

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 273**

51 Int. Cl.:
G01N 21/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06773730 .4**
96 Fecha de presentación: **22.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1893979**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **POLÍMEROS IMPRESOS MOLECULARMENTE Y USO DE LOS MISMOS EN DISPOSITIVOS DE DIAGNÓSTICO.**

30 Prioridad:
22.06.2005 US 692559 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.12.2011

73 Titular/es:
**ADHESIVES RESEARCH, INC.
400 SEAKS RUN ROAD
GLEN ROCK, PA 17327, US**

72 Inventor/es:
**MEATHREL, William y
WAGNER, Benjamin**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 371 273 T3

DESCRIPCIÓN

Polímero impreso molecularmente y uso de los mismos en dispositivos de diagnóstico

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención está dirigida a polímeros impresos molecularmente, y al uso de los mismos en dispositivos de diagnóstico para el análisis de moléculas diana.

El reconocimiento molecular es crítico para el funcionamiento de los sistemas biológicos. Los sistemas biológicos dependen del reconocimiento molecular para realizar funciones específicas. Sistemas de reconocimiento molecular tales como interacciones enzima-sustrato, interacciones anticuerpo-antígeno, replicación del ADN y replicación celular son ejemplos de sistemas biológicos dependientes de interacciones moleculares específicas. Se usan biomoléculas tales como enzimas y anticuerpos en dispositivos de diagnóstico in vitro para detectar y cuantificar una molécula diana específica que es indicativa de una enfermedad o función biológica específica. Por ejemplo, la enzima glucosa oxidasa se usa en tiras diagnósticas de ensayo para cuantificar la concentración de glucosa en fluidos biológicos tales como sangre, suero y fluido intersticial. La glucosa oxidasa reacciona específicamente con la glucosa. Los diabéticos usan de manera rutinaria tiras de ensayo de glucosa para controlar el nivel de glucosa en su sangre.

Los polímeros impresos molecularmente (MIPs, por sus siglas en inglés) son compuestos sintéticos creados con sitios receptores que se exhiben selectivamente a un compuesto diana. La síntesis de un polímero con la funcionalidad para reconocer una molécula diana específica permite al polímero capturar y concentrar la molécula diana. Alternativamente, se puede preparar un polímero impreso molecularmente que contiene moléculas diana para liberar de manera controlable estas moléculas desde la red del polímero.

Las aplicaciones para los polímeros impresos molecularmente incluyen: adsorbentes cromatográficos, membranas, sensores y sistemas de administración de fármacos. (Referencias: Molecular Imprinting at the edge of the Third Millennium, Sergey A. Piletsky et al., Trends in Biotechnology, vol 19(1), páginas 9-12, enero de 2001, y "Polymers and Gels as Molecular Recognition Agents", Nicholas A. Peppas y Yanbin Huang, Pharmaceutical Research, vol. 19(5), páginas 578-587, mayo de 2002; "Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for the Years up to and including 2003", Alexander et al., Journal of Molecular Recognition, 2006, Vol. 19, págs. 106-180.

La síntesis de polímeros impresos molecularmente implica la polimerización y reticulación de monómeros funcionales en presencia de una molécula plantilla para capturar la impresión de la plantilla. Las moléculas plantilla pueden ser extraídas del polímero para crear sitios tridimensionales dentro de la matriz del polímero con grupos funcionales que son complementarios a los de la molécula plantilla. (Referencia, "Molecular Imprinting: State of the Art and Perspectives", Jean Daniel Marty y Monique Mauzac, Advances in Polymer Science, vol. 172, páginas 1-35, 2005).

Las redes de polímeros altamente reticulados son estructuras rígidas que pueden exhibir una alta especificidad a la molécula diana. Esta alta especificidad hace a estos polímeros rígidos ideales para métodos analíticos y técnicas de separación que requieran un emparejamiento complementario exacto de grupos funcionales moleculares y la posición y orientación de los grupos en una molécula diana. Por consiguiente, los polímeros impresos molecularmente se pueden usar como relleno de columnas cromatográficas usadas para separar enantiómeros de mezclas racémicas.

Los MIPs rígidos tienen la ventaja de ser altamente específicos a una única molécula diana. Tienen la desventaja de que es difícil extraer la molécula plantilla de la red del polímero altamente reticulado, debido a fuertes interacciones complementarias entre el polímero y las moléculas diana. Además, la funcionalidad complementaria y los requerimientos de orientación reducen la velocidad de reacción o el tiempo para que la molécula plantilla sea adsorbida en el sitio impreso. Reducir la densidad de reticulación de un MIP reduce la especificidad de los sitios de captura. Sin embargo, la velocidad de captura de la plantilla es aumentada.

Muchas patentes y artículos describen el uso de interacciones moleculares polímero-biomolécula específicas en biosensores. Per Bjork et al., en Biosensors & Bioelectronics 20 (2005), páginas 1764-1771, describe un biosensor basado en la interacción electrostática y de enlace de hidrógeno entre politiofeno y oligonucleótidos. La publicación de patente de EE.UU. N° 2004/0053425 describe un ensayo en chip basado en el reconocimiento molecular entre un péptido o proteína y un anticuerpo monoclonal. Estas aplicaciones se basan en el reconocimiento molecular, en lugar de en un polímero impreso molecularmente.

La patente de EE.UU. N° 6.638.498, de Green et al, describe MIPs para unirse a y retirar toxinas del tracto gastrointestinal.

Chin-Shiou Huang, en la patente de EE.UU. N° 6.680.210, muestra técnicas para preparar polímeros en los que se imprimen macromoléculas. Los MIPs se pueden usar para detectar y cuantificar la cantidad de cada macromolécula en una fuente biológica compleja.

La patente de EE.UU. Nº 6.762.025, cedida a Molecular Machines, Inc., muestra el uso de oligonucleótidos para el reconocimiento molecular.

5 La patente de EE.UU. Nº 6.807.842 describe un sensor de reconocimiento molecular para detectar un analito usando una película de un polímero semiconductor. La película de polímero está impresa con el analito y la resistencia de la película cambia cuando es expuesta al analito e interferentes.

La patente de EE.UU. Nº 6.582.971, de Singh et al., describe un método para imprimir molecularmente polímeros con biomoléculas grandes tales como proteínas. Usando polimerización bifásica, una biomolécula diana es impresa molecularmente en el polímero en la interfaz entre una fase acuosa y una orgánica.

10 La patente de EE.UU. Nº 6.461.873, de Catonia et al., describe un detector de cafeína que usa al menos dos polímeros impresos molecularmente en una primera y segunda zonas en una tira de papel. El MIP en la primera zona retira sustancias que puedan interferir con el análisis de la cafeína. La segunda zona está revestida con un MIP que adsorbe selectivamente cafeína y reactivos cromogénicos que proporcionan una cuantificación colorimétrica de la cafeína.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

15 Un polímero con sitios impresos molecularmente puede ser formulado en un adhesivo. El adhesivo impreso molecularmente se puede usar en dispositivos de diagnóstico in vitro para concentrar un analito diana en un área de detección. Además, se puede usar un adhesivo impreso molecularmente para extraer o unirse a compuestos interferentes de fluidos donde contactan con el adhesivo, y retirar estos compuestos en un biosensor. Concentrando un analito en el área de detección o retirando compuestos interferentes, la precisión, sensibilidad y nivel de
20 detección del dispositivo pueden ser mejorados.

Alternativamente, un adhesivo que se prepara usando un polímero que ha sido sintetizado para ser impreso con una molécula específica puede liberar de manera controlable la molécula diana según se requiera. Por ejemplo, un adhesivo impreso con un tensioactivo puede retener el tensioactivo en la red del adhesivo y liberar después el
25 tensioactivo en un dispositivo de diagnóstico para reducir la tensión superficial de fluidos. Se pueden usar adhesivos impresos con tensioactivo en dispositivos de flujo lateral para reducir la tensión superficial de fluidos biológicos tales como sangre y esputo, para aumentar las velocidades de flujo y reducir el tiempo de respuesta del sensor.

Además, la presente invención comprende un método para realizar un análisis de una muestra líquida que contiene un componente a ser analizado en cuanto a identidad y/o cantidad, que comprende poner en contacto dicha muestra líquida con un adhesivo comprendido de un polímero reticulado que ha sido impreso con dicho componente, y
30 realizar dicho análisis en base a la cantidad de dicho componente absorbida por dicho polímero que ha sido previamente impreso con dicho componente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1a es una vista cenital de un dispositivo de diagnóstico de flujo lateral;

La Figura 1b es un diagrama esquemático del dispositivo de diagnóstico de flujo lateral de la Figura 1a;

35 La Figura 2 representa un dispositivo microfluídico usado en análisis de muestras in vitro;

La Figura 3 es una vista lateral de un dispositivo de diagnóstico de flujo lateral de la presente invención;

La Figura 4 es una vista cenital del dispositivo de diagnóstico de flujo lateral de la Figura 3;

La Figura 5 es una vista en despiece de una tira de ensayo diagnóstico de flujo lateral de la presente invención;

40 La Figura 6 es una vista en despiece de otra realización de una tira de ensayo de flujo lateral de la presente invención;

La Figura 7 es una vista en perspectiva de un dispositivo de diagnóstico microfluídico acorde con la presente invención;

La Figura 8 es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 7;

45 La Figura 9 es una vista en perspectiva de otra realización de un dispositivo microfluídico que tiene una porción espaciadora de adhesivo unida a una porción base;

La Figura 10 es una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 9, en la que están presentes ambas porciones base;

La Figura 11 es una vista en perspectiva de una microplaca sin una lámina de cobertura; y

La Figura 12 es una vista en perspectiva de la microplaca de la Figura 9 con una lámina de cobertura.

La Figura 13 es una vista cenital de una microplaca de pocillos abiertos que tiene una multitud de orificios en la misma.

La Figura 14 es una vista en sección transversal de la microplaca de pocillos abiertos de la Figura 13.

5 La Figura 15 es una representación gráfica del efecto sobre determinada concentración de glucosa usando un MIP impreso para ácido úrico y ácido ascórbico.

La Figura 16 es una representación gráfica del efecto sobre determinada concentración de glucosa usando 5% en peso de MIPs impresos para ácido úrico y ácido ascórbico en la masa de un adhesivo sensible a la presión.

La Figura 17 es una representación gráfica del efecto sobre determinada concentración de glucosa usando 5% en peso de MIPs impresos para ácido úrico y ácido ascórbico en la superficie de un adhesivo sensible a la presión.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION**

La presente invención está dirigida a adhesivos que contienen al menos un polímero impreso molecularmente (MIP). Un polímero impreso molecularmente es un polímero reticulado creado con un sitio de reconocimiento molecular específico. El sitio de reconocimiento molecular es complementario a la forma y funcionalidad de una molécula diana o receptora.

15 La presente invención se basa en el efecto combinado del uso de una molécula diana, monómeros funcionales en el polímero que son complementarios a la molécula diana, y el uso de un agente de reticulación.

La molécula diana puede ser un analito, un compuesto interferente, o un compuesto a ser recogido. Además, el polímero impreso molecularmente de la presente invención se puede usar para permitir la liberación química de un componente impreso (tal como un compuesto antimicrobiano), o la administración de fármacos por medio de programación de velocidad (difusión), liberación activada o liberación regulada. El MIP se puede usar para recoger una molécula diana, o liberar una molécula diana.

20 Durante la formación del MIP, se polimerizan y reticulan monómeros funcionales en presencia de una molécula plantilla para producir una resina impresa molecularmente.

25 Ventajosamente, la resina polimérica puede estar comprendida de uno o más de los siguientes monómeros funcionales: ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido trifluorometacrílico, ácido 4-vinilbenzoico, ácido itacónico, 1-vinilimidazol, 2-vinilpiridina, 4-vinilpiridina, 4(5)-vinilimidazol, ácido 4-vinilbencil-iminodiacético, y ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico. Esta lista de monómeros funcionales no pretende ser exhaustiva, y se pueden emplear otros monómeros funcionales que se juzguen apropiados. La selección de monómeros funcionales adecuados está bien dentro de la experiencia de la persona habituada de manera rutinaria a la técnica.

30 Otros monómeros ejemplares que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, metacrilato de hidroxietilo, 1-vinilimidazol, ácido vinilacético, acrilamida y acrilamida de diacetona.

También se emplea un agente de reticulación a fin de controlar la morfología de la matriz del polímero, estabilizar el sitio de unión y proporcionar estabilidad mecánica, y está presente, de manera general, en una cantidad de entre 25-90% en peso, basado en el peso total de los reaccionantes usados para formar el polímero.

35 Los agentes de reticulación ejemplares incluyen, pero no se limitan a 4-divinilbenceno, N,N'-metilen-bisacrilamida, N,N'-fenilen-bisacrilamida, 2,6-bisacrilamidopiridina, dimetacrilato de etilenglicol, poli(dimetacrilato de etilenglicol), y trimetacrilato de trimetilolpropano.

40 Tales monómeros se pueden emplear para dar polímeros tales como poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), polipirrol, copolímeros de ácido vinilacético, acrilamida y alilbenceno; poli(4-vinilpiridina); poliestireno-co-acrilamida; copolímero de acrilamida y 4-vinilpiridina.

Los reaccionantes poliméricos y el agente de reticulación se pueden combinar entre si en presencia de un disolvente o porógeno. El disolvente o porógeno reúne a todos los reaccionantes durante la polimerización, es responsable de crear poros en el polímero (polímeros de tipo gel que pueden ser amorfos o vítreos), partículas macroporosas o de microgeles. Los disolventes típicos incluyen, pero no se limitan a, acetonitrilo o agua.

45 También se pueden emplear iniciadores basados en disolvente o basados en agua para mejorar la polimerización de los reaccionantes. Un iniciador basado en disolvente adecuado es el azobis-isobutironitrilo, y un iniciador basado en agua es el ácido 2,2'-azobis-cianoalérico.

50 La resina se usa para formular un adhesivo que puede ser revestido sobre diversas películas de soporte. La molécula plantilla puede ser retenida en la resina, dejando que la molécula plantilla sea liberada del adhesivo de manera controlable. Alternativamente, la molécula plantilla puede ser extraída de la resina antes de la formulación en un adhesivo.

Los adhesivos pueden ser formulados para contener múltiples polímeros impresos molecularmente. Se puede preparar un adhesivo que contenga múltiples MIPs para extraer diferentes moléculas plantilla (p. ej. interferentes) de un fluido según contacten los interferentes presentes en el fluido con la superficie del adhesivo.

5 Las composiciones MIP de la presente invención se pueden usar de diversas maneras diferentes. La composición MIP, una vez formada, puede ser molida hasta el tamaño de un polvo. El polvo MIP puede ser mezclado después en una composición adhesiva para formar un adhesivo que tiene uniformemente disperso en el mismo el componente MIP. El polvo MIP también se puede aplicar a la superficie de una capa adhesiva, mezclar en una disolución adhesiva bien en forma de sólido o bien en la forma de una mezcla solvatada de disolvente/sólidos, suspender en una disolución (disuelto o no), y revestir por colado o pulverización sobre una superficie adhesiva.

10 Se pueden mezclar diferentes composiciones MIP en presencia de un disolvente adecuado, y después colar o formar de otro modo hasta obtener un sólido. Después, el sólido puede ser molido hasta un tamaño de partícula adecuado. El polímero también puede ser polimerizado en presencia de dos o más moléculas.

Alternativamente, suponiendo que el polímero impreso resultante sea suficientemente blando para servir como un adhesivo sensible a la presión, el polímero impreso molecularmente puede constituir por sí mismo la capa adhesiva.

15 La identidad del componente adhesivo con el que se puede mezclar el MIP no es crítica. Se pueden emplear diversos adhesivos, tales como adhesivos sellables por calor y adhesivos sensibles a la presión, la identidad de los cuales es conocida por aquellos con experiencia habitual en la técnica.

20 Por ejemplo, se pueden usar diversos adhesivos, que incluyen, pero no se limitan a, éteres polivinílicos, adhesivos acrílicos, poli-alfa-olefinas y adhesivos de silicona, así como mezclas de los mismos. A modo de ejemplo, los adhesivos sensibles a la presión de éter polivinílico comprenden generalmente mezclas de éter vinilmetílico, éter viniletílico o éter vinilisobutílico, u homopolímeros de éteres vinílicos y acrilatos. Los adhesivos sensibles a la presión acrílicos pueden comprender, por ejemplo un componente de éster alquílico C₃₋₁₂ y un componente polar tal como ácido (met)acrílico, N-vinilpirrolidona, etc. Tales adhesivos pueden ser hechos pegajosos. Los adhesivos de poli-alfaolefinas pueden comprender un polímero de poli(alqueno) C₃₋₁₈ opcionalmente reticulado, que es bien pegajoso por sí mismo o bien puede incluir un agente de pegajosidad. Los adhesivos sensibles a la presión de silicona comprenden un polímero o goma constituyente y una resina pegajosa.

Más específicamente, el adhesivo sensible a la presión acrílico está comprendido preferiblemente de un polímero formado a partir del producto de reacción de al menos un acrilato A y un monómero B diferente del monómero A.

30 El al menos un monómero A comprende preferiblemente un éster de ácido (met)acrílico monomérico de un alcohol no terciario, donde la parte del alcohol tiene de 1 a 30 átomos de carbono. Los monómeros A ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ésteres de ácido acrílico o ácido metacrílico con alcoholes no terciarios tales como 1-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 1-metil-1-pentanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 2-etil-1-butanol, 3,5,5-trimetil-1-hexanol, 3-heptanol, 2-octanol, 1-decanol, 1-dodecanol, etc. Tales monómeros son bien conocidos por los expertos en la técnica. El al menos un componente monomérico A (si está presente más que un monómero A) exhibirá preferiblemente un número medio de átomos de carbono en la parte del alcohol de los ésteres de ácidos acrílicos o (met)acrílicos totales de entre 3 y 16.

Se pueden incorporar en el polímero uno o más monómeros B polimerizables diferentes del monómero A, monómero(s) B que es (son) copolimerizable(s) con el monómero A. Tal(es) monómero(s) B adicional(es) puede(n) ser hidrófilo(s) o bien hidrófobo(s).

40 Los monómeros B opcionales ejemplares incluyen monómeros vinílicos que tienen al menos un átomo de nitrógeno. Tales monómeros (cada uno de los cuales exhibe una T_g de >20°C) incluyen, pero no se limitan a, acrilamidas N-mono-sustituidas, tales como acrilamida, metacrilamida, N-metilacrilamida, N-etilacrilamida, N-metilolacrilamida, N-hidroxietilacrilamida y acrilamida de diacetona; acrilamidas N,N-disustituidas, tales como N,N-dimetilacrilamida, N,N-dietilacrilamida, N-etil-N-aminoetilacrilamida, N-etil-N-hidroxietilacrilamida, N,N-dimetilolacrilamida, y N,N-dihidroxietilacrilamida, etc.

Otros monómeros B opcionales pueden incluir, por ejemplo, diversos monómeros vinílicos tales como ácido (met)acrílico, ácido itacónico, ácido crotonico, (met)acrilato de metoxietilo, (met)acrilato de etoxietilo, (met)acrilato de glicerol, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de hidroxipropilo, acrilato de beta-carboxietilo, vinilpirrolidona, vinilcaprolactama y acrilato de caprolactama. Se puede emplear uno o más monómeros B.

50 Tales adhesivos sensibles a la presión son bien conocidos por un experto habitual en la técnica, y pueden ser seleccionados fácilmente por tales personas para el uso en la presente invención.

Ventajosamente, tales MIPs se pueden usar en dispositivos de diagnóstico tales como dispositivos de flujo lateral u otros tipos de dispositivos de diagnóstico como los representados en las Figuras discutidas más adelante. Se ha encontrado que los interferentes presentes de manera natural en un fluido que contacta con el dispositivo de diagnóstico pueden interferir con la obtención de un resultado diagnóstico exacto. Por ejemplo, como se discute más adelante, la presencia del interferente ácido úrico y/o ácido ascórbico en la sangre interfiere con la obtención de una

determinación exacta de la cantidad de glucosa presente en la sangre. Mediante el uso de un MIP que ha sido impreso con ácido úrico y/o ácido ascórbico, el ácido úrico y/o ácido ascórbico pueden ser retirados del fluido durante la diagnosis, mejorando así la exactitud de la determinación de glucosa en el fluido. La misma ventaja existe con respecto a otros interferentes que puedan estar presentes.

- 5 La molécula diana debe ser no reactiva bajo las condiciones de polimerización empleadas para formar el polímero impreso. Una relación de pesos típica de monómero/molécula diana es 4:1, aunque la cantidad de molécula diana que se emplea no es crítica para la práctica de la invención reivindicada.

10 Un método para preparar un polímero impreso molecularmente con sitios de reconocimiento de la glucosa es descrito por Hasoo Seong et al en el Journal Biomaterial Science Polymer Education, Vol. 13(6), páginas 637-649 (2002).

Se sintetizó un polímero impreso con glucosa usando monómeros funcionales usados actualmente para preparar adhesivos sensibles a la presión. Los Ejemplos 1-7 describen diversas formulaciones y condiciones usadas para preparar MIPs impresos con glucosa, así como sistemas de control. El reticulador y la concentración del reticulador se seleccionaron para controlar la rigidez del sitio receptor de glucosa.

- 15 La presente invención se describe además en relación con los siguientes Ejemplos, que se deben ver como meramente ilustrativos de la invención y no limitantes por naturaleza.

El Ejemplo 1 es una formulación polimérica convencional que se prepara sin la presencia de un agente de glucosa, y se hace como composición de control.

Ejemplo 1

20	13% de sólidos, disolvente DMSO	
	ácido vinilacético	4,89% en peso
	acrilamida	4,03%
	alilbenceno	6,71%
	diacrilato de 1,4-butanodiol	84,37%

- 25 Los reaccionantes anteriores se mezclan con 1% en peso de los monómeros con el iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetil-pentanitrilo), y se polimerizan durante 4 horas a 60°C en una atmósfera de nitrógeno.

El Ejemplo 2 contiene los mismos componentes de polímero que la formulación del Ejemplo 1, pero también incluye un componente de D-glucosa.

Ejemplo 2

30	13% de sólidos, disolvente DMSO	
	ácido vinilacético	5,34% en peso
	acrilamida	4,41%
	alilbenceno	7,33%
	D-glucosa	11,18%
35	diacrilato de 1,4-butanodiol	71,74%

Los reaccionantes anteriores se mezclan con 1% en peso de los monómeros con el iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetil-pentanitrilo), y se polimerizan durante 4 horas a 60°C en una atmósfera de nitrógeno.

Tras completarse la polimerización, el polímero de los Ejemplos 1 y 2 se secó para retirar el disolvente y después se molió hasta un polvo fino.

- 40 El polvo polimérico del Ejemplo 2 se lavó con agua para retirar cualquier resto de glucosa. Después del lavado con agua, se volvieron a secar los polímeros. Para determinar la capacidad de los sitios impresos para extraer y concentrar D-glucosa, el polímero fue expuesto a una disolución acuosa que contenía 10% de glucosa. Se usó un análisis termogravimétrico usando un Universal V2.6D de TA Instruments para medir el cambio en la estabilidad
- 45 descomposición del polímero con o sin glucosa, se encontró que el 70% de los sitios teóricos se formaron durante la polimerización, y el 50% de estos sitios permanecieron viables para la captación de glucosa después de la retirada de la glucosa.

El Ejemplo 3 es otra formulación polimérica convencional que se prepara sin la presencia de un agente de glucosa, y se hace como composición de control.

Ejemplo 3

13% de sólidos, disolvente DMSO

5	ácido vinilacético	4,89% en peso
	acrilamida	4,03%
	alilbenceno	6,71%
	N,N-metilen-bis-acrilamida	84,37%

10 Los reaccionantes anteriores se mezclan con 1% en peso de los monómeros con el iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetil-pentanitrilo), y se polimerizan durante 4 horas a 60°C en una atmósfera de nitrógeno.

El Ejemplo 4 contiene los mismos componentes de polímero que la formulación del Ejemplo 3, pero también incluye un componente de D-glucosa.

Ejemplo 4

13% de sólidos, disolvente DMSO

15	ácido vinilacético	5,34% en peso
	acrilamida	4,41%
	alilbenceno	7,33%
	D-glucosa	11,18%
	N,N-metilen-bis-acrilamida	71,74%

20 Los reaccionantes anteriores se mezclan con 1% en peso de los monómeros con el iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetil-pentanitrilo), y se polimerizan durante 4 horas a 60°C en una atmósfera de nitrógeno.

Como se apuntó anteriormente, el polímero sintetizado en el Ejemplo 3 no contiene sitios impresos con glucosa, y se usa como control. El Ejemplo 4 es un polímero similar. Sin embargo, la polimerización y reticulación se produce en presencia de glucosa como molécula plantilla.

25 No se pudo usar un análisis termogravimétrico para los Ejemplos 3 y 4, dado que el cambio en la descomposición del polímero fue similar a la glucosa. Para medir la impresión de la glucosa en el Ejemplo 4, se obtuvo de WAKO Chemicals USA, Inc. un kit de glucosa Glucose G2 Autokit. Este kit emplea un método enzimático que usa mutarotasa y glucosa oxidasa para generar peróxido de hidrógeno durante la oxidación de la glucosa. Después, el peróxido de hidrógeno induce la condensación oxidativa entre fenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa para crear un color rojo. Midiendo la absorbancia del color rojo, la concentración de glucosa puede ser determinada.

30 Se siguió un procedimiento de lavado y secado similar al de los Ejemplos 1 y 2. Los polímeros de los Ejemplos 3 y 4 fueron expuestos a una disolución acuosa de glucosa al 10%, después se lavaron y se recogió una muestra de los extractos acuosos del control y de los polímeros impresos. Las muestras acuosas se prepararon siguiendo las instrucciones del kit de glucosa, y la absorbancia se ensayó en un espectrofotómetro Lambda 9000 UV/VIS/NIR de Perkin Elmer. Usando un patrón de concentración conocida incluido en el kit, se determinó la concentración de glucosa en las muestras acuosas. Este valor fue relacionado con los sitios de glucosa impresos teóricos en los polímeros. Se calculó que se formaron el 80% de los sitios teóricos durante la polimerización para el Ejemplo 4, y el 70% de estos sitios permanecieron viables para la captación después de la retirada de la glucosa.

35 Los Ejemplos 2 y 4 forman polímeros de rígidos a blandos que se formularon en un adhesivo y se revistieron sobre un soporte de poliéster. La película adhesiva se usó en un dispositivo de flujo lateral para soportar una membrana de nitrocelulosa bajo un área de detección. El área de detección en la membrana de nitrocelulosa había sido tratada con reactivos colorimétricos que responden a la glucosa. Se hizo pasar una gota de una disolución acuosa de glucosa al 1% a través de la membrana, y el color en el área de detección respondió en 2 segundos. Se construyó un dispositivo de flujo lateral similar sin el adhesivo MIP usando los controles de los Ejemplos 1 y 3, y los reactivos colorimétricos en el área de detección no respondieron hasta 10 segundos.

45 El Ejemplo 5 también contiene los mismos componentes de polímero que la formulación del Ejemplo 2, pero también incluye un componente de ácido úrico en lugar de un componente de D-glucosa. El ácido úrico es un conocido interferente en las determinaciones de glucosa, como se discutió anteriormente.

Ejemplo 5

13% de sólidos, disolvente DMSO

ácido vinilacético 5,34% en peso

acrilamida 4,41%

alilbenceno 7,33%

ácido úrico 11,18%

N,N-metilen-bis-acrilamida 71,74%

Los reaccionantes anteriores se mezclan con 1% en peso de los monómeros con el iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetil-pentanitrilo), y se polimerizan durante 4 horas a 60°C en una atmósfera de nitrógeno.

- El Ejemplo 5 muestra un polímero MIP impreso para ácido úrico por retirada de ácido úrico del polímero resultante por un exhaustivo lavado con agua. Se ha reportado que el ácido úrico interfiere con la respuesta de las tiras de ensayo de glucosa en sangre. El MIP de ácido úrico se formuló en un adhesivo, y la cinta adhesiva se usó como cubierta sobre el canal para sangre de una tira de ensayo de glucosa en sangre Accu-Chek Comfort Curve fabricada por Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN. Una disolución de ensayo que contenía 130 mg/decalitro de glucosa y 8 mg/decalitro de ácido úrico se dejó absorber a través del canal de sangre.

Se obtuvieron mediciones de glucosa más exactas cuando el canal fue cerrado por el adhesivo impreso con ácido úrico en comparación con una tira de ensayo de control que no contenía el adhesivo MIP.

- Se sabe también que otros compuestos, tales como el acetaminofeno y el ácido ascórbico, interfieren con el análisis de la glucosa en sangre. Otras moléculas que pueden ser impresas incluyen, pero no se limitan a, cafeína, melatonina, morfina u otros fármacos de adicción, etc. Se pueden preparar MIPs similares al Ejemplo 5 usando estos compuestos interferentes como moléculas plantilla. Por ejemplo, se pueden preparar polímeros individuales para cada interferente de la misma manera que la apuntada anteriormente. Alternativamente, se puede sintetizar un polímero con sitios impresos para múltiples compuestos interferentes incorporando diferentes interferentes en un único lote de reacción.

- El Ejemplo 6 contiene otra formulación polimérica adhesiva sensible a la presión convencional, fotocurable y exenta de disolventes, para el uso como control.

Ejemplo 6

acrilato de 2-etilhexilo 56,15% en peso

acrilato de n-butilo 14,99

acetato de vinilo 19,98

ácido acrílico 5,61

poli(diacrilato de etilenglicol) 2,50

2-hidroxi-2-metil-1-fenil-1-propanona 0,77

- Los reaccionantes anteriores se mezclan con 1% en peso de los monómeros con el iniciador 2,2'-azobis(2,4-dimetil-pentanitrilo), y se polimerizan durante 4 horas a 60°C en una atmósfera de nitrógeno.

El Ejemplo 7 contiene los mismos componentes de polímero que la formulación del Ejemplo 6, pero también incluye un componente de tensioactivo - es decir, Aerosol OT, un tensioactivo aniónico, obtenido de Cytec Industries.

Ejemplo 7

acrilato de 2-etilhexilo 55,74% en peso

acrilato de n-butilo 14,88

acetato de vinilo 19,83

ácido acrílico 5,57

poli(diacrilato de etilenglicol) 2,48

2-hidroxi-2-metil-1-fenil-1-propanona 0,76

Después de un fotocurado por radicales libres, el Ejemplo 7 produce un adhesivo sensible a la presión hidrófilo. La molécula de tensioactivo se usa como plantilla para crear sitios impresos dentro de la matriz del adhesivo. Las moléculas de tensioactivo pueden ser liberadas del adhesivo de manera controlable durante el uso para reducir la tensión superficial de los fluidos que contactan con el adhesivo. Dado que las moléculas del tensioactivo están atrapadas dentro de la matriz del polímero, son menos lábiles y el adhesivo retiene sus propiedades hidrófilas incluso después de enjuagar el adhesivo bajo el chorro del agua del grifo.

Se preparó una cinta adhesiva sensible a la presión revistiendo el polímero impreso del Ejemplo 7 sobre una película de poliéster de 3 mil de grosor. La cinta impresa con tensioactivo se usó como cubierta para encerrar canales fluidicos moldeados en un sustrato de polietileno. El agua fluyó a través de los canales, mientras que una construcción similar preparada usando una cinta adhesiva sensible a la presión hecha usando el polímero de control del Ejemplo 6 no lo hizo. El flujo de agua a través de los canales se pudo repetir múltiples veces, ilustrando la retención del tensioactivo en el polímero adhesivo impreso.

Los polímeros impresos molecularmente de la presente invención se pueden usar con ventaja con dispositivos de diagnóstico tales como los descritos en la Publicación PCT WO 02/085185. Tales dispositivos incluyen dispositivos de flujo lateral, dispositivos de diagnóstico in vitro microfluídicos, y dispositivos de diagnóstico in vitro comprendidos de una microplaca que tiene una placa base que tiene dispuestos en la misma una multitud de microorificios o cavidades, y al menos una cubierta colocada en relación de sellado para dichos microorificios o cavidades.

La Publicación PCT WO 02/085185 muestra la combinación de un tensioactivo con una composición polimérica a fin de dar un polímero hidrófilo. Sin embargo, la publicación apuntada meramente muestra la mezcla del tensioactivo con un polímero solvatado. Esto es, en contraste, mezclar el tensioactivo con la mezcla de monómeros que son después polimerizados y reticulados en presencia del tensioactivo para formar un polímero impreso.

Los dispositivos de flujo lateral como los mostrados en las Figuras 1A y 1B tienen típicamente un área de entrada de muestras para recibir el fluido biológico. El área u orificio de entrada de muestras puede estar próximo a una capa conjugada que contiene los reactivos específicos para el método de ensayo analítico. Según fluye el espécimen de muestra desde el área de entrada a través de un área de reactivos, se producen reacciones químicas específicas o una formación de complejos. El producto de reacción o complejo continúa fluyendo hasta un área de detección, donde el analito es medido. Los fluidos del espécimen pueden continuar fluyendo y ser recogidos en una capa absorbente. El tiempo requerido para determinar la concentración de un analito específico es dependiente de la velocidad de flujo del fluido y la velocidad de reacción entre el analito y un reactivo de ensayo específico.

Se usan típicamente soportes adhesivos en la construcción de dispositivos de flujo lateral para soportar los diversos componentes del dispositivo, incluyendo la capa conjugada, una membrana microporosa con reactivos específicos y una capa absorbente como se muestra en las Figuras 1A y 1B. La capa adhesiva puede ser bien sensible a la presión o bien sellable por calor, y puede estar presente en una película de soporte tal como una película de poliéster. La velocidad de flujo del fluido de muestra es controlada típicamente por el flujo capilar a través de la membrana microporosa.

La presente invención se puede emplear con ventaja en diversos dispositivos de diagnóstico in vitro, tanto del tipo de flujo lateral como de flujo capilar, con dispositivos del tipo de flujo lateral de las Figuras 3-8. En una realización de un dispositivo de flujo lateral de la presente invención como el representado en la Figura 6, el dispositivo comprende una cubierta 1 de la carcasa, medios 3 (orificios) en la cubierta de la carcasa para introducir una muestra a ser ensayada en el dispositivo, medios 5 (capa absorbente) para la recogida de fluidos, y una tira 7 de soporte que tiene separados por un espacio un primer y segundo extremos. Los medios para la recogida de fluidos de muestra están adheridos al soporte en un primer extremo de la tira de soporte, los medios para introducir la muestra están adheridos al soporte en el segundo extremo de la tira de soporte. Una membrana 9 microporosa o porosa está colocada opcionalmente entre el primer y segundo extremos para proporcionar una vía para el recorrido de la muestra entre el primer y segundo extremos, así como para proporcionar una matriz para cualquier material reactivo que pueda estar presente para el contacto con la muestra fluida, tiempo durante el cual la muestra contacta con el reactivo con el que se debe producir la reacción o contacto.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, la tira de soporte entre el primer y segundo extremos puede ser una película de polímero impreso molecularmente, que puede ser adhesiva por naturaleza. La tira 7 de soporte puede ser, p.ej., sellable por calor o exhibir propiedades adhesivas sensibles a la presión. Si la tira 7 de soporte exhibe propiedades adhesivas sensibles a la presión, y está impresa molecularmente con un tensioactivo, el carácter hidrófilo del material sirve para evitar reducir la eficacia de cualquier membrana 9 unida a la tira de soporte en el caso de que se produzca una migración del adhesivo hacia la membrana.

A modo de ventaja adicional, si la tira de soporte está impresa con un tensioactivo, puede ser posible evitar el uso de la membrana 9, por el contrario confiar únicamente en el carácter hidrófilo de la propia tira de soporte para absorber la muestra desde el punto de introducción de muestras hasta el punto de recogida de muestras. En tal realización, el reactivo con el que la muestra debe contactar o reaccionar se aplicará bien directamente a la tira de soporte para el

contacto con la muestra, o bien será presentado a la superficie de la tira de soporte desde un reservorio unido a la tira de soporte de una manera convencional.

El orificio 11 se puede emplear para proporcionar acceso para otro material tal como un tampón a ser aplicado a la capa 13 absorbente. La muestra, una vez añadida al orificio 3, contacta con la capa 15 absorbente. El montaje de la tira de soporte y los componentes unidos asociados puede estar posicionado dentro de una porción 17 de fondo de la carcasa. La cubierta 1 de la carcasa incluye un orificio 20 de visión para ver el resultado visual de la reacción entre la muestra y el reactivo presente en el dispositivo.

Las Figuras 3 y 4 representan una tira de ensayo de flujo lateral acorde con la presente invención. La tira de ensayo incluye una capa 19 absorbente de muestras, una membrana 21 y una capa 23 de recogida de muestras. La tira 25 de soporte incluye una superficie 27 que puede ser sellable por calor o sensible a la presión por naturaleza de acuerdo con la presente invención, y que puede ser un MIP. Las áreas 29 en la membrana 21 contienen reactivos para la reacción con la muestra. Alternativamente, la membrana puede ser omitida y su función servida por una superficie hidrófila de la tira 25 de soporte si está impresa con un tensioactivo. En tal realización, las áreas 29 pueden aún contener reactivos para la reacción con la muestra de ensayo, y las áreas 29 de la tira de soporte también se pueden hacer más hidrófobas (o menos hidrófilas) que la superficie restante de la tira de soporte. La presencia de tales áreas servirá para reducir la velocidad de paso de la muestra a través de la tira de soporte para maximizar el tiempo de contacto con los reactivos en las áreas 29.

Otra realización del dispositivo de la presente invención se representa en la Figura 5. El dispositivo de la Figura 5 incluye las cubiertas 31, 33 para los extremos respectivos del dispositivo, que incluyen la capa 37 de muestras y la capa 35 de recogida, habiendo zonas 41 de ensayo intermedias entre los extremos del dispositivo sobre la tira 39 de soporte que tiene una superficie 43 impresa. Como se discutió anteriormente, las zonas 41 de ensayo pueden estar posicionadas en partes de la tira de soporte que han sido hechas menos hidrófilas (o más hidrófobas) que la parte restante de la tira de soporte, o que pueden ser por el contrario impresas con un componente deseado.

Se pueden emprender con ventaja diversas modificaciones en tal realización. Como se discutió anteriormente, se pueden proveer áreas selectivas de carácter superficial hidrófilo/hidrófobo sobre la superficie del material de soporte mediante impresión molecular para modificar las características de flujo de la muestra fluida, bien dirigiendo la muestra longitudinalmente a lo largo de la tira de soporte hacia el punto de recogida de fluidos, o bien causando que la muestra fluida contacte con áreas hidrófilas/hidrófobas adyacentes para reducir la velocidad de flujo de la muestra fluida a lo largo de la tira de soporte. En tal caso, por ejemplo, el reactivo puede estar situado en la parte hidrófoba, donde la absorción de la muestra fluida sería más lenta para permitir un tiempo de contacto más largo entre la muestra fluida y el reactivo. En los términos de esta discusión, el término hidrófoba no pretende significar que la parte del soporte sería enteramente hidrófoba, sino que también podría significar que ese área es más hidrófoba que la parte hidrófila adyacente de la tira de soporte (es decir, ambas partes tendrían diversos grados de hidrofiliidad, de tal modo que la absorción de la muestra fluida sería aún estimulada a viajar desde la entrada de muestras hasta el área de recogida de muestras).

Por consiguiente, en el contexto de las Figuras 3-6, la superficie de la película de soporte (p.ej., una película de poliéster como en la Figura 1) se podría hacer hidrófila por impresión molecular como se discutió anteriormente, y ser empleada como una capa sellable por calor para la unión a la capa absorbente y la capa de muestra/capa conjugada. Opcionalmente, también se podría unir una membrana a la tira de soporte hidrófila sellable por calor. Alternativamente, el uso de la membrana puede ser evitado y los reactivos ser aplicados directamente a la superficie hidrófila de la tira de soporte, y causar que la muestra y el reactivo se absorban directamente a través de la superficie de la tira de soporte hacia la capa absorbente. Alternativamente, la capa de soporte puede estar impresa molecularmente con otros tipos de moléculas, como se discutió anteriormente.

Como se discutió anteriormente, en una realización donde la tira de soporte comprende una capa adhesiva sensible a la presión hidrófila, la membrana aún se puede usar con ventaja debido al carácter hidrófilo del adhesivo, sin temor a una disminución de la capacidad de la membrana para funcionar debido a la migración del adhesivo. Sin embargo, es posible aún evitar el uso de la membrana, sirviendo la capa adhesiva hidrófila como medio de transporte para la muestra desde la capa de muestras hasta la capa absorbente. Cualesquiera reactivos que se deseen poner en contacto con la muestra se pueden aplicar directamente a la superficie de la capa adhesiva hidrófila. El carácter adhesivo de la tira de soporte también se puede emplear con ventaja para unir las respectivas capas de muestra/conjugada/absorbente a la tira de soporte. Esto facilita la fabricación del dispositivo. Tal dispositivo estaría contenido típicamente en una carcasa adecuada que incluye, de manera general, una ventana de visión para determinar la extensión de la reacción de la muestra y el reactivo (p.ej., determinar la extensión de la reacción debida a la formación de color o la intensidad del color formado).

En el contexto de un dispositivo de diagnóstico microfluídico que emplea transporte capilar de la muestra fluida durante el procedimiento de análisis, tales dispositivos incluyen típicamente canales microfluídicos moldeados en un sustrato polimérico adecuado (véanse las Figuras 7 y 16). Dispositivos microfluídicos se refiere, de manera general, a un dispositivo que tiene uno o más canales, pasajes, cámaras o conductos de fluido que tienen al menos una dimensión en sección transversal interna (anchura o profundidad) de entre 0,1 μm y 500 μm , dentro de la cual una muestra fluida pasa desde un orificio de entrada hasta una zona de detección.

El dispositivo de diagnóstico microfluídico está comprendido, de manera general, de una porción base sustancialmente plana que tiene uno o más canales, pasajes, cámaras o conductos microfluídicos en la misma. Diversos materiales pueden comprender la porción base, incluyendo materiales poliméricos tales como poli(meta-crilato de metilo), policarbonato, politetrafluoroetileno, poli(cloruro de vinilo), poli(dimetilsiloxano), polisulfona, y sustratos basados en sílice tales como vidrio, cuarzo, silicona y polisilicona, así como otros materiales de sustrato empleados convencionalmente.

Tales sustratos se fabrican por medios convencionales, tales como moldeo por inyección, repujado o estampado, etc. Los pasajes o canales microfluídicos pueden ser fabricados en la porción base por técnicas de microfabricación convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, fotolitografía, grabado químico húmedo, ablación por láser, técnicas de abrasión por aire, moldeo por inyección, repujado y otras técnicas. El material de la base se selecciona en base a la compatibilidad con el método de fabricación deseado, así como la compatibilidad con la exposición prevista a materiales y condiciones, que incluyen extremos de pH, temperatura, concentración salina, y la aplicación de campos eléctricos. El material de la base también se puede seleccionar para propiedades opcionales, que incluyen transparencia y características espectrales.

Una superficie de cierre o cubierta está situada sobre la parte superior del sustrato base para encerrar o sellar de otro modo los pasajes o canales microfluídicos. En el contexto de la presente invención, los canales o pasajes están cubiertos con un sustrato acorde con la presente invención, la superficie del cual está impresa molecularmente, que cubre los pasajes o canales en el sustrato base. Se puede usar una cubierta impresa con tensioactivo para mejorar el flujo del líquido a través de los pasajes y canales microfluídicos.

Tales dispositivos incluyen típicamente medios detectores ópticos posicionados adyacentes a una ventana de detector, por lo cual el detector detecta la presencia o ausencia de una característica óptica desde dentro del pasaje o canal microfluídico que resulta del flujo de la muestra líquida a través del pasaje o canal. El detector óptico puede comprender cualquiera de diversos medios detectores, tales como sistemas de detección fluorescente, colorimétrico o de vídeo, que incluyen una fuente de luz de excitación (láser o LED), etc. Se pueden emplear diversas marcas ópticamente detectables para proporcionar una característica ópticamente detectable, tales como marcas coloreadas, marcas de coloides, marcas fluorescentes, características espectrales y marcas quimioluminiscentes.

Como se discutió anteriormente, una alternativa a tener que asegurar de otro modo que los canales poseen suficiente hidrofiliidad para causar que la muestra fluida viaje a lo largo del tubo capilar, es que la parte superior del canal esté cubierta con un material hidrófilo que ha sido impreso molecularmente con un tensioactivo de acuerdo con la presente invención. Esto es, se puede aplicar una película polimérica sellable por calor que tiene características superficiales hidrófilas sobre la cavidad abierta del canal, tanto para cerrar el canal como para proporcionar el carácter hidrófilo necesario, de tal modo que se causará que la muestra fluida humedezca el canal. Como alternativa, la película polimérica puede incluir un revestimiento adhesivo sensible a la presión que es también de carácter hidrófilo para proporcionar la hidrofiliidad necesaria para causar que la muestra fluida humedezca el canal estando impresa molecularmente con un tensioactivo. El uso de tales materiales en la construcción del dispositivo de diagnóstico microfluídico también sirve para simplificar la fabricación del dispositivo. En el contexto de la presente invención, la superficie frontal entera de la capa de cobertura no necesita ser hidrófila; en lugar de eso, sólo se requiere que sea hidrófila la porción de la capa de cobertura que sirve para cerrar los canales o pasajes microfluídicos. Por supuesto, como es el caso con los dispositivos de flujo lateral, ciertas partes de la capa de cobertura que cierran los canales o pasajes microfluídicos pueden ser hechas menos hidrófilas que otras partes para modificar la velocidad de flujo de la muestra fluida.

Un dispositivo microfluídico típico que ha sido preparado de acuerdo con la presente invención se representa en las Figuras 7 y 8. El dispositivo de la Figura 7 incluye la porción 45 base, el hueco 47 en la parte superior de la base 45, canales 49 microfluídicos abiertos, reservorios 51 de fluido y ventana 53 de visión. En el dispositivo de la Figura 7, los canales 49 microfluídicos están sin cubrir, a fin de representar el interior del dispositivo. En la vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 16 (en la Figura 8), la porción 45 base incluye un canal 49 microfluídico que se muestra estando cerrado por la porción 55 de cobertura. La porción 55 de cobertura incluye una superficie 57 frontal impresa molecularmente, por lo cual la muestra fluida que entra en el canal 49 microfluídico contactará con la superficie frontal y causará que la muestra sea transportada a lo largo de la longitud del canal. La superficie 57 frontal de la cubierta 55 puede ser hecha hidrófila de acuerdo con la presente invención, tal como por la presencia de un adhesivo sensible a la presión hidrófilo, haciendo a la superficie de la propia cubierta hidrófila por impresión molecular. Por ejemplo, la cubierta 55 puede ser sellada por calor o unida de manera adhesiva a la parte interior de la base 45.

A modo de una realización alternativa representada en las Figuras 9 y 10, el dispositivo de diagnóstico in vitro microfluídico puede estar comprendido de capas 69, 75 base opuestas, separadas por una capa 71 espaciadora adhesiva. Aunque sólo se muestra una única capa base en la Figura 9 para representar los canales 73 de fluido, se muestran ambas bases en la Figura 10. La capa 71 espaciadora puede tener canales 73 de fluido provistos en la misma, dentro de los cuales un fluido a ser ensayado pasa desde un reservorio hasta un punto de recogida. Al menos una parte de las superficies de las capas 69, 75 base y la capa espaciadora que definen los límites de los canales de fluido pueden ser impresas molecularmente.

La capa 71 espaciadora es preferiblemente una capa adhesiva que está unida a las capas base opuestas, bien como resultado de propiedades adhesivas sensibles a la presión de la capa espaciadora o bien como resultado de ser sellada por calor a cada una de las capas base. Si es sensible a la presión, la capa espaciadora se puede usar en la forma de una película de transferencia o como una construcción de doble cara. Como se discutió anteriormente, si las capas base no son de carácter hidrófilo, la capa espaciadora puede poseer el carácter hidrófilo requerido para ayudar al humedecimiento del canal de fluidos por la muestra fluida. Los canales 73 de fluido en la capa espaciadora pueden ser troquelados en la capa espaciadora o ser provistos por cualesquiera otros medios eficaces para proporcionar una capa espaciadora con los canales de fluidos requeridos. Una ventaja de tal construcción es que el dispositivo microfluídico puede ser construido fácilmente, sin necesidad de moldear los canales de fluido en las capas base como en la realización de la Figura 7.

Las microplacas de la presente invención incluyen diversas realizaciones, tales como la microplaca que contiene micropocillos mostrada en las Figuras 11 y 12. Como se muestra en las Figuras, la microplaca incluye una porción 61 base dentro de la cual están formados una multitud de micropocillos 63. Los micropocillos 63 pueden ser de cualquier configuración adecuada, tal como hexagonal o cilíndrica, como se representa. La Figura 11 representa la presencia de una placa o lámina 65 de cobertura en la parte superior de la porción 61 base para sellar los micropocillos. La placa o lámina de cobertura puede comprender una película sellable por calor impresa molecularmente, o puede tener propiedades sensibles a la presión. Como se representa en la Figura 11, un material adecuado, tal como un sustrato liofilizado, etc. puede estar unido, según se desee, a la superficie interna de la placa o lámina de cobertura en el caso de que la superficie interna de la placa o lámina exhiba propiedades adhesivas sensibles a la presión, o mediante el uso de otros medios adhesivos. En el contexto de la presente invención, la placa o lámina de cobertura, al menos en la superficie interna de la misma que cubre los micropocillos, está impresa molecularmente. Tales propiedades pueden ser proporcionadas por el uso de un adhesivo sensible a la presión, o por el uso de una película sellable por calor de la manera mostrada anteriormente.

Una realización alternativa de la microplaca se muestra en las Figuras 13 y 14, que comprende una microplaca de pocillos abiertos que tiene una porción 77 base que contiene una pluralidad de microorificios 79 cortados o moldeados en la misma y que pasan completamente a través de la porción 77 base. La porción 77 base estaría provista de placas o capas de cobertura frontales a fin de sellar los respectivos microorificios 79 de tal modo que las muestras líquidas respectivas puedan ser colocadas en la misma. Cualquiera o ambas de la porción base o las porciones de cobertura (no mostrado) adyacentes a los orificios pueden ser impresas molecularmente. Las placas o capas de cobertura pueden ser unidas a la placa base por medios adhesivos adecuados, tales como adhesivos sensibles a la presión o propiedades adhesivas sellables por calor de las placas o capas de cobertura.

La presente invención puede emplear una multitud de películas poliméricas que pueden ser impresas molecularmente para proporcionar propiedades deseadas. Los polímeros que pueden ser modificados de esta manera son bien conocidos en la técnica. Son ejemplares de tales polímeros los siguientes polímeros: poliolefinas, que incluyen, pero no se limitan a, polietileno, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilideno), poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), poli(metacrilato de metilo), poli(acrilato de etilo), poli(acrilamida), poli(acrilonitrilo), polipropileno, poli(1-buteno), poli(2-buteno), poli(1-penteno), poli(2-penteno), poli(3-metil-1-penteno), poli(4-metil-1-penteno), 1,2-poli-1,3-butadieno, 1,4-poli-1,3-butadieno, poliisopreno, policloropreno, copolímero de etileno-acetato de vinilo, policarbonato, copolímero de etileno-acrilato de isobutilo, así como copolímeros aleatorios o de bloques de dos o más poliolefinas o una poliolefina y una no olefina. De manera similar, también se pueden emplear mezclas de dos o más polímeros.

El polímero también puede comprender un poliéster tal como poli(tereftalato de etileno), poli(isoftalato-tereftalato de etileno), copolímeros de poli(tereftalato de 1,4-ciclohexanodimetileno), poli(isoftalato de 1,4-ciclohexanodimetileno), y copolímeros de isoftalato-tereftalato; poli(tereftalato e isoftalato de 1,4-fenileno) y copolímeros; poli(dicarboxilato de (1,4-fenilen-4,4'-difenilo)); poliésteres derivados de ácidos dibásicos alifáticos, tales como ácidos maleico, adípico y sebácico, y compuestos polihidroxilados tales como polietilenglicol, neopentilglicol, butilenglicol, glicerol, pentaeritritol y celulosa. Preferiblemente, los polímeros formadores de película usados en la presente invención exhiben una Tg o Tc suficiente para permitir que el polímero sea formador de película, así como para permitir que la película de polímero resultante sea sellable por calor a una temperatura suficientemente baja (p. ej. en el intervalo de entre 70 y 100°C).

Se pueden usar diversos tensioactivos para imprimir molecularmente el polímero. Los tensioactivos que son adecuados para el uso en la presente invención incluyen cualquier tensioactivo que comunique de manera eficaz propiedades superficiales hidrófilas a la película de polímero hidrófoba. Aunque la identidad de tales tensioactivos no es crítica para la práctica de la presente invención, se prefieren los tensioactivos aniónicos. Sin embargo, los ejemplos de tales tensioactivos (sin limitación) son sales de amonio o sales de sodio de alquilfenoxi(poli-etilenoxi)etanol, perfluoroalquilsulfonatos de amonio, etc. Los tensioactivos ejemplares incluyen preferiblemente una o más funcionalidades hidroxilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico y amina. Está presente una discusión detallada de tensioactivos en Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technologies, 2ª Edición, Vol. 19, páginas 512-564, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

El tensioactivo puede ser mezclado en una cantidad de, por ejemplo, hasta aproximadamente 15% en peso, basado en el peso total del polímero y el tensioactivo, tal como en una cantidad de entre 0,05 y 15% en peso.

Preferiblemente, el tensioactivo se mezcla con el polímero en una cantidad en el intervalo de entre aproximadamente 3 y 6% en peso.

Es por tanto evidente que se puede usar con ventaja un adhesivo impreso molecularmente en los dispositivos descritos anteriormente, proporcionando una superficie que incluye, por ejemplo, un tensioactivo impreso molecularmente para proporcionar propiedades superficiales hidrófilas mejoradas, una superficie adhesiva impresa molecularmente que está impresa para recoger un(os) interferente(s) específico(s) de un líquido a ser analizado, o una superficie adhesiva impresa molecularmente para recoger un(os) componente(s) específico(s) para los cuales se va a hacer un análisis. Ventajosamente, las propiedades impresas molecularmente de la capa adhesiva pueden ser adaptadas fácilmente para cumplir el resultado final deseado consistente con los objetos de la presente invención. Las Figuras 15-17 demuestran las ventajas de la presente invención a este respecto.

La Figura 15 es una representación gráfica del efecto sobre determinada concentración de glucosa usando un MIP impreso para ácido úrico y ácido ascórbico. La Figura 16 es una representación gráfica del efecto sobre determinada concentración de glucosa usando 5% en peso de MIPs impresos para ácido úrico y ácido ascórbico en la masa de un adhesivo sensible a la presión. La Figura 17 es una representación gráfica del efecto sobre determinada concentración de glucosa usando 5% en peso de MIPs impresos para ácido úrico y ácido ascórbico en la superficie de un adhesivo sensible a la presión.

Con respecto a la realización de la "masa", la concentración de MIP es 5% en la masa del adhesivo. Se mezcla 5% en peso del MIP para sólidos adhesivos en la disolución de adhesivo antes de revestir el adhesivo sobre una película de soporte.

Con respecto a la realización de la "superficie", la concentración de MIP es 5% en la superficie del adhesivo, suspendiendo 5% en peso de MIP para sólidos adhesivos en un disolvente y revistiendo la suspensión sobre una película desprendible. La disolución adhesiva es revestida sobre una película de soporte, y después del secado y curado, la película adhesiva es laminada sobre la superficie del forro revestido con MIP. Alternativamente, el adhesivo se puede revestir directamente sobre la parte superior del forro revestido con MIP. Alternativamente, la suspensión de MIP se puede revestir o pulverizar directamente sobre la parte superior del revestimiento adhesivo.

Los resultados de las Figuras 15-17 confirman que la retirada de ácido úrico y/o ácido ascórbico de un fluido a ser analizado en cuanto a la glucosa permite que la sensibilidad del análisis de la glucosa sea mejorada significativamente.

Por ejemplo, la Figura 15 demuestra que la eficacia de la determinación de la glucosa aumenta de 92,7% para el ensayo de control (sin MIP) a 98% para un MIP impreso con ácido úrico, y a 99,3% para un MIP impreso con ácido ascórbico.

La Figura 16 demuestra que la eficacia de la determinación de la glucosa aumenta de 96% para el ensayo de control (sin MIP) a 97,1% para un MIP impreso con ácido úrico, y a 98,7% para un MIP impreso con ácido ascórbico.

La Figura 17 demuestra que la eficacia de la determinación de la glucosa aumenta de 96,5% para el ensayo de control (sin MIP) a 98,1% para un MIP impreso con ácido úrico, y a 99,1% para un MIP impreso con ácido ascórbico.

Es por consiguiente una ventaja de la práctica de la presente invención proporcionar un método para el análisis de una muestra líquida por el cual se puede conseguir una eficacia de análisis aumentada significativamente mediante el uso de un polímero impreso molecularmente que ha sido impreso con un interferente presente en la muestra líquida para llevar a cabo el análisis.

A modo de explicación adicional de las Figuras 15-17, se preparó una disolución patrón acuosa que contenía 150 mg/dl de glucosa, 10 mg/dl de ácido úrico y 10 mg/dl de ácido ascórbico. La glucosa se ensaya según el método descrito en el Ejemplo 4 usando el kit de glucosa Glucose G2 Autokit de WAKO Chemicals USA, Inc. Haciendo referencia a la Figura 15, se mezclaron 5 gramos de polímero no impreso (control) durante 1 minuto con 100 gramos de la disolución patrón. Se tomó una alícuota de 0,2 ml de muestra de la mezcla y se analizó para la glucosa. Se encontró un valor de 139 mg/dl de glucosa, lo que indica que la presencia de ácido úrico y ácido ascórbico reduce la precisión de la medida de la glucosa. Cuando este experimento se repitió usando un MIP impreso con ácido úrico, se midió un valor de glucosa de 147 mg/dl. De manera similar, el experimento se repitió usando un MIP impreso con ácido ascórbico y se midió un valor de glucosa de 149 mg/dl. Estos resultados indican que los MIPs para ácido úrico y ácido ascórbico reducen el efecto de los compuestos interferentes y aumentan la exactitud de la medida de la glucosa.

Haciendo referencia a la Figura 16, se creó un canal fluido tubular usando un revestimiento adhesivo que contenía 5% de polímero no impreso en la masa del adhesivo (control). Se hizo pasar un ml de la disolución patrón anterior a través del adhesivo, y después se recogió para el análisis de la glucosa según el Glucose G2 Autokit. Se midió un valor de glucosa de 144,1 mg/dl en el fluido eluido. Este experimento se repitió usando un adhesivo que contenía 5% de MIP impreso con ácido úrico en la masa del adhesivo. Se midió un valor de glucosa de 145,7 mg/dl. De manera similar, el experimento se repitió usando un adhesivo que contenía 5% de MIP impreso con ácido ascórbico en la masa del adhesivo. Se midió un valor de glucosa de 148,0 mg/dl. Estos resultados muestran que los adhesivos que

contienen MIPs para ácido úrico y ácido ascórbico usados como canales fluídicos aumentan la exactitud de la medida de la glucosa.

- 5 Haciendo referencia a la Figura 17, similar a los experimentos para la Figura 16, se crearon canales fluídicos tubulares usando adhesivos que contenían 5% de polímeros impresos en la superficie del adhesivo. La concentración de glucosa en un control con un polímero no impreso en la superficie del adhesivo fue 144,7 mg/dl. Usar el MIP impreso con ácido úrico en la superficie del adhesivo dio una concentración de glucosa de 147,1 mg/dl. El MIP impreso con ácido ascórbico en la superficie del adhesivo dio una concentración de glucosa de 148,6 mg/dl. Estos resultados ilustran el aumento en la exactitud de la medida de la glucosa usando adhesivos que contienen MIPs impresos para retirar componentes interferentes. El polímero impreso molecularmente puede estar en la masa del adhesivo o en la superficie. Se espera que la combinación de dos o más MIPs en un adhesivo para retirar compuestos interferentes múltiples proporcionaría ventajas en muchos ensayos.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un adhesivo que comprende al menos un polímero reticulado impreso molecularmente.
2. Un adhesivo de la reivindicación 1, que comprende múltiples polímeros impresos molecularmente.
3. Un adhesivo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que un polímero impreso molecularmente contiene sitios de impresión para uno o más compuestos diana.
4. Un adhesivo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho adhesivo es un adhesivo sensible a la presión.
5. Un adhesivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho adhesivo es un adhesivo de sellado por calor.
6. Un adhesivo de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polímero está impreso con un tensioactivo.
7. Un adhesivo de la reivindicación 1, en el que dicho polímero está impreso con un componente contenido por la sangre.
8. Un adhesivo de la reivindicación 7, en el que dicho polímero está impreso con al menos uno de ácido úrico, acetaminofeno o ácido ascórbico.
9. Un adhesivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho polímero está impreso con ácido úrico y/o ácido ascórbico.
10. Un adhesivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho polímero está impreso con glucosa.
11. Un adhesivo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polímero impreso molecularmente está presente en dicho adhesivo en la forma de un polvo como mezcla con el mismo.
12. Un adhesivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho polímero impreso molecularmente está presente en una superficie de dicho adhesivo.
13. Un método para preparar un adhesivo como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende las etapas de proporcionar los monómeros polimerizables requeridos para formar el polímero deseado que es para ser impreso molecularmente, combinar dichos monómeros polimerizables con un componente adaptado para imprimir dicho polímero y que es compatible con dichos monómeros, copolimerizar y reticular dichos monómeros polimerizables para formar un polímero impreso en mezcla con dicho componente adaptado para imprimir dicho polímero, y combinar dicho polímero reticulado impreso molecularmente con un adhesivo.
14. Un dispositivo de diagnóstico in vitro de flujo lateral que comprende una carcasa, medios en la carcasa para introducir una muestra a ser ensayada en dicho dispositivo, medios en dicha carcasa para la recogida de fluidos, y una tira de soporte que tiene separados por un espacio un primer y segundo extremos, en donde dicha tira de soporte está comprendida de un adhesivo como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. Un dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 14, que comprende además una membrana microporosa o porosa unida a dicha tira de soporte entre dichos primer y segundo extremos.
16. Un dispositivo de diagnóstico in vitro microfluídico comprendido de una base que tiene al menos un canal de fluidos dentro del cual una muestra fluida a ser ensayada pasa desde un orificio de entrada hasta una zona de detección, en el que dicho al menos un canal de fluidos está encerrado por al menos una superficie de cierre, en donde al menos una superficie del canal de fluidos está comprendida de un adhesivo que comprende un polímero reticulado impreso molecularmente.
17. Un dispositivo microfluídico de la reivindicación 16, en el que dicha al menos una superficie de cierre está sellada por calor a dicha base para sellar dicho al menos un canal de fluidos.
18. Un dispositivo microfluídico de la reivindicación 16, en el que la superficie de dicha al menos una superficie de cierre que se enfrenta a dicho al menos un canal de fluidos exhibe propiedades adhesivas sensibles a la presión.
19. Un dispositivo microfluídico de la reivindicación 17, en el que la superficie de dicha al menos una superficie de cierre que se enfrenta a dicho al menos un canal de fluidos está impresa molecularmente con un tensioactivo.
20. Un dispositivo microfluídico de la reivindicación 17, en el que dichos canales de fluidos están troquelados en dicha capa adhesiva.
21. Un dispositivo de diagnóstico in vitro comprendido de una microplaca que tiene una placa base que tiene formados en la misma una multitud de microorificios o cavidades y al menos una cubierta colocada en relación de sellado para dichos microorificios o cavidades, en donde una superficie de al menos dicha cubierta que sella dichos

microorificios o cavidades está comprendida de un adhesivo que comprende un polímero reticulado impreso molecularmente.

22. Un dispositivo de diagnóstico de la reivindicación 21, en el que dicha al menos una parte de cubierta está sellada por calor a dicha base para sellar dichos microorificios o cavidades.

5 23. Un dispositivo de diagnóstico de la reivindicación 21, en el que la superficie de dicha al menos una cubierta que se enfrenta a dichos microorificios o cavidades exhibe propiedades adhesivas sensibles a la presión.

24. Un dispositivo de diagnóstico de la reivindicación 21, en el que la superficie de dicha al menos una cubierta que se enfrenta a dichos microorificios o cavidades está impresa molecularmente con un tensioactivo.

10 25. Un método para realizar un análisis de una muestra líquida que contiene un componente a ser analizado en cuanto a identidad y/o cantidad, que comprende poner en contacto dicha muestra líquida con un adhesivo que comprende un polímero reticulado que ha sido impreso con dicho componente, y realizar dicho análisis en base a la cantidad de dicho componente absorbida por dicho polímero que ha sido previamente impreso con dicho componente.

15 26. Un método de la reivindicación 25, en el que dicho polímero es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.

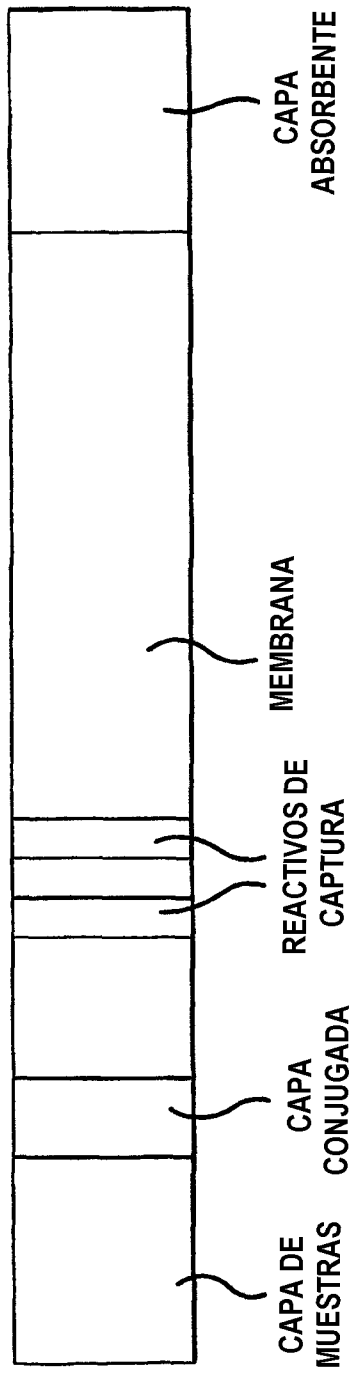


FIG.1A

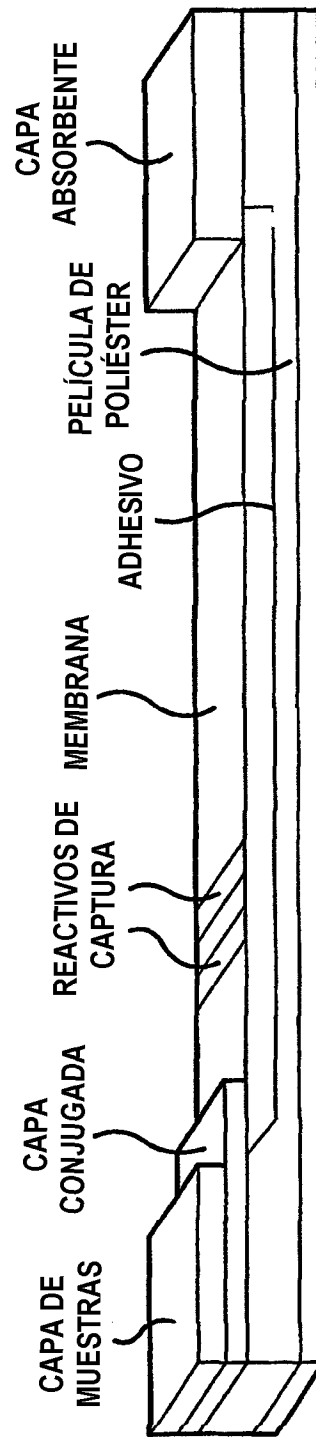


FIG.1B

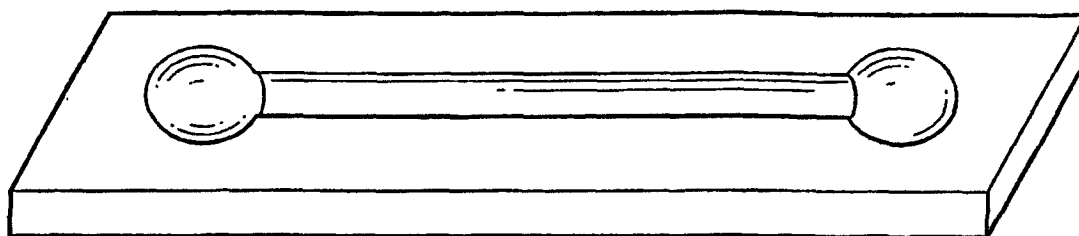


FIG. 2

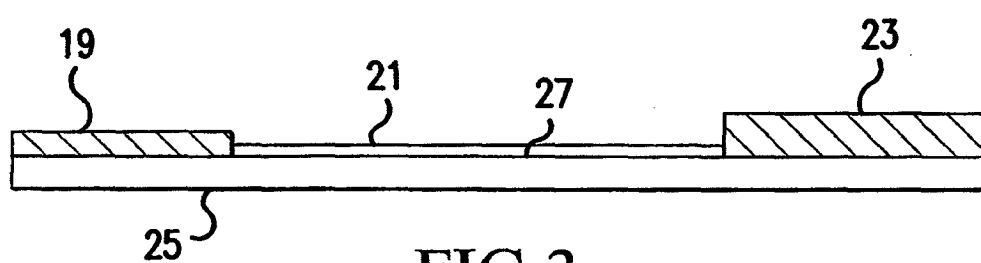


FIG. 3

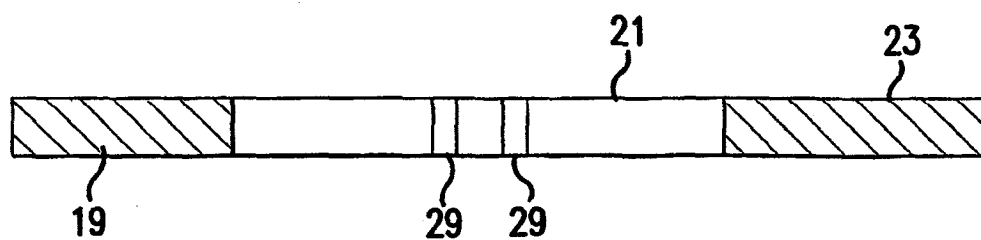


FIG. 4

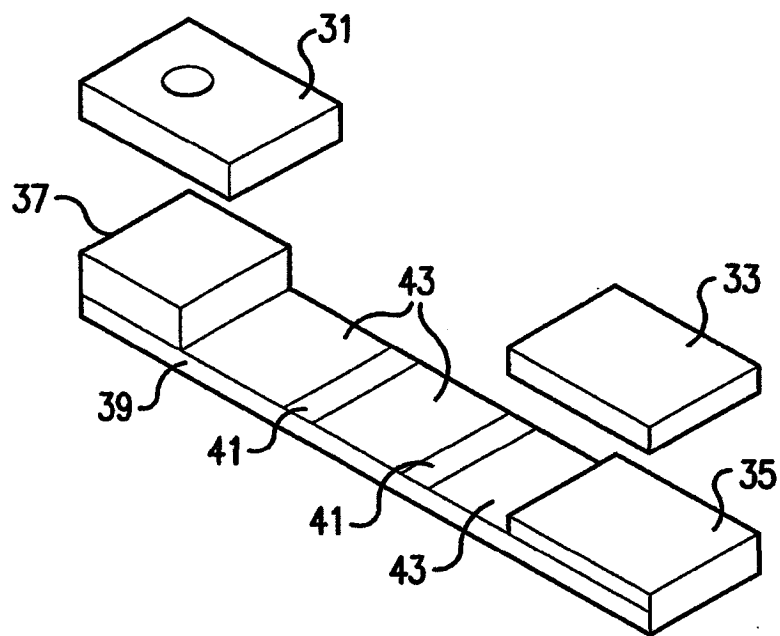


FIG. 5

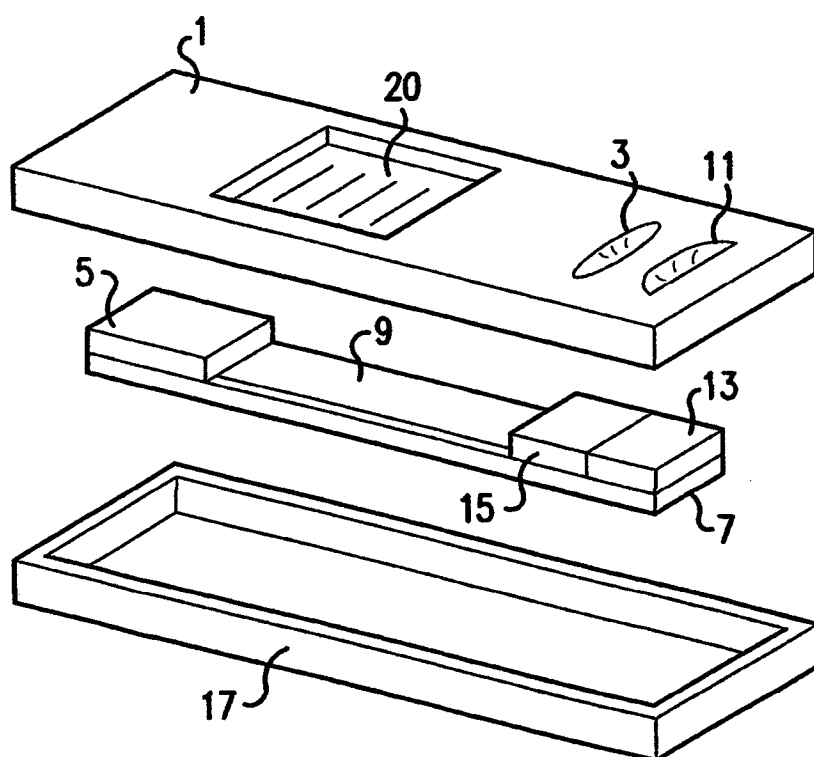


FIG. 6

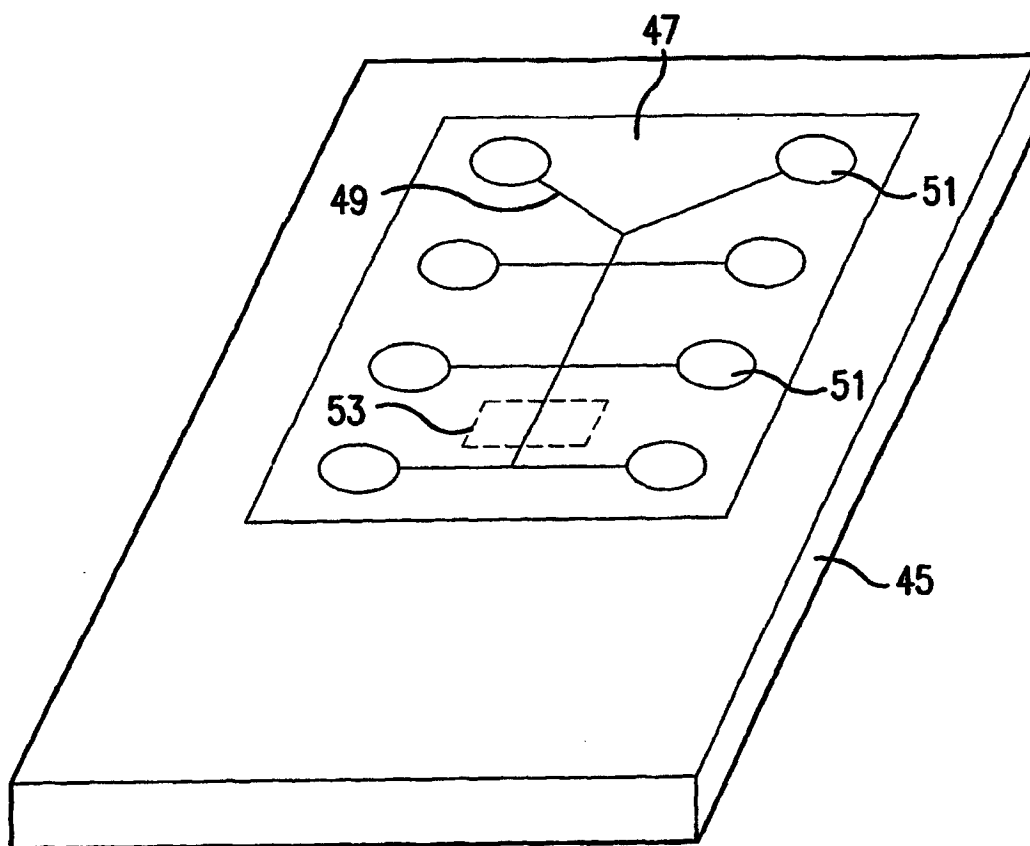


FIG. 7

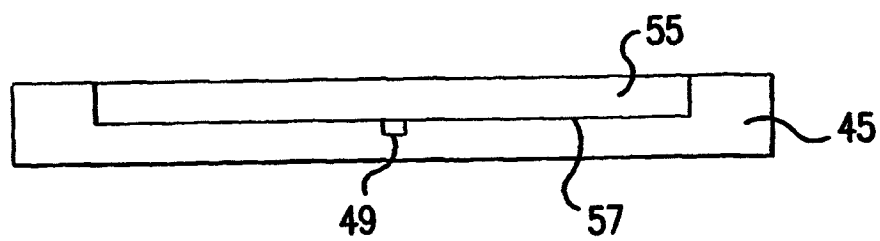


FIG. 8

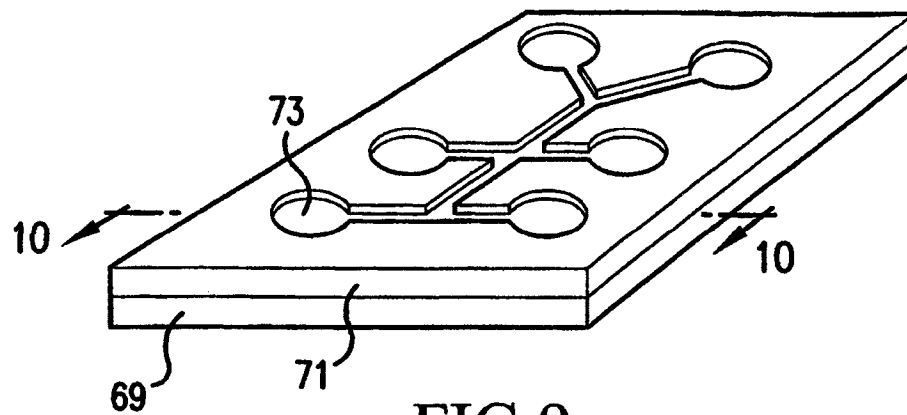


FIG. 9

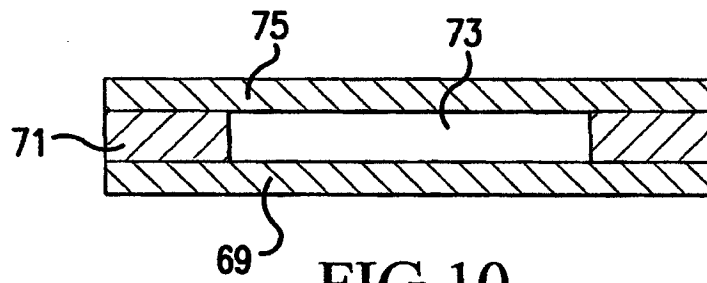


FIG. 10

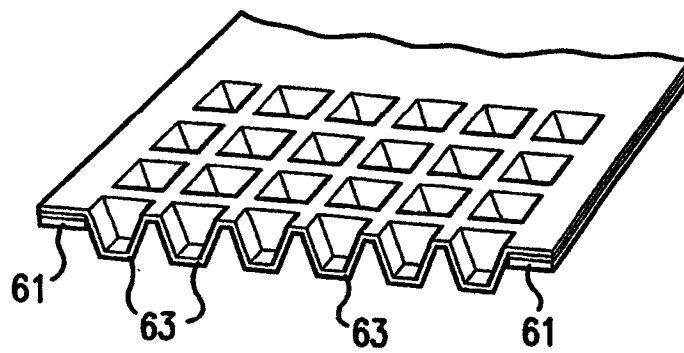


FIG. 11

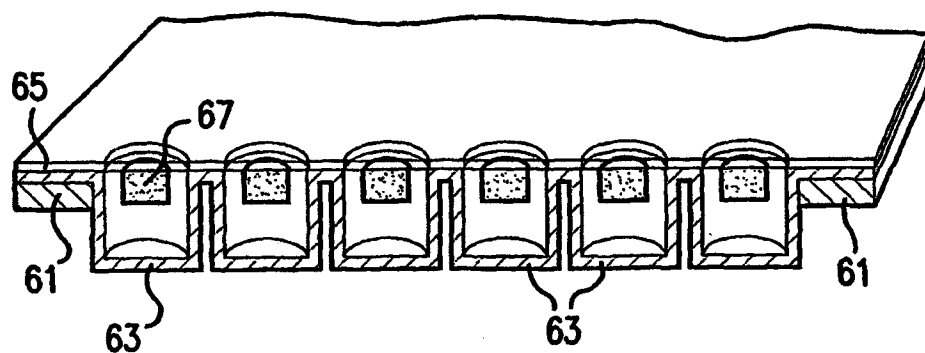


FIG. 12

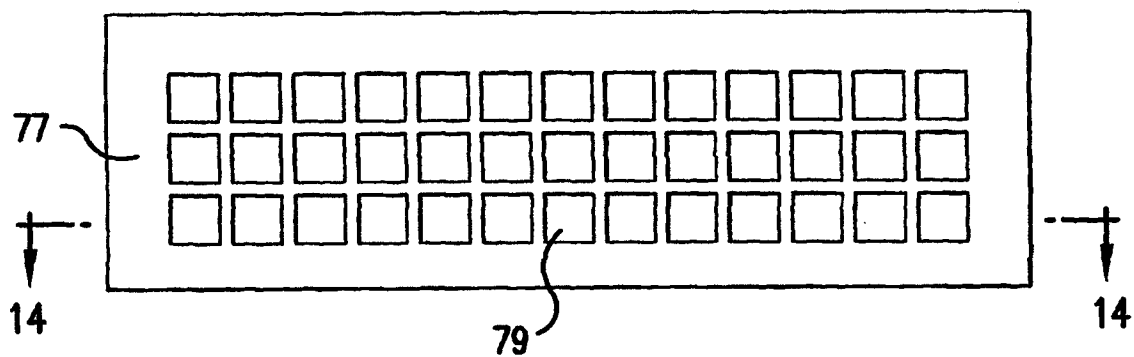


FIG. 13

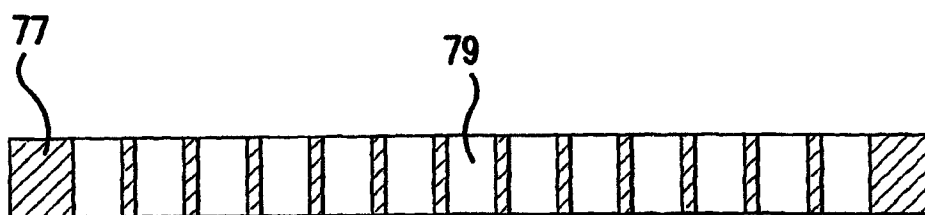


FIG. 14

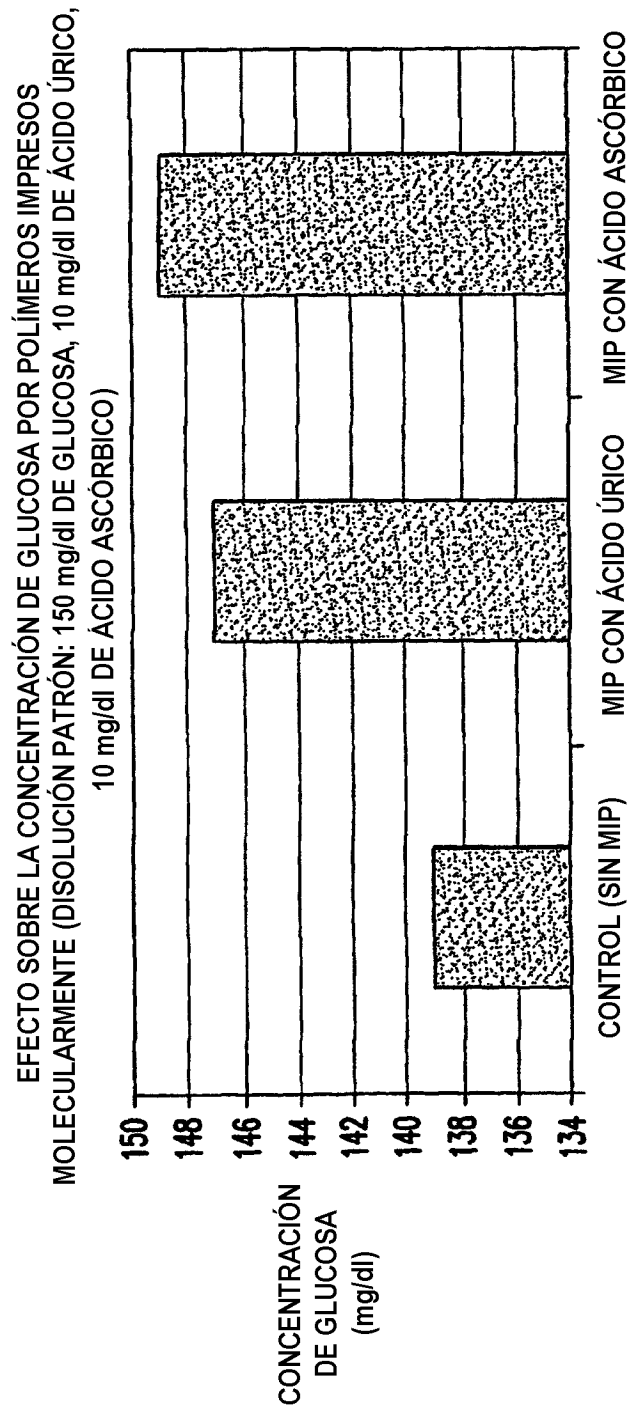


FIG.15

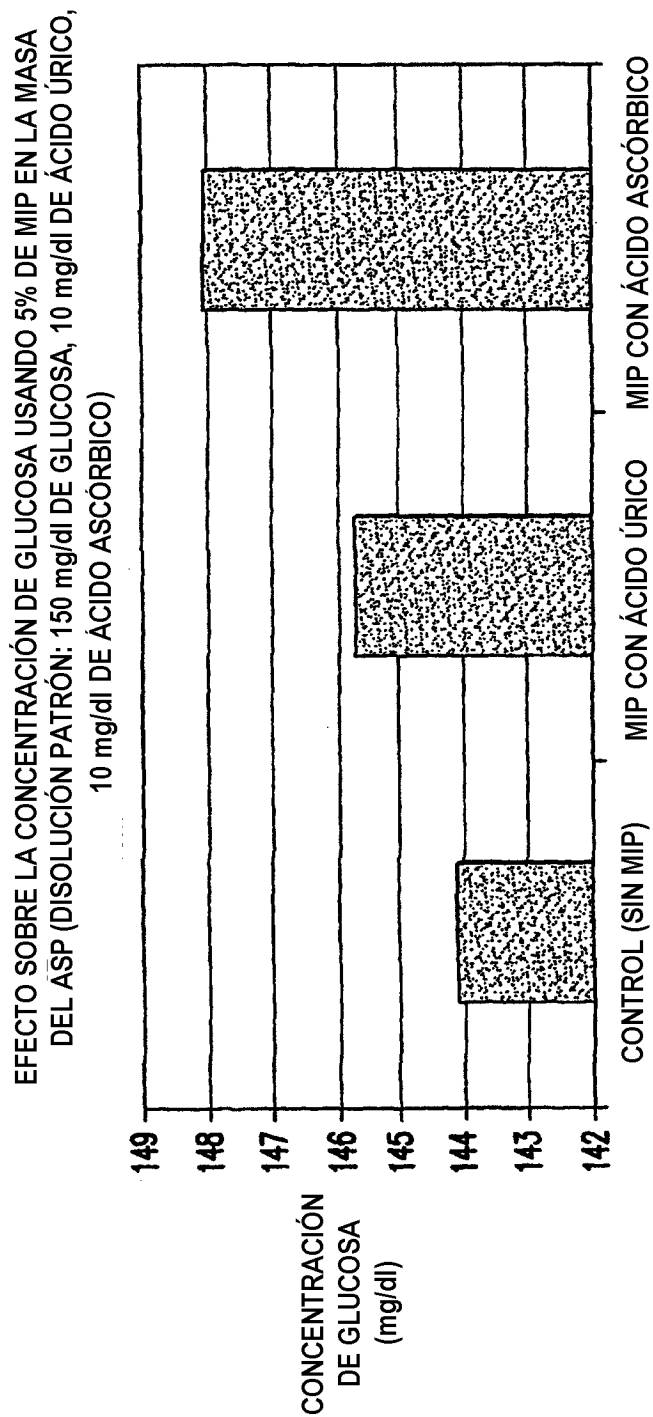


FIG.16

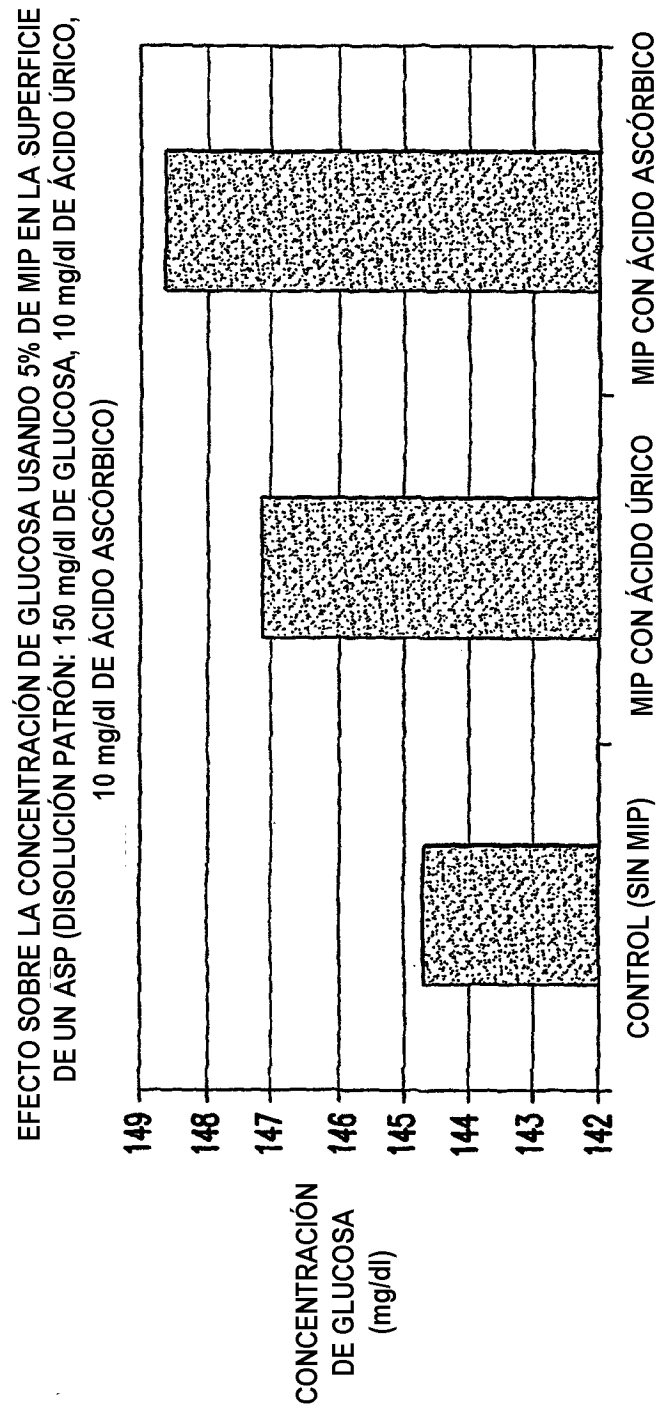


FIG.17