados, un agente reticulante y un tampón o un disolvente mixto de alcohol-tampón.

Un fluido biológico o "biofluido" es cualquier fluido corporal o derivado de un fluido corporal en el que pueda medirse el analito, por ejemplo, sangre, jugo intestinal, plasma, fluido dérmico, sudor y lágrimas.

Un "sensor electroquímico" es un dispositivo configurado para detectar la presencia o medir la concentración o cantidad de un analito de una muestra por medio de reacciones electroquímicas de oxidación o reducción. Típicamente, estas reacciones pueden ser transducidas a una señal eléctrica que puede correlacionarse con la cantidad o concentración del analito.

Un "mediador redox" es un agente de transferencia de electrones para transportar electrones entre un analito, una enzima reducida u oxidada por el analito, y un electrodo, o bien directamente, o por medio de uno o más agentes adicionales de transferencia de electrones. A un mediador redox que incluye una cadena principal polimérica puede aludirse también como un "polímero redox".

La expresión "electrodo de referencia" incluye a) electrodos de referencia y b) electrodos de referencia que también actúan como contra-electrodos (es decir contra-electrodos/ electrodos de referencia), a menos que se indique de otro modo.

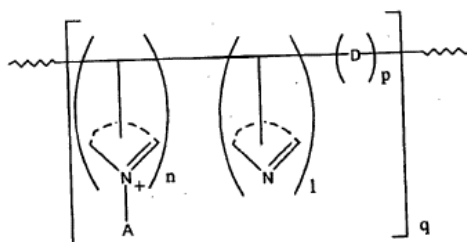
La expresión "contra-electrodo" incluye a) contra-electrodos y b) contra-electrodos que también actúan como electrodos de referencia (es decir, contra-electrodos/ electrodos de referencia), a menos que se indique de otro modo.

En general, la membrana de la presente invención se forma por reticulación de un polímero modificado que contiene grupos heterocíclicos nitrogenados en el seno de un disolvente mixto de alcohol-tampón y dejando que la solución de membrana cure con el tiempo. El polímero comprende poli(constituyente heterocíclico que contiene nitrógeno) como parte de su cadena principal, y elementos adicionales, que incluyen un resto zwitteriónico, un resto hidrófobo y, opcionalmente, un resto biocompatible. La membrana resultante es capaz de limitar el flujo de un analito procedente desde un espacio, tal como un espacio asociado con un biofluido, hasta otro espacio, tal como un espacio asociado con una capa de detección que contiene enzima. Un sensor amperométrico de glucosa construido con una capa de detección de enzima alambrada y una capa que limita la difusión de glucosa de la presente invención, es muy estable y posee un intervalo amplio de detección lineal.

Polímeros que contienen nitrógeno heterocíclico

El polímero de la presente invención tiene la fórmula general que sigue

Fórmula 1a

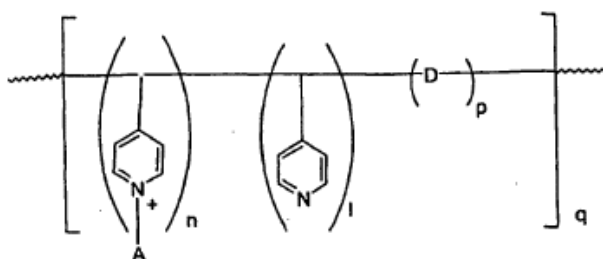


1a

en la que la línea horizontal representa la cadena principal del polímero, A es un grupo alquilo sustituido con un grupo hidrosoluble, preferiblemente un grupo cargado negativamente, tal como sulfonato, fosfato o carboxilato, y más preferiblemente, un grupo de un ácido fuerte tal como sulfonato, de modo que el nitrógeno heterocíclico cuaternizado al que está unido es zwitteriónico; D es un componente copolimérico del polímero, como se describe
 5 adicionalmente más adelante; cada uno de n, l y p es, independientemente, un número medio de una unidad del polímero o unidades del polímero asociadas, mostrado en los paréntesis más próximos a la izquierda; y q es un número de una unidad o de unidades del polímero indicado entre corchetes.

Los grupos heterocíclico nitrogenados de Fórmula 1a incluyen, aun cuando no se limita a ellos, piridina, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol o cualquiera de sus derivados. Preferiblemente, los grupos heterocíclicos nitrogenados son,
 10 independientemente, vinilpiridina, tal como 2-, 3-, ó 4-vinilpiridina, o vinilimidazol, tal como 1-, 2-, ó 4-vinilimidazol. Más preferiblemente, los grupos heterocíclicos nitrogenados son, independientemente, 4-vinilpiridina, de modo que el polímero más preferible es un derivado de poli(4-vinilpiridina). Un ejemplo de un poli(4-vinilpiridina) tal, de la presente invención, posee la fórmula general que sigue,

Fórmula 1b;



1b

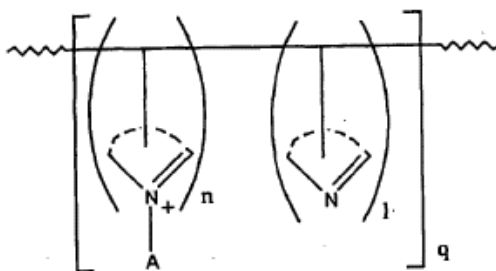
15

en cuya fórmula A, D, n, l, p y q son como se ha descrito anteriormente con respecto a la Fórmula 1a,

Aun cuando el polímero de la presente invención tiene la Fórmula 1a o la Fórmula 1b generales anteriores, ha de hacerse notar que cuando A es un ácido fuerte, tal como un ácido más fuerte que un ácido carboxílico, el
 20 componente D es opcional, de modo que p puede ser igual a cero. Un polímero de la presente invención tal tiene la fórmula general que sigue:

20

Fórmula 1c:



1c

en cuya fórmula A es un ácido fuerte y los grupos heterocíclicos nitrogenados, n, l y q son todos como se ha descrito antes. Un ácido carboxílico sulfonado y fluorado son ejemplos de ácidos adecuadamente fuertes. Se opina
 25 que cuando A es un ácido suficientemente fuerte, el nitrógeno heterocíclico al que está unido se hace zwitteriónica y por tanto es capaz de formar uniones electrostáticas intermoleculares con el agente reticulante durante la formación de la membrana. Se opina que estas uniones electrostáticas intermoleculares proporcionan otro nivel de reticulación, más allá de los enlaces covalentes típicos de la reticulación, y por consiguiente hacen más robusta la membrana que se obtiene. Como resultado, cuando A es un ácido adecuadamente fuerte, el componente D, que frecuentemente es
 30 un componente reforzador tal como estireno, puede ser omitido de los polímeros de las Fórmulas 1a y 1b anteriores. Cuando A es un ácido más débil, de modo que el nitrógeno heterocíclico no es zwitteriónico o capaz de formar uniones electrostáticas intermoleculares, el polímero de la presente invención incluye D, como se ilustra en las Fórmulas 1a y 1b anteriores.

Los ejemplos de A incluyen, aun cuando no se limita a ellos, sulfopropilo, sulfobutilo, carboxipropilo y carboxipentilo.
 35 En una realización de la invención, el grupo A tiene la fórmula -L-G, en la que L es un agente de enlace de alquilo,

lineal o ramificado, de C2-C12, opcional e independientemente sustituido con un grupo arilo, alcoxi, alqueno, alquino, -F, -Cl, -OH, aldehído, cetona, éster o amido, y G es un grupo carboxi o sulfonato cargado negativamente. La parte de alquilo de los sustituyentes de L tienen 1-6 átomos de carbono y son, preferiblemente, un grupo arilo, -OH o amido.

- 5 A puede estar unido al grupo heterocíclico nitrogenado mediante cuaternización con un agente alquilante que contiene un agente de enlace L adecuado y un grupo G cargado negativamente, o un grupo precursor que puede convertirse en un grupo G cargado negativamente en una etapa posterior. Los ejemplos de agentes alquilantes adecuados incluyen, aun cuando no se limita a ellos, 2-bromoetanosulfonato, propanosulfonato, butanosulfonato, ácido bromoacético, ácido 4-bromobutírico y ácido 6-bromohexanoico. Los ejemplos de agentes alquilantes que contienen un grupo precursor incluyen, aun cuando no se limita a ellos, bromoacetato de etilo y 6-bromohexanoato de metilo. Los grupos de ésteres etílico y metílico de estos precursores pueden convertirse fácilmente en un grupo carboxi cargado negativamente mediante hidrólisis estándar.

- 15 Alternativamente, A puede unirse al grupo heterocíclico nitrogenado mediante cuaternización del nitrógeno con un agente alquilante que contenga un grupo reactivo adicional, y acoplamiento subsiguiente por métodos estándar, de este grupo reactivo adicional a otra molécula que contiene un grupo G cargado negativamente y un grupo reactivo. Típicamente, uno de los grupos reactivos es un grupo electrófilo y el otro grupo reactivo es un grupo nucleófilo. Ejemplos seleccionados de grupos reactivos y de los enlaces formados por sus interacciones, se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de grupos reactivos y enlaces que resultan

Primer grupo reactivo	Segundo grupo reactivo	Enlace que resulta
Ester activado*	Amina	Amiga
Acrilamida	Tiol	Tioéter
Azida de acilo	Amina	Amiga
Haluro de acilo	Amina	Amiga
Ácido carboxílico	Amina	Amiga
Aldehído o cetona	Hidrazina	Hidrazona
Aldehído o cetona	Hidroxiamina	Oxima
Haluro de alquilo	Amina	Alquilamina
Haluro de alquilo	Ácido carboxílico	Éster
Haluro de alquilo	Imidazol	Imidazolio
Haluro de alquilo	Piridina	Piridinio
Haluro de alquilo	Alcohol / fenol	Éter
Haluro de alquilo	Tiol	Tioéter
Sulfonato de alquilo	Tiol	Tioéter
Sulfonato de alquilo	Piridina	Piridinio
Sulfonato de alquilo	Imidazol	Imidazolio
Sulfonato de alquilo	Alcohol / fenol	Éter
Anhídrido	Alcohol / fenol	Éster
Anhídrido	Amina	Amiga
Aziridina	Tiol	Tioéter
Aziridina	Amina	Alquilamina
Aziridina	Piridina	Piridinio
Epóxido	Tiol	Tioéter
Epóxido	Amina	Alquilamina
Epóxido	Piridina	Piridinio
Halotriazina	Amina	Aminotriazina

Halotriazina	Alcohol	Éter triazinílico
Imido éster	Amina	Amidina
Isocianato	Amina	Urea
Isocianato	Alcohol	Uretano
Isotiocianato	Amina	Tiourea
Maleimida	Tiol	Tioéter
Haluro de sulfonilo	Amina	Sulfonamida

* Los ésteres activados, como se entiende en la técnica. incluyen generalmente ésteres de succinimidilo, benzotriazolilo. o arilo sustituido por grupos que capturan electrones tales como sulfo, nitro, ciano o halo; o ácidos carboxílicos activados por carbodiimidias.

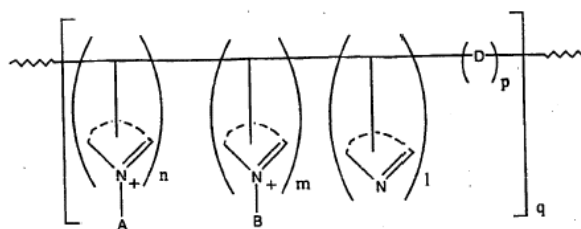
A título de ejemplo, A puede unirse a los grupos heterocíclicos nitrogenados del polímero por cuaternización de los nitrógenos heterocíclicos con ácido 6-bromohexanoico y acoplamiento subsiguiente del grupo carboxilo al grupo amino del ácido 3-amino-1-propanosulfónico, en presencia de un agente de acoplamiento de carbodiimida.

D es un componente de un polímero poli(nitrógeno heterocíclico-co-D) de fórmula 1a o 1b . Los ejemplos de D incluyen, aun cuando no se limita a ellos, fenilalquilo, alcoxiestireno, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, y una molécula que contiene polietilenglicol o un grupo polihidroxilado. Algunos polímeros poli(nitrógeno heterocíclico-co-D) adecuados como materiales de partida para la presente invención, se encuentran disponibles en el comercio. Por ejemplo, los polímeros poli(2-vinilpiridina-co-estireno), poli(4-vinilpiridina-co-estireno) y poli(4-vinilpiridina-co-metacrilato de butilo) pueden adquirirse de Aldrich Chemical Company, Inc. Otros polímeros poli(nitrógeno heterocíclico-co-D) pueden ser sintetizados fácilmente por cualquier experto en la técnica de la química de polímeros, empleando métodos bien conocidos. Preferiblemente, D es un componente de estireno o un componente de metacrilato de alquilo de C1-C18 de un polivinilpiridina-poli-D tal como poli(4-vinilpiridina-co-estireno) o poli(4-vinilpiridina-co-metacrilato de butilo), más preferiblemente, el primero. D puede contribuir a diversas propiedades deseables de la membrana, que incluyen, aun cuando no se limita a ellas, propiedades hidrófobas, hidrófilas, de solubilidad, biocompatibilidad, elasticidad y resistencia. D puede seleccionarse para la optimización o "sintonía fina" de una membrana obtenida con el polímero en términos de su permeabilidad para un analito y su no permeabilidad para un componente indeseable que interfiera, por ejemplo.

Las letras n, l y p designan, respectivamente, el número medio de cada componente copolimérico en cada unidad del polímero. La letra q es una para un copolímero de bloques o un número mayor que uno para un copolímero con un número de unidades poliméricas que se repiten. A título de ejemplo, el valor de q para un polímero de la presente invención puede ser ≥ 950 , aproximadamente, cuando n, l y p son, respectivamente, 1, 8 y 1. La letra q está relacionada, por tanto, con el peso molecular global del polímero. Preferiblemente, el peso molecular medio del polímero es superior a 50.000, aproximadamente, más preferiblemente, superior a 200.000, aproximadamente y, lo más preferible, superior a 1.000.000, aproximadamente.

El polímero de la presente invención puede comprender, además, un copolímero opcional, como ilustra la formula general que sigue:

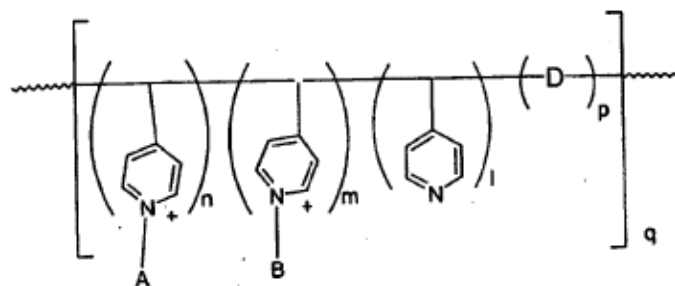
Fórmula 2a



2a

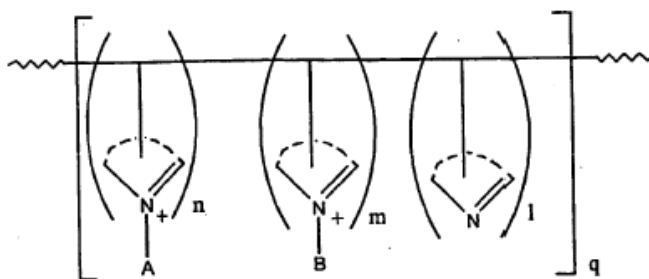
en cuya fórmula la cadena principal del polímero, A, D, n, l, p y q son como se ha descrito anteriormente en lo que respecta a las Fórmulas 1a-1c; m es el número medio de una unidad o varias unidades poliméricas asociadas expuestas en los paréntesis más próximos a la izquierda; y B es un modificador. Cuando los grupos heterocíclicos nitrogenados son piridina sustituida en la posición 4, como se prefiere, el polímero de la presente invención es un derivado de poli(4-vinilpiridina) y posee la fórmula general que sigue, Fórmula 2b, expuesta seguidamente:

Fórmula 2b

**2b**

Por otra parte, cuando A es un ácido adecuadamente fuerte, según se ha descrito anteriormente, el copolímero D es opcional, en cuyo caso el polímero de la presente invención posee la fórmula general que sigue:

5 Fórmula 2c:

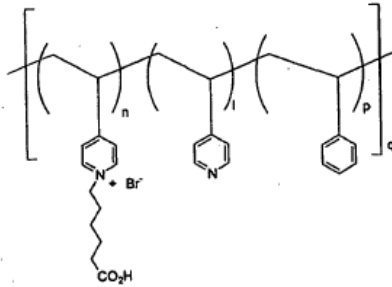
**2c**

En cualquiera de las Fórmulas 2a-2c, B es un grupo modificador que puede añadir a la membrana cualesquiera propiedades deseadas, químicas, físicas o biológicas. Tales propiedades deseadas incluyen selectividad del analito, carácter hidrófobo, hidrófilo, elasticidad y biocompatibilidad. Como ejemplos de modificadores se incluyen los siguientes: moléculas cargadas negativamente que pueden minimizar la entrada en la membrana de compuestos químicos de carga negativa que interfieran; moléculas hidrocarbonadas hidrófobas que pueden aumentar la adherencia entre la membrana y el material sensor que sirve de sustrato; moléculas hidrófilas, hidroxiladas o polihidroxiladas que pueden ayudar a hidratar y que añaden biocompatibilidad a la membrana; polímeros de silicona que pueden añadir a la membrana elasticidad y otras propiedades; y constituyentes de polietilenglicol, que se sabe que aumentan la biocompatibilidad de materiales biológicos (Bergstrom, K., et al., J. Biomed. Mat. Res. 26, 779 (1992)). Otros ejemplos de B incluyen, aun cuando no se limita a ellos, un agente quelante metálico, tal como un agente quelante del calcio, y otros materiales biocompatibles. Un polietilenglicol adecuado para modificar la biocompatibilidad de la membrana posee, por lo general, un peso molecular de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 20.000, de preferencia desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 10.000, y más preferiblemente, desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 8.000.

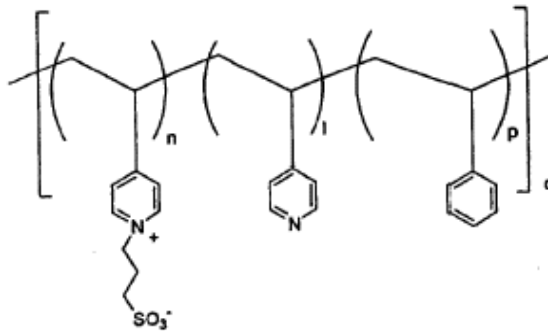
El modificador B puede unirse a los nitrógenos heterocíclicos del polímero, directa o indirectamente. En la unión directa, los grupos heterocíclicos nitrogenados pueden hacerse reaccionar con un modificador que contiene un grupo alquilante. Los grupos alquilantes adecuados incluyen, aun cuando no se limita a ellos, haluro de alquilo, epóxido, aziridina y ésteres sulfonato. En la unión indirecta, los nitrógenos heterocíclicos del polímero pueden ser cuaternizados con un agente alquilante que posea un grupo reactivo adicional, y unirse luego a una molécula que tenga la propiedad deseada y un grupo reactivo adecuado.

Según se ha descrito anteriormente, el copolímero que contiene B es opcional en la membrana de la presente invención, de modo que cuando m de la Fórmula 2a-2c es cero, la membrana tiene la fórmula general de la Fórmulas 1a-1c, respectivamente. Las cantidades relativas de los cuatro componentes copoliméricos, el grupo heterocíclico nitrogenado que contiene A, el grupo heterocíclico nitrogenado opcional que contiene B, el grupo heterocíclico nitrogenado, y D, pueden expresarse en forma de porcentajes del modo que sigue: $[n/(n + m + l + p)] \times 100\%$, $[m/(n + m + l + p)] \times 100\%$, $[l/(n + m + l + p)] \times 100\%$ y $[p/(n + m + l + p)] \times 100\%$, respectivamente. Los porcentajes adecuados son 1-25%, 0-15% (cuando el grupo heterocíclico nitrogenado que contiene B es opcional) ó 1-15%, 20-90% y 0-50% (cuando D es opcional), o 1-50%, respectivamente, y los porcentajes preferibles son 5-20%, 0-10% (cuando el grupo heterocíclico nitrogenado que contiene B es opcional) ó 1-10%, 60-90% y 5-20%, respectivamente.

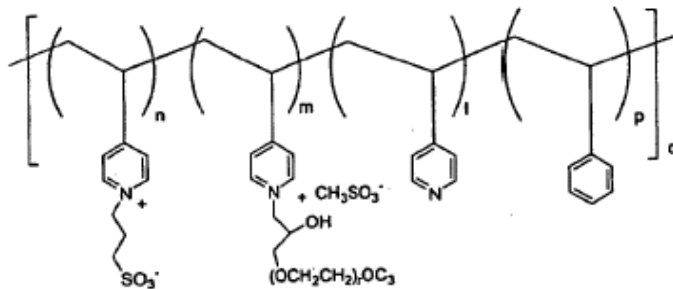
Ejemplos específicos de polímeros adecuados de las fórmulas generales, Fórmulas 3-6, se muestran seguidamente



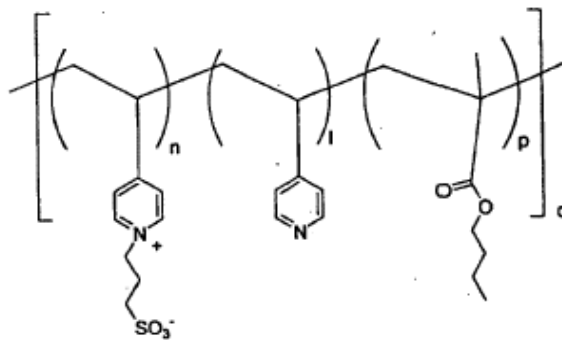
3



4



5



6

Ejemplos

Ejemplos de síntesis de polímeros de polivinilpiridina

Se proporcionan a continuación Ejemplos que ilustran las síntesis de diversos polímeros de polivinilpiridina según la presente invención. Las cifras que se proporcionan son aproximadas.

5 Ejemplo 1: Síntesis de un polímero de Fórmula 3

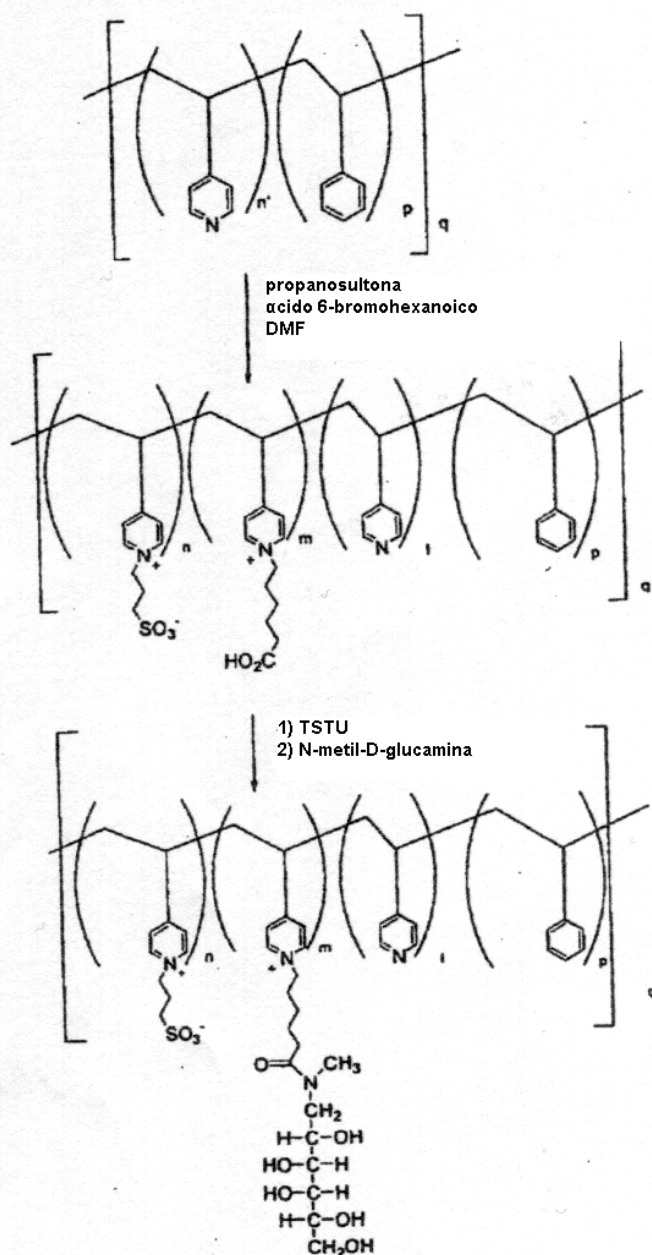
A título de ilustración, se proporciona ahora un ejemplo de la síntesis de un polímero de Fórmula 3. Se agitó una solución de poli(4-vinilpiridina-co-estireno) (contenido de estireno: ~ 10%) (20 g, Aldrich) en el seno de 100 ml de dimetilformamida (DMF), a 90°C, y se añadió ácido 6-bromohexanoico (3,7 g) en 15-20 ml de DMF. La solución resultante se agitó a 90°C durante 24 horas y luego se vertió en 1,5 litros de éter, después de lo cual se secó el disolvente. El sólido gomoso restante se disolvió en MeOH (150-200 ml) y se filtró con succión a través de un embudo con placa filtrante de vidrio sinterizado de porosidad media para separar el sólido sin disolver. El filtrado se añadió lentamente a éter agitado rápidamente (1,5 litros) en un vaso de precipitados. El precipitado resultante se recogió por filtración con succión y se secó a 50°C en alto vacío durante 2 días. El polímero tenía los parámetros siguientes: $[n/(n+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$; $[l/(n+l+p)] \times 100\% \approx 80\%$; y $[p/(n+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$.

15 Ejemplo 2: Síntesis de un polímero de Fórmula 5

A título de ilustración, se proporciona ahora un ejemplo de la síntesis de un polímero de la Fórmula 5 anterior. Se agitó una solución de poli(4-vinilpiridina-co-estireno) (~ 10% de estireno) (20 g, Aldrich) en el seno de 100 ml de DMF anhidra, a 90°C, se añadió ácido metanosulfónico (~ 80 mg) y luego 2 g de epóxido de PEG metoxilado (peso molecular 5.000) (Shearwater Polymers, Inc.) en 15-20 ml de DMF anhidra. La solución se agitó a 90°C durante 24 horas y se añadió 1,3-propanosulfona (2,32 g) en el seno de 10 ml de DMF anhidra. La solución resultante se agitó continuamente a 90°C durante 24 horas y después se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en 800 ml de éter. Se decantó el disolvente y el precipitado restante se disolvió en MeOH caliente (~ 200 ml), se filtró con succión, se precipitó de nuevo en 1 litro de éter, y luego se secó a 50°C en alto vacío durante 48 horas. El polímero resultante tenía los parámetros siguientes: $[n/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$, $[m/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$; $[l/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 70\%$; y $[p/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$.

Ejemplo 3: Síntesis de un polímero que tiene un modificador B polihidroxilado

A título de ilustración, se proporciona ahora un ejemplo de la síntesis de un polímero que tiene un modificador B polihidroxilado, según se ilustra esquemáticamente a continuación. Son conocidos diversos compuestos polihidroxilados que poseen propiedades de biocompatibilidad. (patente de EE.UU. No. 6.011.077). La síntesis que figura a continuación ilustra como un grupo modificador que posee una propiedad deseada puede unirse a la cadena principal del polímero por medio de un engarce



1,3-propanosulfonata (0,58 g, 4,8 mmoles) y ácido 6-bromohexanoico (1m85 g, 9,5 mmoles) se añaden a una solución de poli(4-vinilpiridina-co-estireno) (~ 10% de estireno) (10 g) disueltos en 60 ml de DMF anhidra. La solución resultante se agita a 90°C durante 24 horas y luego se enfría a temperatura ambiente. Después se añaden a la solución, sucesivamente, tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU) (2,86 g, 9,5 mmoles) y N,N-diisopropiletilamina (1,65 ml, 9,5 mmoles). Después de agitar la solución durante 5 horas se añade N-metil-D-glucamina (2,4 g, 12,4 mmoles) y la solución que resulta se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución se vierte en 500 ml de éter y el precipitado se recoge por filtración con succión. El precipitado recogido se disuelve entonces en MeOH/H₂O y la solución que resulta se somete a ultrafiltración por membrana usando el mismo disolvente MeOH/H₂O. La solución dializada se evapora a sequedad obteniendo un polímero con los parámetros siguientes: $[n/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$; $[m/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$; $[l/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 70\%$; y $[p/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$.

Agentes reticulantes

Los agentes reticulantes de la presente invención son moléculas que poseen al menos dos grupos reactivos, por ejemplo grupos bi-, tri-, o tetra-funcionales, capaces de reaccionar con los grupos heterocíclicos nitrogenados, (grupos de piridina), u otros grupos reactivos contenidos en A, B o D del polímero. Preferiblemente, los grupos reactivos de los agentes reticulantes son grupos alquilantes de reacción lenta que pueden cuaternizar los grupos

heterocíclicos nitrogenados, tales como los grupos de piridina del polímero. Los grupos alquilantes incluyen, aun cuando no se limita a ellos, derivados de polietilenglicol o polipropilenglicol, epóxido (grupo glicídilo), aziridina, haluro de alquilo y ésteres sulfonato. Los grupos alquilante de los agentes reticulantes son, preferiblemente, grupos glicídilo. Preferiblemente, los agentes reticulantes glicídilicos poseen un peso molecular de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 2.000 y son solubles en agua o solubles en un disolvente miscible con agua, tal como un alcohol. Como ejemplos de agentes reticulantes adecuados se incluyen, aun cuando no se limita a ellos, éter diglicídilico de polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 600, y N,N-diglicídil-4-glicídiloxianilina.

Es deseable disponer de una reacción de reticulación lenta durante la distribución de la solución de membrana para que la solución de revestimiento de la membrana tenga un período de vida razonable para fabricaciones a gran escala. Una reacción de reticulación más rápida da por resultado una solución de revestimiento que cambia rápidamente de viscosidad, lo que hace difícil realizar el revestimiento. Idealmente, la reacción de reticulación es lenta durante la distribución de la solución de membrana, y acelerada durante el curado de la membrana a temperatura ambiente o a temperatura elevada, cuando es posible.

Formación de la membrana y fabricación de sensores

Se describe ahora un ejemplo de un proceso para producir una membrana de la presente invención. En este ejemplo, el polímero de la presente invención y un agente reticulante adecuado se disuelven en un disolvente que contiene un tampón, típicamente un disolvente mixto de tampón-alcohol, para obtener una solución de membrana. Preferiblemente, el tampón tiene un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,5 y el alcohol es etanol. Más preferiblemente, el tampón es un tampón de 2-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina)etanosulfonato (HEPES) 10 mM, (pH 8), y la razón en volumen de etanol a tampón es desde aproximadamente 95 a 5 hasta aproximadamente 0 a 100. Una cantidad mínima de tampón es necesaria para la reacción química de reticulación, especialmente si se utiliza un agente reticulante de tipo epóxido o aziridina. La cantidad de disolvente necesaria para disolver el polímero y el agente reticulante puede variar dependiendo de la naturaleza del polímero y del agente reticulante. Por ejemplo, puede necesitarse un mayor porcentaje de alcohol para disolver un polímero y/o un agente reticulante relativamente hidrófobo.

La razón de polímero a agente reticulante es importante para la naturaleza de la membrana final. A título de ejemplo, si se utiliza una cantidad inadecuada de agente reticulante o un exceso sumamente grande de agente reticulante, la reticulación es insuficiente y la membrana es débil. Por otra parte, si se emplea una cantidad de agente reticulante superior a la adecuada, la membrana resulta demasiado reticulada de modo que la membrana es muy quebradiza y/o impide la difusión del analito. Por tanto, existe una razón óptima de un polímero dado con respecto a un agente reticulante dado que debe ser utilizada para preparar una membrana deseable o útil. A título de ejemplo, la razón óptima, en peso, de polímero a agente reticulante es, típicamente, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 32:1 para un polímero de cualquiera de las Fórmulas 3-6 anteriores y un agente reticulante del tipo de éter diglicídilico de polietilenglicol, que tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 400. Más preferiblemente, este intervalo es desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 16:1. Además, a título de ejemplo, la razón óptima, en peso, de polímero a agente reticulante es, típicamente, aproximadamente 16:1 para un polímero de la Fórmula 4 anterior, en la que $[n/(n+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$; $[l/(n+l+p)] \times 100\% \approx 80\%$, y $[p/(n+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$, o para un polímero de la Fórmula 5 anterior, en la que $[n/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$, $[m/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$, $[l/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 70\%$, $[p/(n+m+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$, y $r \approx 110$, y un agente reticulante del tipo de éter diglicídilico de polietilenglicol, que tiene un peso molecular de aproximadamente 200.

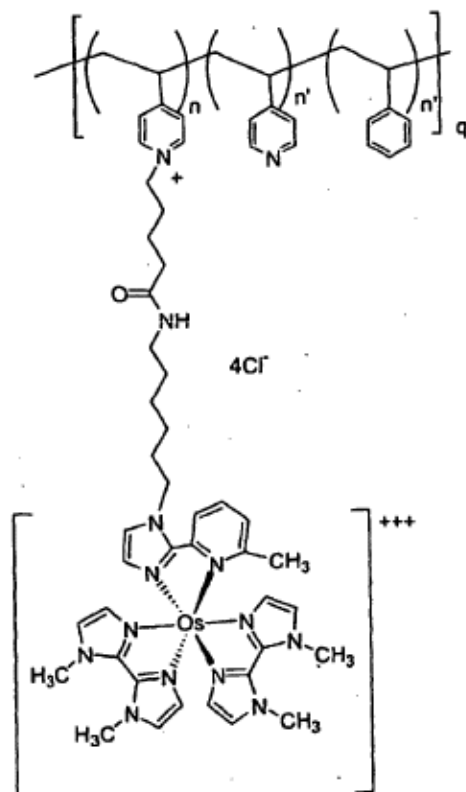
La solución de membrana puede depositarse como revestimiento sobre una diversidad de biosensores que pueden beneficiarse de estar provistos de una membrana colocada sobre la capa de detección que contiene una enzima. Los ejemplos de tales biosensores incluyen, aun cuando no se limita a ellos, sensores de glucosa y sensores de lactato. (Véase la patente de EE.UU. No. 6.134.461 a Heller et al.). El proceso de revestimiento puede comprender cualquier técnica empleada comúnmente, tal como revestimiento con rotación, revestimiento con inmersión o por depósito de gotitas de la solución de membrana sobre las capas de detección, y procesos semejantes, seguido de curado en condiciones ambiente durante 1a 2 días, típicamente. Los detalles particulares del proceso de revestimiento (tales como duración de la inmersión, frecuencia de las inmersiones, número de inmersiones, o detalles semejantes) pueden variar, dependiendo de la naturaleza (es decir, viscosidad, concentración, composición, o semejante) del polímero, el agente reticulante, la solución de membrana, el disolvente y el tampón, por ejemplo. Para el proceso de revestimiento puede emplearse un equipo convencional, tal como el sistema de revestimiento por inmersión o moldeo DSG DIL-160 de NIMA Technology del Reino Unido.

Ejemplo de fabricación de sensores

Aun cuando los sensores, en sí mismos, no son conforme a la presente invención, la fabricación de sensores consiste, típicamente, en depositar una capa de detección que contiene una enzima sobre un electrodo de trabajo, modelar sobre la capa de detección la capa de membrana que limita la difusión y, opcional pero preferiblemente, también sobre el contra-electrodo y el electrodo de referencia. El procedimiento operatorio que figura a continuación se refiere a la fabricación de un sensor de dos electrodos tal como el representado en las Figuras 2A-2C. Sensores

que poseen otras configuraciones tales como un diseño de tres electrodos, pueden prepararse empleando métodos similares.

- 5 Un ejemplo particular de fabricación de un sensor en el que las cifras son aproximadas, se proporciona ahora. Se preparó una solución de la capa de detección a partir de una solución de HEPES 7,5 mM (0,5 μ l, pH 8), que contenía 1,7 μ g del compuesto L, mediador polimérico de osmio, descrito en la solicitud publicada, del Tratado de Cooperación de Patentes (PCT), publicación internacional no. WO 01/36660 A2; 2,1 μ g de glucosa oxidasa (Toyobo); y 1,3 μ g de éter diglicídico de polietilenglicol (peso molecular 400). La fórmula del compuesto L se muestra a continuación



- 10 La solución de la capa de detección se depositó sobre electrodos de trabajo de tinta-carbono y se curó a temperatura ambiente durante dos días para producir varios sensores. Se preparó una solución de membrana mezclando 4 volúmenes de un polímero de la Fórmula 4 anterior, disueltos a 64 mg/l en solución tampón de EtOH, 60%/ HEPES, 20% (10 mM, pH 8), y un volumen de éter diglicídico de polietilenglicol (peso molecular 200), disuelto a 4 mg/ml en solución tampón de EtOH, 80%/HEPES, 20% (10 mM, pH 8). Los sensores descritos fueron sumergidos tres veces en la solución de membrana, aproximadamente 5 segundos por inmersión, con un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos de intervalo entre inmersiones consecutivas. Después los sensores fueron curados a temperatura ambiente y humedad normal durante 24 horas.
- 15

Una estructura química aproximada de una sección de una membrana típica preparada según la presente invención se ilustra en la Figura 1. Una membrana tal puede emplearse en una diversidad de sensores, tales como los sensores de dos o tres electrodos que se han descrito en esta memoria. A título de ejemplo, la membrana puede ser utilizada en un sensor amperométrico de glucosa de dos electrodos, como se muestra en la Figura 2A-2C (colectivamente, Figura 2) y se describe más adelante.

20

El sensor amperométrico de glucosa, 10, de la Figura 2, comprende un sustrato, 12, situado entre un electrodo de trabajo, 14, basado, típicamente, en carbono, y un contra-electrodo/electrodo de referencia de Ag/AgCl, 16. Un sensor o capa de detección, 18, se sitúa sobre el electrodo de trabajo. Una membrana o capa de membrana, 20, encapsula el sensor de glucosa completo, 10, con inclusión del contra-electrodo/electrodo de referencia de Ag/AgCl.

25

La capa de detección, 18, del sensor de glucosa, 10, consiste en glucosa oxidasa y un mediador polimérico constituido por un complejo de osmio de potencial bajo, reticulados, según se describe en la Solicitud PCT publicada, antes citada, publicación internacional no. WO 01/36660 A2. La formulación que contiene la enzima y el mediador, que puede ser utilizada en la capa de detección, y métodos para aplicarla a un sistema de electrodos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, según la patente de EE.UU. No. 6.134.461. Según la presente invención, la

30

capa de membrana se formó sumergiendo tres veces el sensor en una solución de membrana que comprendía 4 mg/ml de éster diglicídico de polietilenglicol (peso molecular 200, aproximadamente) y 64 mg/ml de un polímero de la Fórmula 4 anterior, en el que $[n/(n+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$; $[l/(n+l+p)] \times 100\% \approx 80\%$; y $[p/(n+l+p)] \times 100\% \approx 10\%$, y curando a temperatura ambiente y humedad normal durante 24 horas por lo menos, por ejemplo 1a 2 días, aproximadamente, el sensor sumergido tres veces. El valor de q para una capa de membrana tal puede ser ≥ 950 , aproximadamente, donde n , l y p son 1, 8 y 1, respectivamente.

Modificación de la superficie de la membrana

Los polímeros de la presente invención tienen un gran número de grupos heterocíclicos nitrogenados, tales como grupos de piridina, solo un pequeño porcentaje de los cuales se utiliza en la reticulación durante la formación de la membrana. Así pues, la membrana posee un exceso de estos grupos presentes tanto dentro de la matriz de la membrana como sobre la superficie de la membrana. Opcionalmente, la membrana puede ser modificada después colocando otra capa de material sobre la superficie de la membrana rica en grupos heterocíclicos nitrogenados o rica en piridina. Por ejemplo, la superficie de la membrana puede ser modificada añadiendo una capa de polietilenglicol para intensificar la biocompatibilidad. En general, la modificación puede consistir en revestir la superficie de la membrana con una solución de modificación, tal como una solución que comprende las moléculas deseadas que poseen un grupo alquilante reactivo, lavando luego la solución de revestimiento con un disolvente adecuado para retirar las moléculas en exceso. Esta modificación debe dar por resultado una monocapa de las moléculas deseadas.

La membrana, 20, del sensor de glucosa, 10, que se ilustra en la Figura 2, puede modificarse del modo anteriormente descrito.

Ejemplos experimentales

A continuación se proporcionan ejemplos de experimentos que demuestran las propiedades y/o la eficacia de sensores que poseen membranas que limitan la difusión según la presente invención. Las cifras que se proporcionan son aproximadas.

Experimento de calibración

En un primer ejemplo, se llevó a cabo un experimento de calibración en el que quince sensores que carecían de membranas fueron ensayados simultáneamente (Grupo 1) y, por separado, ocho sensores que tenían membranas que limitan la difusión según la presente invención, fueron ensayados al mismo tiempo (Grupo 2), todos a 37°C. En el Grupo 2, las membranas habían sido preparadas a partir de polímeros de la Fórmula 4 anterior y agentes reticulantes del tipo de éter diglicídico de polietilenglicol (PEGDGE) de peso molecular 200, aproximadamente. En el experimento de calibración del Grupo 1 y del Grupo 2, los sensores fueron colocados en una solución tamponada con PBS (pH 7) y se midió la corriente de salida de cada uno de los sensores a medida que se aumentaba la concentración de glucosa. Las corrientes de salida medidas (μA para el Grupo 1; nA para el Grupo 2) fueron promediadas después para los dos grupos, 1 y 2, y representadas gráficamente frente a las concentraciones de glucosa (mM) según se ilustra en la gráfica de calibración de la Figura 3.

Como se ilustra, la curva de calibración de los sensores del Grupo 1 que carecen de membranas, es aproximadamente lineal a lo largo de un intervalo muy pequeño de concentraciones de glucosa, desde cero hasta aproximadamente 3 mM, ó 5 mM a lo sumo: Este resultado indica que los sensores que carecen de membrana son insuficientemente sensibles al cambio de concentraciones de glucosa en concentraciones de glucosa elevadas tales como 10 mM, lo que está muy por debajo del límite superior de la concentración de glucosa, importante desde el punto de vista clínico de 30 mM, aproximadamente. Por el contrario, la curva de calibración de los sensores del Grupo 2 que disponían de membranas que limitan la difusión según la presente invención, es sustancialmente lineal a lo largo de un intervalo relativamente amplio de concentraciones de glucosa, por ejemplo, desde cero hasta 30 mM aproximadamente, como se demuestra por la línea de mejor ajuste ($y = 1,2502x + 1,1951$; $R^2 \approx 0,997$), que se ilustra también en la Figura 1. Este resultado demuestra la considerable sensibilidad de los sensores provistos de membranas para las concentraciones de glucosa, en concentraciones de glucosa baja, media y alta, y de particular importancia en el límite alto de concentraciones de glucosa relevantes desde el punto de vista clínico, de 30 mM, aproximadamente.

Experimento de estabilidad

En un segundo ejemplo, se llevó a cabo un experimento de estabilidad en el que fueron ensayados simultáneamente, a 37°C, un sensor que carecía de membrana y un sensor que tenía una membrana que limita la difusión según la presente invención. El sensor provisto de membrana disponía de una membrana preparada partiendo del mismo polímero y del mismo agente reticulante que los de los sensores del Grupo 2 antes descrito en el experimento de calibración. En este experimento de estabilidad, cada sensor fue colocado en una solución tamponada que contenía PBS (pH 7) que tenía una concentración fija de glucosa, 30 mM, y se midió la corriente de salida de cada sensor. Las corrientes de salida medidas (μA para el sensor sin membrana; nA para el sensor

provisto de membrana) fueron representadas gráficamente frente al tiempo (horas) como ilustra la gráfica de estabilidad de la Figura 4.

5 Como se muestra, la curva de estabilidad del sensor sin membrana decae rápidamente con el tiempo, a una velocidad de caída de aproximadamente 4,69% μA por hora. Este resultado indica falta de estabilidad del sensor sin membrana. Por el contrario, la curva de estabilidad del sensor provisto de membrana según la presente invención, muestra una constancia relativa a lo largo del tiempo, o sin caída apreciable con el tiempo, siendo la velocidad de caída solo de 0,06% nA por hora. Este resultado demuestra la considerable estabilidad y fiabilidad de dichos sensores. Es decir, en una concentración de glucosa de 30 mM, mientras que el sensor sin membrana pierde sensibilidad a una velocidad de casi 5% por hora a lo largo de un período de 20 horas, aproximadamente, el sensor provisto de membrana según la presente invención no mostró, prácticamente, pérdida de sensibilidad durante el mismo período.

Experimento de capacidad de respuesta

15 Idealmente, la membrana de un sensor electroquímico no debe impedir la comunicación entre la capa de detección del sensor y el fluido o fluido biológico que contiene el analito de interés. Es decir, la membrana debe responder rápidamente a los cambios de concentración del analito.

20 En un tercer ejemplo, se llevo a cabo un experimento de capacidad de respuesta en el que ocho sensores que tenían membranas de difusión según la presente invención, fueron ensayados simultáneamente (Grupo 3), todos a 37°C. Los sensores del Grupo 3 tenían membranas preparadas partiendo del mismo polímero y de los mismos agentes reticulantes que los de los sensores del Grupo 2 descritos en el experimento de calibración anterior. En este experimento de capacidad de respuesta, los ocho sensores fueron colocados en una solución tamponada que contenía PBS (pH 7) cuya concentración de glucosa fue aumentada escalonadamente a lo largo del tiempo, como ilustran las concentraciones de glucosa indicadas en la Figura 5, y se midió la corriente de salida de cada uno de los sensores. Las corrientes de salida medidas (nA) fueron promediadas luego para el Grupo 3 y representadas gráficamente frente al tiempo (tiempo real, hora:minuto:segundo), como muestra la gráfica de capacidad de respuesta de la Figura 5.

25 La curva de capacidad de respuesta de los sensores del Grupo 3, que tenían membranas que limitan la difusión según la presente invención, tiene escalones discretos que simulan de un modo rápido los aumentos escalonados de la concentración de glucosa. Como se ilustra, la corriente de salida salta rápidamente desde una meseta a la siguiente una vez aumentada la concentración de glucosa. Este resultado demuestra la considerable capacidad de respuesta de los sensores provistos de membranas de la presente invención. La capacidad de respuesta de estos sensores electroquímicos provistos de membranas les hace ideales para detectar analitos, tal como para detectar glucosa.

Experimento de moción-sensibilidad

35 Idealmente, la membrana de un sensor electroquímico no debe resultar afectada por la moción o movimiento de fluidos o fluidos biológicos que contienen el analito de interés. Esto es particularmente importante para un sensor que está implantado en un cuerpo, tal como un cuerpo humano, ya que el movimiento puede causar ruido asociado a la moción y puede ser bastante frecuente.

40 En este cuarto ejemplo, se llevó a cabo un experimento de moción-sensibilidad en el que se ensayó un sensor A que carecía de membrana y, por separado, se ensayó un sensor B que tenía una membrana que limita la difusión según la presente invención, todo a 37°C. El sensor B tenía una membrana preparada partiendo del mismo polímero y el mismo agente reticulante que los de los sensores del Grupo 2 descrito en el experimento de calibración. En este experimento, para cada uno de los ensayos, el sensor se colocó en un vaso de precipitados con una solución tamponada que contenía PBS (pH 7) y un agitador magnético. La concentración de glucosa de la solución se aumento de modo escalonado a lo largo del tiempo, de la misma manera descrita en el experimento anterior de capacidad de respuesta, según indican las diversas marcas de mM de la Figura 6. El agitador se activó durante cada aumento escalonado de la concentración de glucosa y se inactivó algún tiempo después, como ilustran los rótulos "agitación" y "sin agitar" indicados en la Figura 6. Esta activación y desactivación del agitador se repitió de modo cíclico a varios niveles de concentraciones de glucosa y se midió la corriente de salida de cada uno de los sensores durante todo el experimento. Las corrientes de salida medidas (μA para el sensor A; nA para el sensor B) fueron representadas gráficamente frente al tiempo (minutos), como muestra la gráfica de moción-sensibilidad de la Figura 6.

55 Como se indica, la corriente de salida del sensor A, sin membrana, está muy afectada por las condiciones de agitación frente a las de sin agitar a lo largo del intervalo de concentraciones de glucosa utilizado en el experimento. Por el contrario, la corriente de salida del sensor B, que tiene membranas que limitan la difusión según la presente invención, está virtualmente inafectado por las condiciones de agitación frente a las de sin agitar hasta una concentración de glucosa de 10 mM, aproximadamente, y sólo ligeramente afectado por estas condiciones en una concentración de glucosa de 15 mM, aproximadamente. Este resultado demuestra la considerable estabilidad de los sensores provistos de membranas de la presente invención en ambientes tanto agitados como sin agitar. La

estabilidad de estos sensores electroquímicos provistos de membranas en un medio ambiente de movimiento de fluidos, les hace idelaes para detectar un analito dentro de un cuerpo en movimiento.

Experimento de reproducibilidad de sensores

- 5 El revestimiento por inmersión, o moldeo, de membranas se lleva a cabo, típicamente, usando máquinas de inmersión tales como la DSG DIL-160 de NIMA Technology del Reino Unido. El moldeo reproducible de membranas ha sido considerado bastante difícil de conseguir (Chen, T., et al., In Situ Assembled Mass-Transport Controlling Micromembranes and Their Application in Implanted Amperometric Glucose Sensors, Anal. Chem., Vol. 72, No. 16, Páginas 3757-3763 (2000)). Sorprendentemente, los sensores provistos de membranas de la presente invención pueden ser producidos bastante reproduciblemente, como se demuestra en el experimento descrito ahora.
- 10 Cuatro lotes de sensores (Lotes 1-4) fueron preparados por separado sumergiendo los sensores tres veces en una solución de membrana empleando equipo de moldeo y dejando curar después. En cada uno de los cuatro lotes, las soluciones de membrana fueron preparadas partiendo del polímero de Fórmula 4 y éter diglicídico de polietilenglicol (PEDGE) como agente reticulante, de peso molecular 200, aproximadamente (como en el Grupo 2 y los otros Grupos descritos anteriormente), utilizando el mismo procedimiento operatorio. Las soluciones de membrana para los Lotes 15 1 y 2 fueron preparadas por separado para cada uno y por separado de la solución de membrana utilizada para los Lotes 3 y 4. La solución de membrana para los lotes 3 y 4 fue la misma, aun cuando los sensores del Lote 3 y del Lote 4 fueron revestidos por inmersión en momentos diferentes usado un equipo de moldeo distinto. Es decir, los Lotes 1, 2 y 3 fueron revestidos por inmersión usando un sistema construido, no comercial, y el Lote 4 fue revestido por inmersión usando el sistema DSG D1L 160 a que se ha aludido antes.
- 20 Se llevaron a cabo ensayos de calibración sobre cada lote de sensores, a 37°C. Para cada lote, los sensores fueron colocados en solución tamponada que contenía PBS (pH 7) y se midió la corriente de salida (nA) de cada uno de los sensores a medida que se aumentaba la concentración de glucosa (mM). Para cada sensor de cada uno de los cuatro lotes se preparó una curva de calibración basada en una gráfica de la salida de corriente frente a concentración de glucosa, como muestra la Figura 7B (Lote 1: 5 sensores), Figura 7C (Lote 2: 8 sensores), Figura 25 7D (Lote 3: 4 sensores) y Figura 7E (Lote 4: 4 sensores). Las pendientes medias de las curvas de calibración de cada lote fueron las siguientes:
- Lote 1: Pendiente media = 1,10 nA/mM (CV = 5%);
- Lote 2: Pendiente media = 1,27 nA/mM (CV = 10%);
- Lote 3: Pendiente media = 1,15 nA/mM (CV = 5%); y
- 30 Lote 4: Pendiente media = 1,14 nA/mM (CV = 7%).

Además, para cada lote, la salida de corriente de los sensores del lote fue promediada y representada gráficamente frente a la concentración de glucosa como muestra la Figura 7A. La pendiente media de los lotes 1-4 fue 1,17 nA/mM (CV = 7,2%).

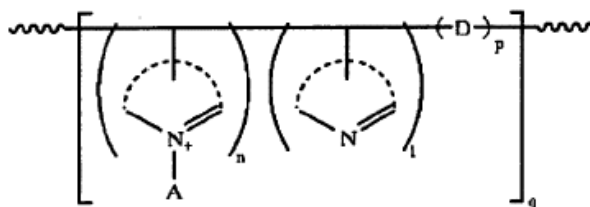
- 35 Las pendientes de las curvas dentro de cada lote y de lote a lote están agrupadas muy estrechamente, lo que muestra una variación considerablemente pequeña. Los resultados demuestran que los sensores preparados con membranas según la presente invención, proporcionan resultados bastante reproducibles tanto dentro de un lote como de lote a lote.

- 40 Los ejemplos anteriores demuestran muchas de las ventajas de las membranas de la presente invención y de los sensores que emplean tales membranas. Las ventajas particulares de los sensores que emplean las membranas de la presente invención incluyen sensibilidad, estabilidad, capacidad de respuesta, compatibilidad con movimientos, facilidad de calibración y facilidad y reproducibilidad de fabricación.

- 45 Diversos aspectos y características de la presente invención han sido explicados o descritos con respecto a opiniones o teorías, aun cuando ha de entenderse que la invención no se sujeta a una opinión o teoría particular. Diversas modificaciones y procesos, así como también numerosas estructuras a las que la presente invención puede ser aplicable, resultarán evidentes con facilidad para los expertos en la técnica hacia la que está dirigida la presente invención, mediante la revisión de la memoria descriptiva. Aun cuando los diversos aspectos y características de la presente invención han sido descritos con respecto a varias realizaciones y ejemplos específicos de esta memoria, ha de entenderse que la invención es derecho habiente a protección dentro del alcance total de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una membrana reticulada que comprende un polímero que tiene la fórmula:



5 en la que la línea horizontal continúa representa la cadena principal de un polímero; A es un grupo alquilo sustituido con un constituyente hidrosoluble; D está seleccionado entre fenilalquilo, alcoxiestireno, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcoxicarbonilalquilo, un constituyente que contiene polietilenglicol y un constituyente polihidroxilado; y cada uno de n, l, p y q es, independientemente, un número positivo.

2.- La membrana según la reivindicación 1, en la que A está cargado negativamente.

10 3.- La membrana según la reivindicación 1, en la que A está seleccionado entre un sulfonato, un carboxilato y un fosfato.

4.- La membrana según la reivindicación 1, en la que A está seleccionado entre sulfopropilo, sulfobutilo, carboxipropilo, y carboxipentilo.

5.- La membrana según la reivindicación 1, en la que A tiene la fórmula L-G, en la que L es un engarce de alquilo lineal o ramificado, de C2-C12, y G es un grupo carboxi o sulfonato cargado negativamente.

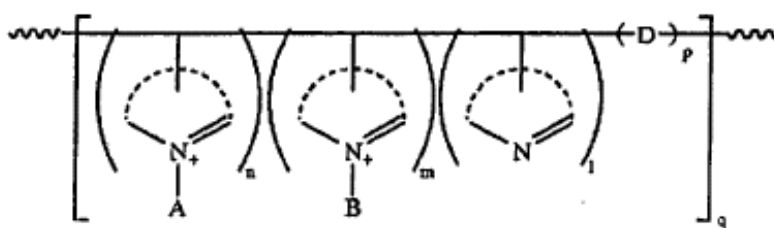
15 6.- La membrana según la reivindicación 5, en la que L está sustituido con un grupo arilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, -F, -Cl, -OH, aldehído, cetona, éster o amida.

7.- La membrana según la reivindicación 1, en la que D es estireno o metacrilato de alquilo de C1-C18.

8.- La membrana según la reivindicación 1, en la que el peso molecular medio del polímero es superior a 50.000.

9.- La membrana según la reivindicación 1, en la que el peso molecular medio del polímero es superior a 200.000.

20 10.- La membrana según la reivindicación 1, en la que el polímero comprende, además, un copolímero que contiene B de modo que el polímero tiene la fórmula:



en la que B es un modificador y m es un número positivo.

25 11.- La membrana según la reivindicación 10, en la que B esta seleccionado entre un agente quelante, un constituyente cargado negativamente, un constituyente hidrocarbonado hidrófobo, un constituyente hidrófilo hidroxilado o polihidroxilado, un polímero de silicona, y un polietilenglicol.

12.- La membrana según la reivindicación 10, en la que B es un polietilenglicol que tiene un peso molecular de desde 100 a 20.000.

30 13.- La membrana según la reivindicación 10, en la que B es un polietilenglicol que tiene un peso molecular de desde 200 a 2000.

14.- La membrana según la reivindicación 10, en la que $[n/(n+m+l+p)] \times 100\%$ es desde 1% a 25%.

15.- La membrana según la reivindicación 10, en la que $[m/(n+m+l+p)] \times 100\%$ es desde 1% a 15%.

16.- La membrana según la reivindicación 10, en la que $[l/(n+m+l+p)] \times 100\%$ es desde 20% a 90%.

17.- La membrana según la reivindicación 10, en la que $[p/(n+m+l+p)] \times 100\%$ es desde 1% a 50%.

18.- La membrana según la reivindicación 1, en la que al menos un constituyente heterocíclico nitrogenado del polímero está seleccionado, independientemente, entre piridina, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol y cualquiera de sus derivados.

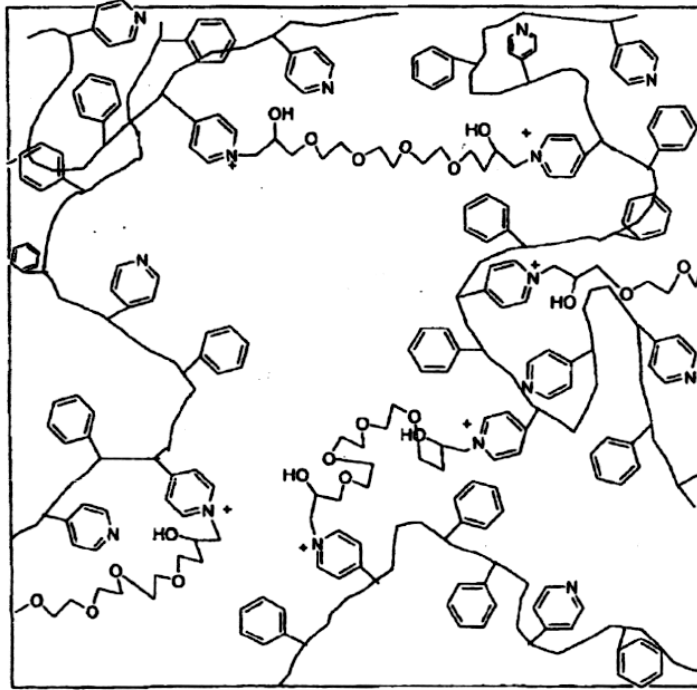


Figura 1

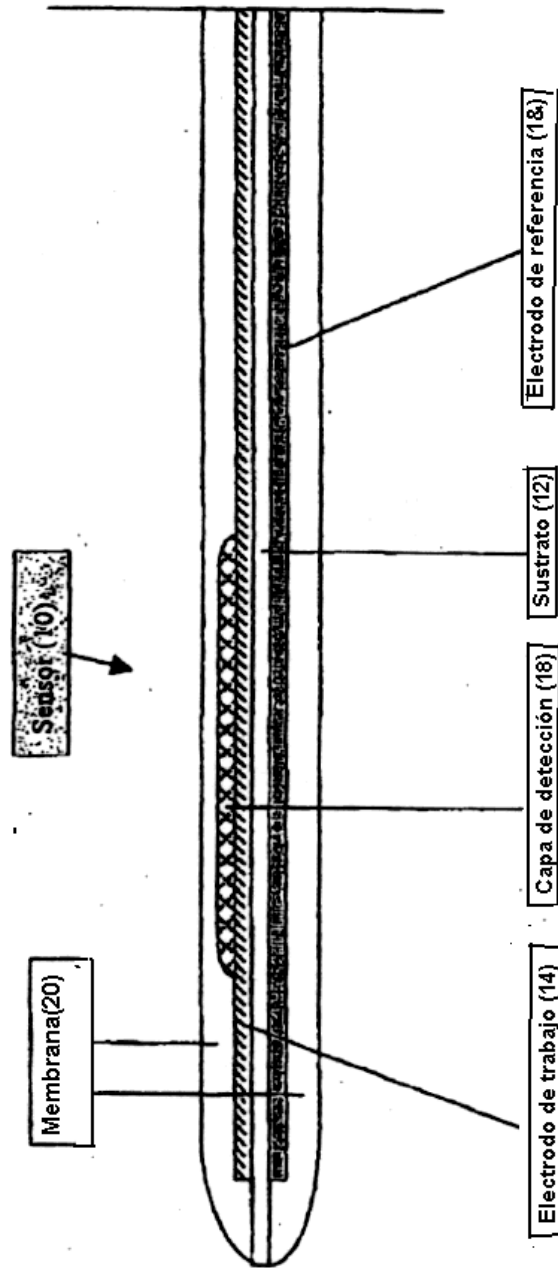


Figura 2A

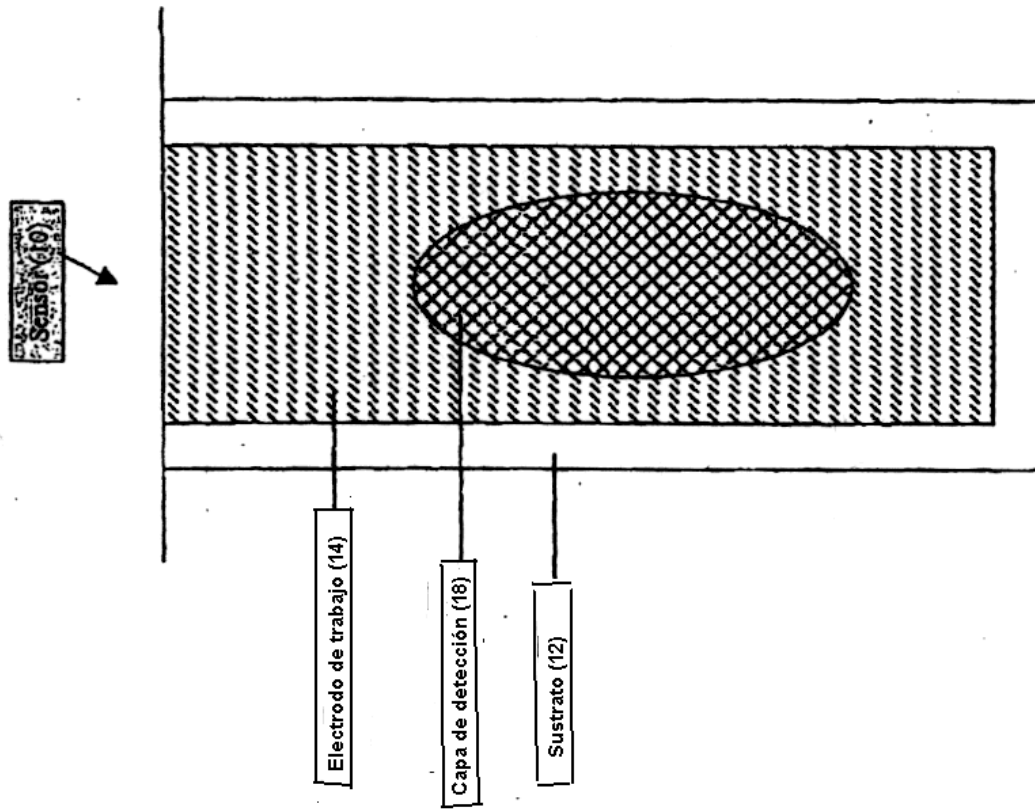


Figura 2B

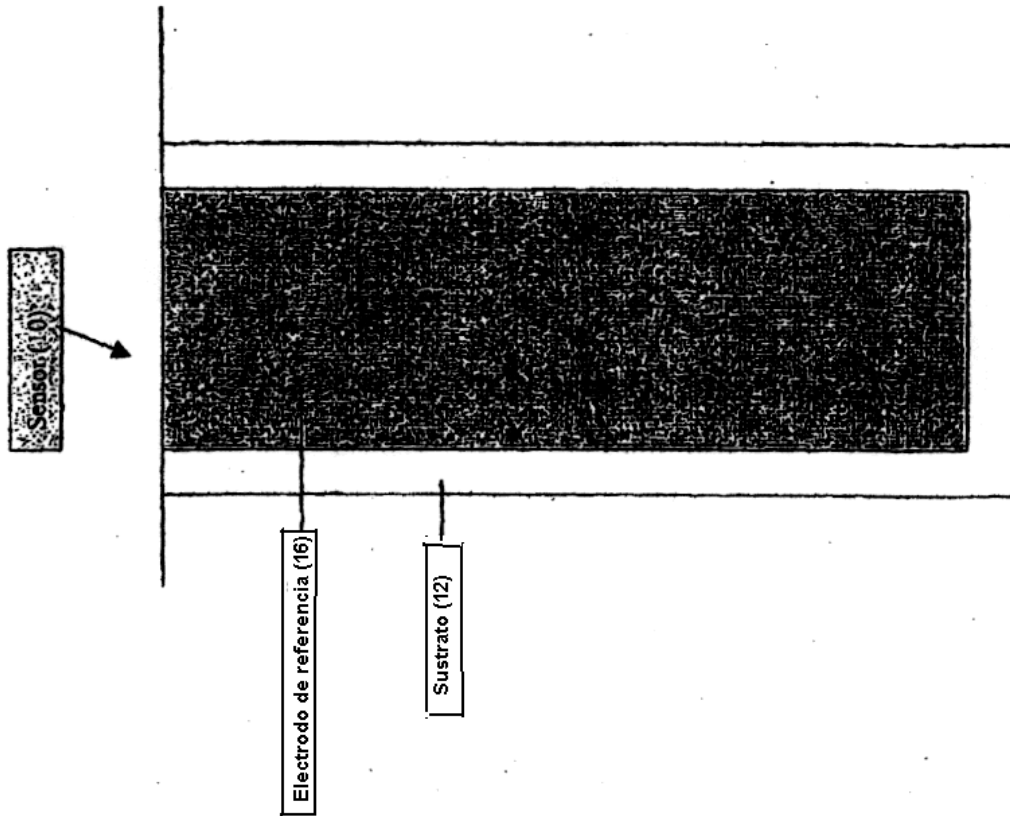


Figura 2C

Figura 3. Curvas de calibración a 37°C

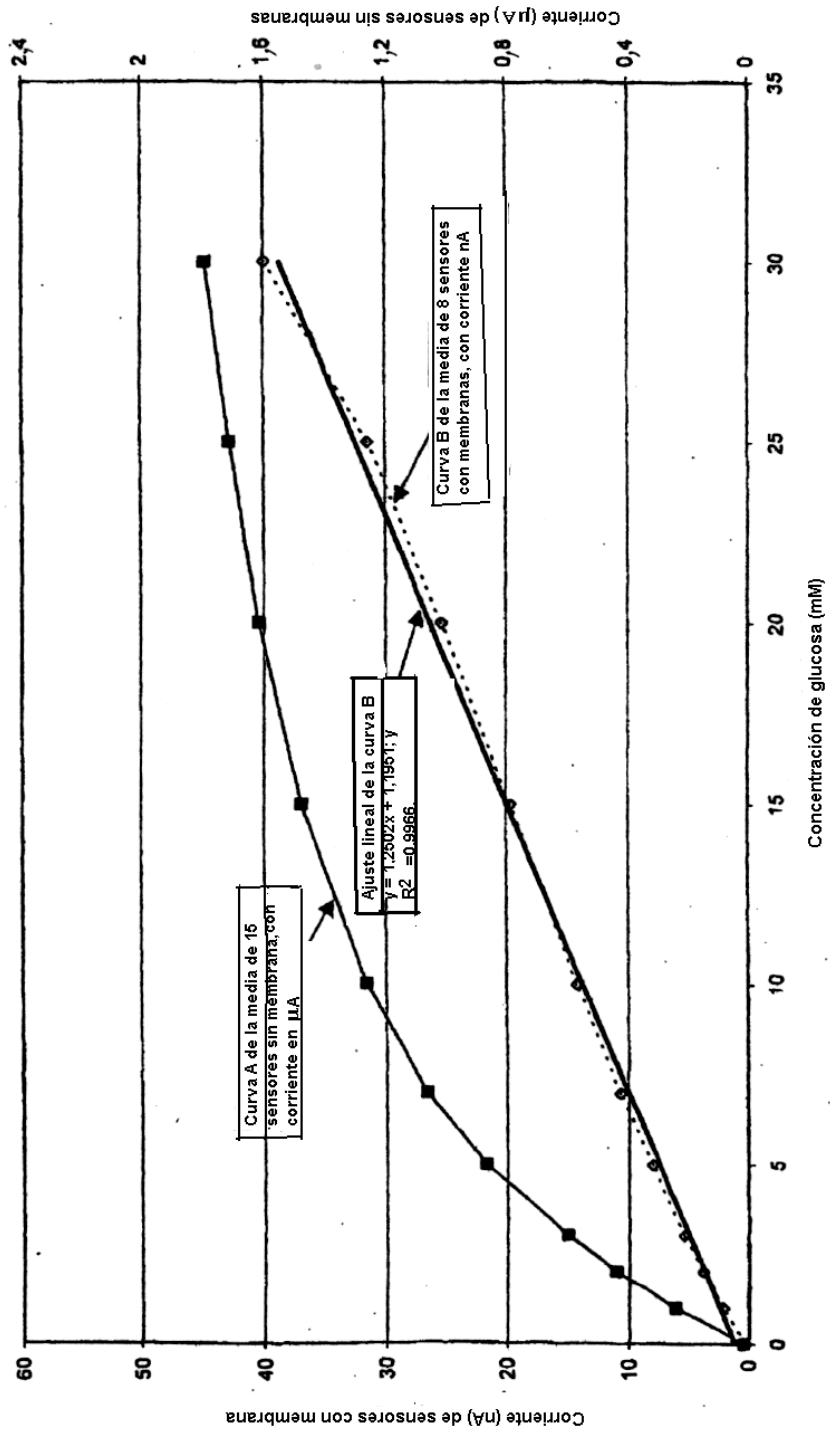


Figura 4. Curvas de estabilidad a 37°C

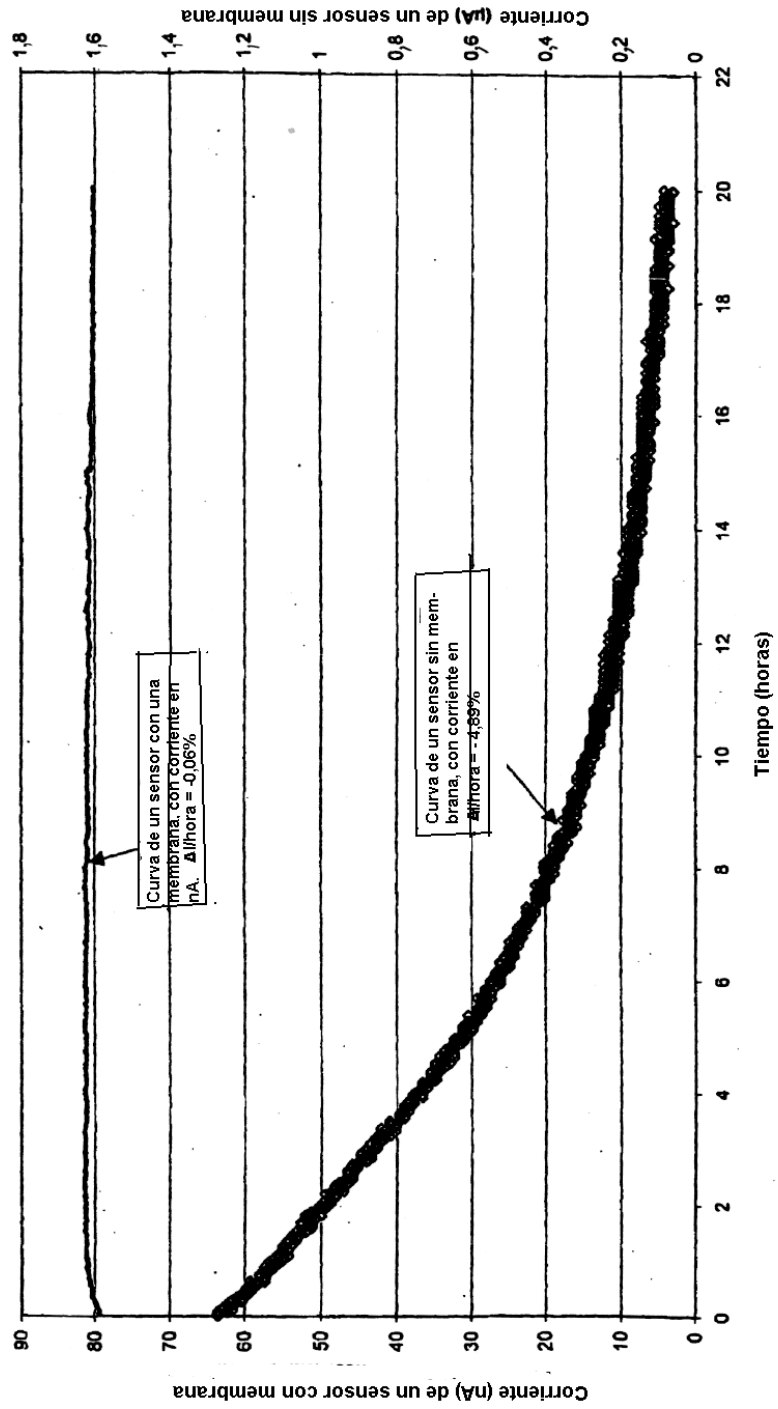


Figura 5. Curva de capacidad de respuesta a 37°C

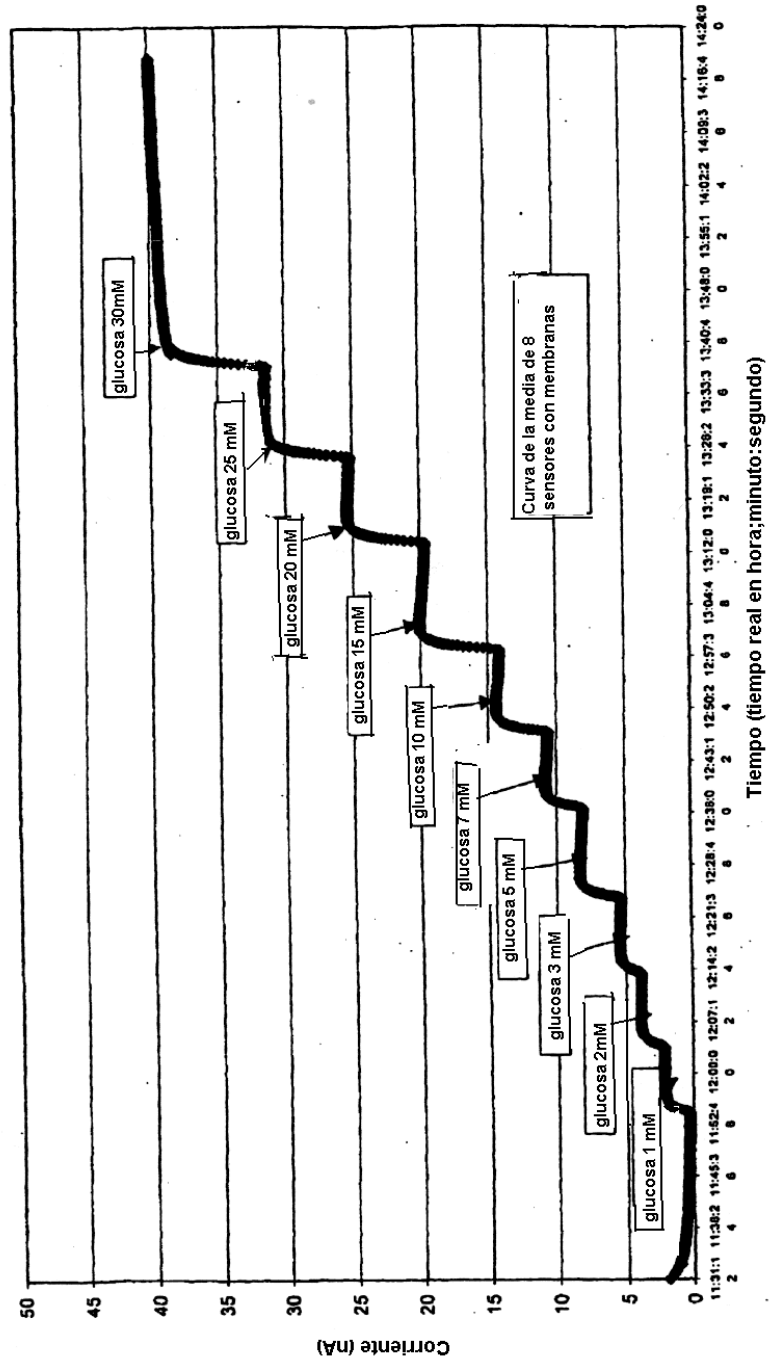


Figura 6. Curvas de Moción-Sensibilidad a 37°C

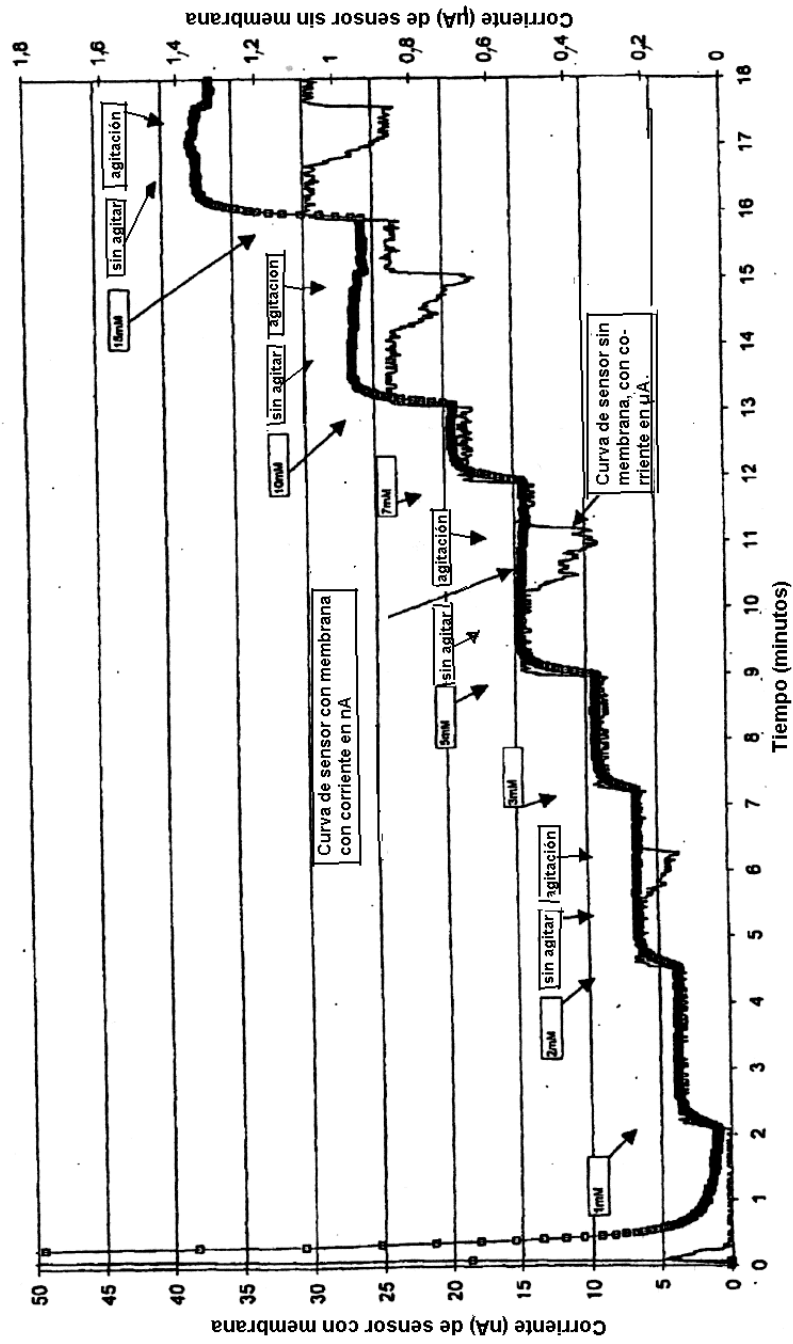


Figura 7A: Curvas de calibración de sensores de los Lotes 1-4 a 37°C

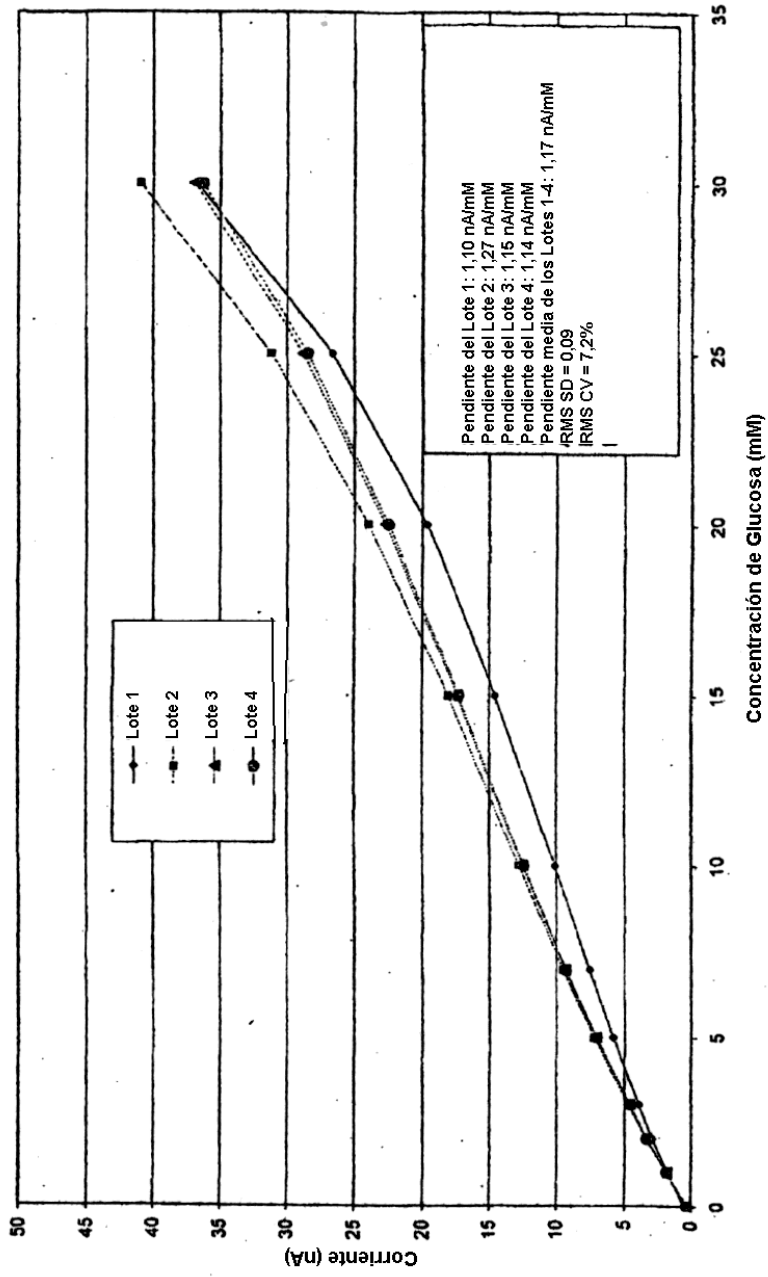


Figura 7B: Curvas de calibración de sensores del Lote 1 a 37°C
(Pendiente media = 1,10 nA/mM; CV = 5%)

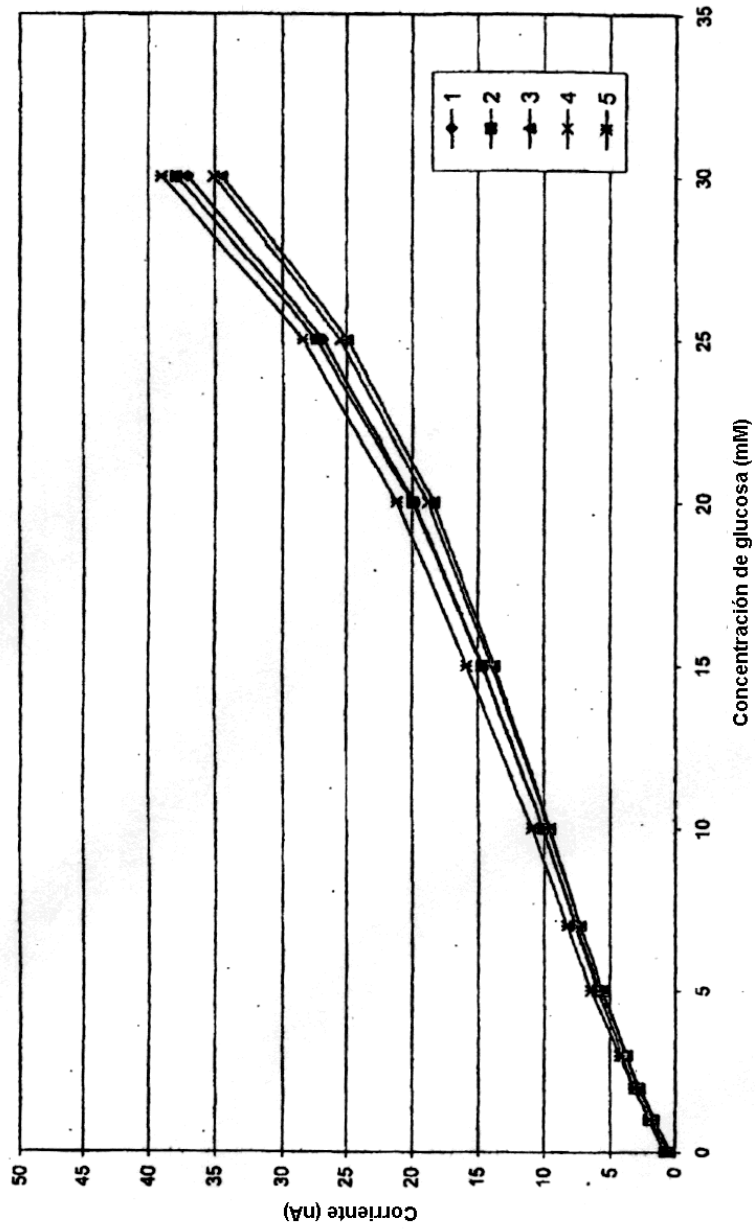


Figura 7C: Curvas de calibración de sensores del Lote 2 a 37°C
(Pendiente media = 1,27 nA/mM; CV = 10%)

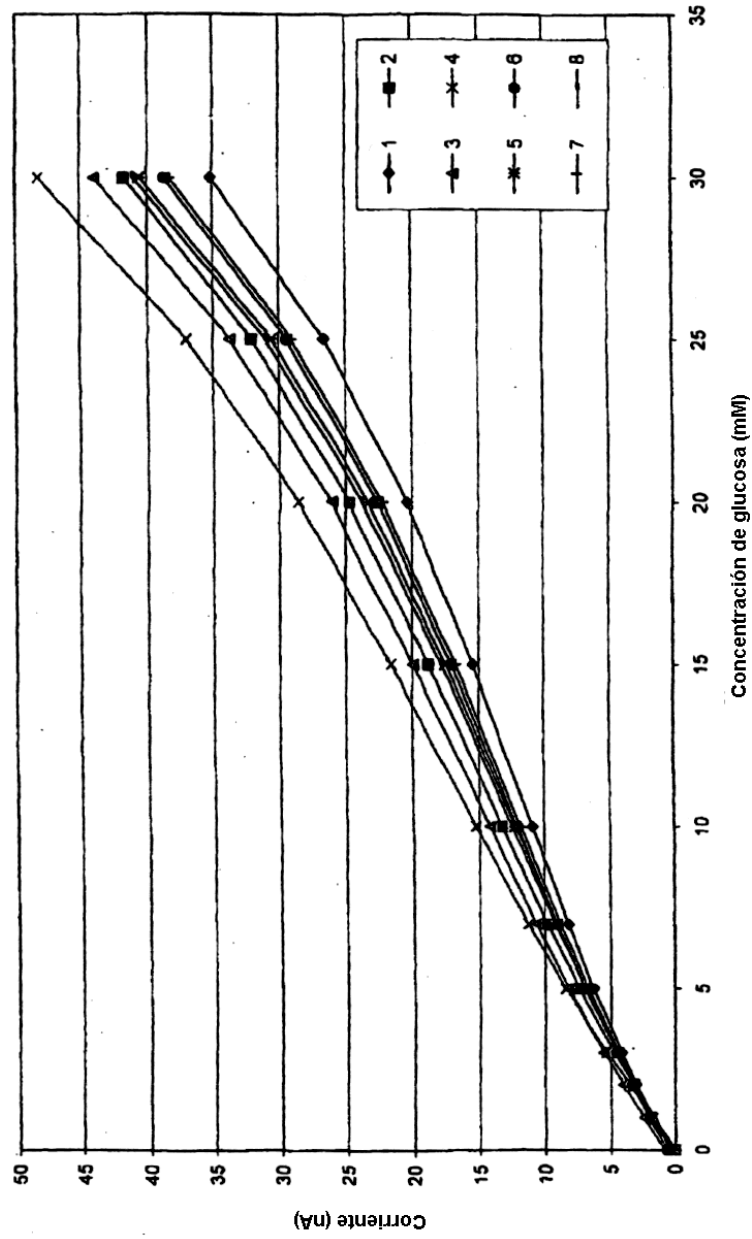


Figura 7D: Curvas de calibración de sensores del Lote 3 a 37°C
(Pendiente media: 1,15 nA/mM; CV = 5%)

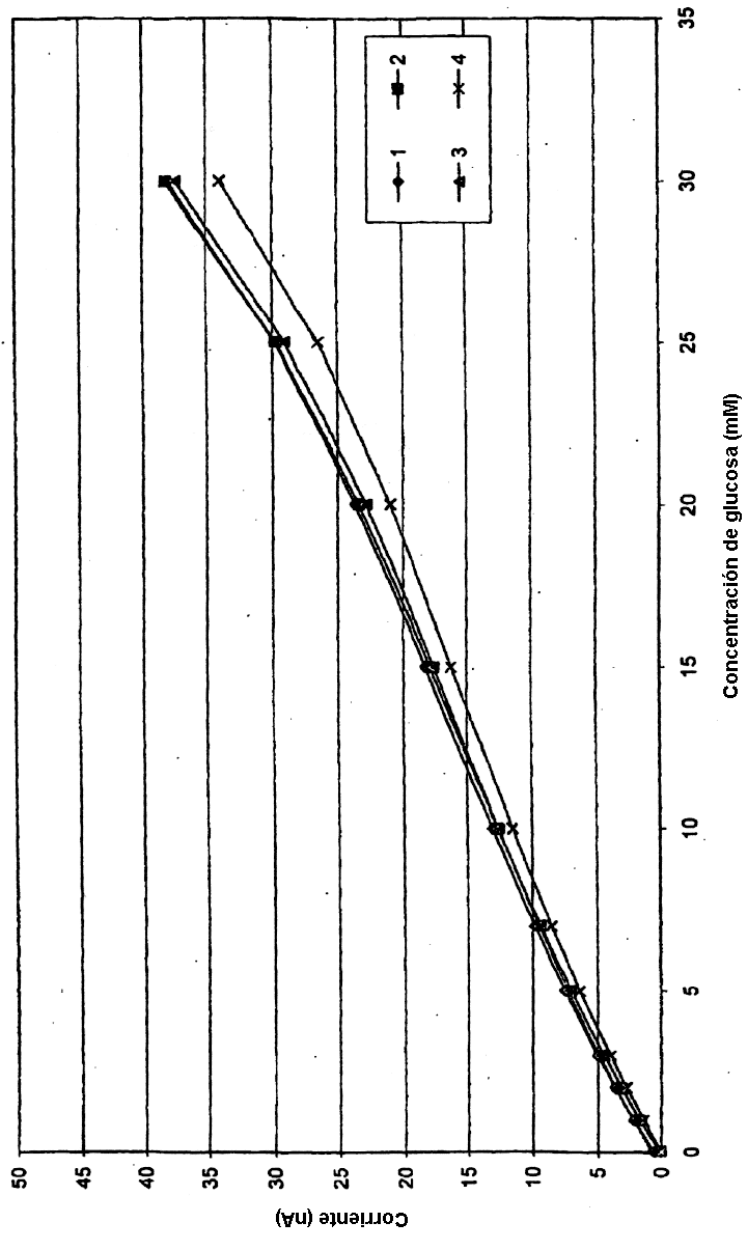


Figura 7E: Curvas de calibración de sensores del Lote 4 a 37°C
(Pendiente media = 1,14 nA/mM; CV = 7%)

