

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 952**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C08G 77/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011** **E 11757267 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 2616810**

54 Título: **Preparación de un elemento de reconocimiento molecular**

30 Prioridad:

16.09.2010 EP 10177028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2014

73 Titular/es:

**FACHHOCHSCHULE NORDWESTSCHWEIZ
HOCHSCHULE FÜR LIFE SCIENCES (100.0%)
Gründenstrasse 40
4132 Muttenz, CH**

72 Inventor/es:

**SHAHGALDIAN, PATRICK;
CUMBO, ALESSANDRO y
CORVINI, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 509 952 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

Preparación de un elemento de reconocimiento molecular

Campo técnico

5 La presente invención hace referencia a un método conforme al preámbulo de la reivindicación independiente 1. Dicho método comprende unir una plantilla a una superficie del material portador, proveer un material de reconocimiento a la superficie del material portador, iniciar la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador, detener la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador y liberar la plantilla de la superficie del material portador y la polimerización del material de reconocimiento se pueden utilizar para la preparación de un elemento molecular de reconocimiento útil como un fármaco, catalizador, inhibidor del ligando de afinidad competitivo, competidor, agonista, antagonista o agente de diagnóstico.

Antecedentes de la técnica

15 El reconocimiento molecular es un pilar de la ciencia biomolecular moderna debido a su participación ubicua en los procesos bioquímicos. Entre la gran variedad de receptores sintéticos desarrollados para imitar los sistemas naturales y utilizados por sus capacidades de reconocimiento molecular, los materiales orgánicos de impronta molecular atraen mayor interés debido a su versatilidad y posibilidades casi ilimitadas. La impronta molecular es una técnica para sintetizar polímeros (polímeros de impronta molecular (MIP)) mediante el uso de una plantilla (p. ej., polipéptidos, proteínas, bacterias o compuestos de bajo peso molecular) con sitios de unión específicos, a través de los cuales los monómeros se polimerizan en presencia de la plantilla. Entonces el polímero sintetizado presenta propiedades de reconocimiento molecular para una diana complementaria a la plantilla. Los MIP adoptan una estructura que contiene improntas de reconocimiento (improntas) donde las funciones de unión capaces de interacciones químicas con la diana están específicamente orientadas por la interacción con la plantilla. Al lavarse la plantilla, se conservan las funciones de unión por impronta. Se ha demostrado que los MIP obtenidos de esta manera presentan propiedades mejoradas de reconocimiento molecular para la diana y, por lo tanto, sirven como un material o elemento de reconocimiento polimerizado.

25 La impronta molecular ha sido descrita, por ejemplo, por Wulff *et ál*, pero su desarrollo se dificultó en la primeras instancias debido a tediosos protocolos experimentales (Wulff *et ál*; Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1972, 11, 341). Las mejoras y optimizaciones han llevado a sistemas aplicables más desarrollados compatibles con las aplicaciones comerciales. Se conocen dos enfoques de impronta diferentes en la técnica: el primero consiste en injertar de manera covalente una diana en los bloques que forman polímeros tal como los monómeros, mientras que el segundo enfoque está basado en las interacciones no covalentes de una plantilla con los monómeros.

30 La solicitud PCT WO 01/19886 describe la formación de un polímero de impronta molecular al proveer un material portador y un material de reconocimiento mezclado con moléculas plantilla, iniciar la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del portador en presencia de la plantilla, detener la reacción de polimerización y liberar la plantilla de la superficie y el material de reconocimiento, cuando el iniciador de la polimerización está presente únicamente en la superficie del portador.

35 Una limitación principal de los métodos que se describen en la técnica es una disponibilidad limitada de las funciones de unión de un material de reconocimiento polimerizado. En efecto, la polimerización en masa de los monómeros en torno a una plantilla provoca una formación de las funciones de unión dentro de un polímero formado de esa manera por lo que restringe una aplicación a las moléculas diana que pueden propagarse dentro de un polímero (limitación de tamaño y solubilidad) y a dianas económicas.

40 Se han propuesto diferentes enfoques para eludir esta limitación que incluye la creación de improntas únicamente en la superficie de un polímero que, por lo tanto, forma un material de reconocimiento polimerizado. Un enfoque es explorado basándose en el crecimiento de una capa monomolecular en una superficie donde se inmoviliza una plantilla. Luego del crecimiento de la capa monomolecular en la superficie, se quita la plantilla de la superficie y por lo tanto un elemento de reconocimiento molecular formado de esa manera puede ser utilizado para el reconocimiento molecular de una diana. Sin embargo, este enfoque está limitado a moléculas pequeñas debido al espesor limitado (es decir, en un intervalo de 1 a 2 nm) de la capa monomolecular como material de reconocimiento polimerizado del elemento de reconocimiento molecular. Otro enfoque conocido en la técnica es descrito por Shiomí *et ál*. (Biomaterials 2005, 26, 5564-5571) y hace referencia a una preparación de un elemento de reconocimiento molecular para una diana (p. ej., una proteína) mediante la impronta molecular, haciendo uso de una plantilla inmovilizada de forma covalente en una superficie de sílice, sobre la cual se realiza la polimerización del silano a los efectos de generar un material de reconocimiento polimerizado. En este método se ha utilizado hemoglobina (Hb) como proteína plantilla para la creación de improntas específicas de Hb en la superficie de sílice. Sin embargo, este método es muy limitado y no es aplicable a un complejo supramolecular más grande, p. ej., un virus. Además, no permite controlar el grado de afinidad del material de reconocimiento polimerizado del elemento de reconocimiento molecular para su diana.

55 Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de un método que provea un elemento de reconocimiento molecular, en el que sea posible un control y ajuste de especificidad y afinidad para unir las dianas tales como pequeñas dianas

de bajo peso molecular o particularmente las dianas complejas de alto peso molecular con un material de reconocimiento polimerizado del elemento de reconocimiento molecular.

Descripción de la invención

5 Según la invención, esta necesidad es satisfecha con un método de preparación de un elemento de reconocimiento molecular tal como se define en las características de la reivindicación independiente 1. Las realizaciones preferidas están sujetas a las reivindicaciones subordinadas.

10 En particular, la presente invención provee un método para preparar un elemento de reconocimiento molecular que comprende las etapas de unir la plantilla a una superficie de un material portador, proveer un material de reconocimiento a la superficie del material portador que inicia la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador, detener la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador y liberar la plantilla de la superficie del material portador y el material de reconocimiento polimerizado. Además, se predefine un tamaño objetivo de improntas individuales y la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador se detiene cuando un tamaño de improntas individuales del material de reconocimiento polimerizado básicamente iguala el tamaño objetivo predefinido.

15 Como se emplea en esta memoria, el material de reconocimiento se relaciona con un material capaz de una reacción de polimerización cuyo material puede ser proporcionado a la superficie del material portador. Preferiblemente, el material de reconocimiento es un material monomérico que tiene afinidad por una parte de la plantilla y se proporciona en estado líquido. Durante la polimerización, el material de reconocimiento puede autoensamblarse en torno a la plantilla y se incluye en una capa de reconocimiento que crece de la; superficie del material portador en dirección a la plantilla o de la plantilla en dirección a la superficie del material portador o ambos. Luego de polimerizarse, el material de reconocimiento generalmente se encuentra en estado sólido. Al aplicar el método conforme a la invención, el material de reconocimiento polimerizado presenta una estructura que comprende las improntas homogéneas formadas por la plantilla. Dentro de las improntas pueden existir funciones de unión orientadas específicamente por la interacción con la plantilla, las cuales son capaces de interacciones químicas con una diana. Por lo tanto, el material de reconocimiento polimerizado es capaz de ejercer el reconocimiento molecular o biomolecular de dianas tales como complejos supramoleculares, virus, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgánicas, células procariontas, células eucariotas, células vegetales y derivados de ellas. La plantilla se puede seleccionar según la diana en la cual se ha de aplicar el elemento de reconocimiento molecular. Cuando la plantilla o la diana tienen una estructura conocida (p. ej., un virus), se pueden identificar las funciones químicas de una superficie de la plantilla y/o de la diana. En particular, la plantilla puede ser idéntica a la diana, tal como, por ejemplo, el mismo virus que se pretende atrapar con el elemento de reconocimiento molecular puede ser utilizado como plantilla para crear el elemento de reconocimiento molecular.

20 El término "impronta", como se emplea en esta memoria, hace referencia a una cavidad formada por la plantilla durante la polimerización del material de reconocimiento. Particularmente, al liberar la plantilla del material de reconocimiento polimerizado, la impronta es formada en el material de reconocimiento polimerizado complementario de una diana. En la impronta pueden existir funciones de unión que son capaces de interacciones químicas con la diana y que están específicamente orientadas por la interacción con la plantilla.

25 Una polimerización preferida dentro del método inventivo se puede basar en una policondensación de precursores de sílice tales como trialcóxisilano y tetraalcóxisilano en condiciones acuosas. Una polimerización alternativa posible puede ser la polimerización radical mediante el uso de iniciadores unidos a la superficie o solubles, monómeros insaturados solubles en agua o agentes reticulantes solubles en agua. Además, se puede realizar la detención de la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador mediante la detención activa de la reacción de polimerización o mediante la autodetención de la reacción de polimerización.

30 El método según la invención hace posible la producción de todas las funciones de unión dentro de las improntas que son completamente accesibles por la diana y que en particular no están limitadas por una velocidad de propagación de la diana dentro del material de reconocimiento polimerizado. Además, hace posible el ajuste preciso del tamaño de las improntas y, por lo tanto, el suministro de una cantidad predefinida de funciones de unión por impronta. Por lo tanto, la afinidad y la especificidad del elemento de reconocimiento molecular para la diana pueden ser controladas y ajustadas en función de la aplicación prevista del elemento de reconocimiento molecular. También, la unión de la plantilla únicamente en la superficie del material portador permite una disminución de la cantidad de plantilla necesaria para el proceso de preparación lo cual puede ser una ventaja decisiva en la preparación de elementos de reconocimiento molecular para dianas costosas y/o extrañas tales como, p. ej., los virus.

35 Preferiblemente, predefinir el tamaño objetivo comprende predefinir un espesor objetivo, en donde la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador se detiene cuando el espesor del material de reconocimiento polimerizado básicamente iguala el espesor objetivo predefinido. Al controlar el espesor del material de reconocimiento polimerizado, el tamaño de las improntas individuales y, por lo tanto, la afinidad del material de reconocimiento polimerizado por la diana, puede ser ajustado y optimizado de forma conveniente para una aplicación prevista. Por ejemplo, el aumento del espesor del material de reconocimiento polimerizado puede dar como resultado un aumento de la cantidad de funciones de unión por impronta, las cuales se forman mediante la

plantilla en el material de reconocimiento polimerizado de manera que aumente la selectividad y, por lo tanto, la afinidad específica del material de reconocimiento polimerizado con respecto a la diana.

5 En particular, mediante el control del espesor se puede controlar y ajustar el crecimiento del material de reconocimiento polimerizado en un intervalo de 1 a 500 nm, 1 nm a 450 nm, 1 nm a 400 nm, 1 nm a 350 nm, 1 nm a 300 nm, 1 nm a 250 nm, preferiblemente 1 nm a 200 nm. Dentro de estos intervalos, un nivel de exactitud del crecimiento del material de reconocimiento polimerizado se puede encontrar en un intervalo de 1 a 10 nm, de 1 nm a 5 nm, de 1 nm a 4 nm, de 1 nm a 3 nm, de 1 nm a 2 nm, preferiblemente 1 nm. El espesor puede verificarse mediante el uso de un microscopio tal como el microscopio electrónico de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de sonda de barrido (SPM) o métodos de dispersión de la luz. Por ejemplo, tal como se conoce en la técnica, el SEM es un tipo de microscopio electrónico que: genera imágenes de una superficie de una muestra mediante su escaneo con un haz de electrones de alta energía en un patrón de análisis ráster. Los electrones interactúan con los átomos que conforman la muestra que produce señales que contienen información sobre la topografía de la superficie (p. ej., la topografía del material de reconocimiento polimerizado), la composición y otras propiedades tales como la conductividad eléctrica. El experto en la técnica sabrá cómo llevar a cabo este tipo de microscopía a los efectos del análisis.

10 La detención de la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador cuando un espesor del material de reconocimiento polimerizado básicamente iguala el espesor objetivo predefinido, hace posible un control exacto del tamaño de las improntas individuales y, por lo tanto, de la cantidad de funciones de unión por impronta en el material de reconocimiento polimerizado. De este modo, se pueden ajustar y controlar con precisión la afinidad y la especificidad del elemento de reconocimiento molecular con respecto a su diana. En este contexto, también se puede determinar, de forma preliminar, una cinética de crecimiento del material de reconocimiento polimerizado que comprende el espesor del material de reconocimiento a ser polimerizado en las condiciones dadas. Luego, los resultados de la determinación pueden utilizarse para detener la polimerización después de básicamente igualar el espesor objetivo predefinido del material de reconocimiento polimerizado.

25 Preferiblemente, la definición previa del espesor objetivo comprende predefinir una duración de polimerización objetivo en condiciones dadas y se lleva a cabo la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador en las condiciones dadas y se detiene cuando una duración de la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador básicamente iguala la duración predefinida de la polimerización objetivo. La expresión "condiciones" en este contexto hace referencia a los parámetros de los que depende un crecimiento del material de reconocimiento. En particular, se puede relacionar con la concentración y la composición de los monómeros utilizados en el material de reconocimiento, la temperatura, la presión y/o la humedad de la polimerización.

30 Tal detención de la polimerización del material de reconocimiento hace posible un control exacto del espesor del material de reconocimiento polimerizado, y así del tamaño de las improntas individuales y también de la cantidad de funciones de unión por impronta en el material de reconocimiento polimerizado. De este modo, se pueden ajustar y controlar con precisión la afinidad y la especificidad del elemento de reconocimiento molecular con respecto a su diana. En función del control del espesor objetivo, se puede establecer la cantidad de funciones de unión por impronta en el material de reconocimiento polimerizado, por el que se controlan y ajustan la afinidad y la especificidad del material de reconocimiento polimerizado para su diana. En este contexto, se puede determinar, de forma preliminar, una cinética de crecimiento del material de reconocimiento polimerizado que comprende la duración de la polimerización del material de reconocimiento a ser polimerizado para las condiciones dadas. Luego, los resultados de la determinación pueden utilizarse para detener la polimerización tras básicamente igualar la duración predefinida de la polimerización objetivo.

35 Preferiblemente, la plantilla es un virus o un análogo estructural de un virus y el espesor objetivo se encuentra dentro de un intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 50 % de un diámetro de la plantilla o, de forma opcional, de alrededor de 45 % a alrededor de 50 % de un diámetro de la plantilla o, de forma opcional, de alrededor de 47 % a alrededor de 50 % de un diámetro de la plantilla o, de forma opcional, de alrededor de 48 % a alrededor de 50 % de un diámetro de la plantilla o, de forma opcional, de alrededor de 49 % a alrededor de 50 % de un diámetro de la plantilla. La expresión "análogo estructural de un virus", como se emplea en esta memoria, hace referencia a objetos que presentan una morfología y/o estructura análoga como un virus tal como nanopartículas sintéticas. Preferiblemente, el grado de analogía entre el virus y su análogo puede encontrarse en un intervalo de alrededor de: 90 % a 100 %, preferiblemente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En este contexto en particular, la expresión "alrededor de" hace referencia a que una dimensión es exactamente un diámetro respectivo de un virus o unos nanómetros menos que el diámetro respectivo del virus, tal como alrededor de 1 nm menos, alrededor de 2 nm menos, alrededor de 3 nm menos, alrededor de 4 nm menos o alrededor de 5 nm menos.

40 Dado que los virus tienen una forma más o menos esférica, proveer un material de reconocimiento polimerizado de un espesor de más de la mitad del diámetro del virus podría impedir la liberación de la plantilla del material de reconocimiento polimerizado. Además, aunque proveer un material de reconocimiento polimerizado más bien delgado haría posible una fácil liberación de la plantilla, sólo se generarían improntas con comparablemente menos funciones de unión. Por lo tanto, la creación de una capa de reconocimiento polimerizada con un espesor ligeramente menor a la mitad del diámetro del virus hace posible un suministro conveniente de un elemento de

reconocimiento con una afinidad alta por el virus.

Preferiblemente, la definición previa del tamaño objetivo comprende predefinir una duración de la polimerización objetivo en condiciones dadas en donde se lleva a cabo la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador en las condiciones dadas y se detiene cuando una duración de la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador básicamente iguala la duración predefinida de la polimerización objetivo. Tal detención de la polimerización del material de reconocimiento hace posible un control exacto de la duración de la polimerización y, por lo tanto, el espesor del material de reconocimiento polimerizado, el tamaño de las improntas individuales y también la cantidad de funciones de unión por impronta en el material de reconocimiento polimerizado. De esta manera, la afinidad y la especificidad del elemento de reconocimiento molecular con respecto a su diana pueden controlarse y ajustarse de una manera conveniente. En este contexto, se puede determinar, de forma preliminar, una cinética de crecimiento del material de reconocimiento polimerizado que comprende la duración de la polimerización del material de reconocimiento a ser polimerizado en las condiciones dadas. Los resultados de la determinación pueden utilizarse para detener la polimerización tras básicamente igualar la duración predefinida de la polimerización objetivo.

Preferiblemente, el método según la invención comprende la etapa de activar la superficie del material portador antes de unir la plantilla a la superficie del material portador en donde un medio de enlace se distribuye homogéneamente en la superficie del material portador. En este contexto, la distribución homogénea de los medios de enlace se relaciona con los medios de enlace unidos a la superficie del material portador con espacios iguales entre ellos. La homogeneidad de los sitios de unión presentados por los medios de enlace puede depender de la homogeneidad de la superficie del material portador y/o de la simetría de la plantilla.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "medios de enlace" hace referencia a, p. ej., reactivos reticulantes o agentes reticulantes que contienen extremos reactivos de grupos funcionales específicos (p. ej., aminas primarias, sulfhidrilos, etc) que se unen por un lado a la superficie del material portador y por el otro lado a la plantilla. Los agentes reticulantes pueden ser utilizados para modificar ácidos nucleicos, proteínas, polímeros y superficies sólidas o plantillas sólidas. Por ejemplo, un agente reticulante puede inmovilizarse en una superficie de sílice como un material portador y luego una plantilla puede unirse a un sitio de unión desocupado del agente reticulante. De manera alternativa, el agente reticulante se puede unir, en primer lugar, a la plantilla y luego, el agente reticulante unido por la plantilla, puede unirse a la superficie de sílice con su sitio de unión desocupado. El agente reticulante utilizado en el método según la presente invención puede depender del tipo de material portador a ser utilizado tal como óxidos inorgánicos, tales como óxidos de silicio u óxidos de titanio, compuestos orgánicos, inorgánicos, poliméricos o inorgánicos-orgánicos y material orgánico autoensamblado. Preferiblemente, el agente reticulante puede ser un agente reticulante escindible, es decir, un agente reticulante que sea capaz de escindir su enlace al recibir estímulos externos tales como temperatura, pH, electricidad, luz o un agente reticulante tal como DTSSP (3,3'-Ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]) que puede escindirse, por ejemplo, mediante el uso de: DTT (Ditiotreitol) como un agente reductor. Como un ejemplo no taxativo, una superficie de sílice modificada con amino como un material portador se puede modificar con un reticulante homobifuncional (p. ej., glutaraldehído) y formar así una base de Schiff con el grupo amina en la superficie del material portador. Luego, el grupo aldehído libre remanente puede formar otra base de Schiff con la plantilla y, por lo tanto, la plantilla puede enlazarse a la superficie del material portador. La plantilla puede liberarse en condiciones ácidas, en el caso de una superficie de oro o titán, como material portador, un agente reticulante puede presentar un extremo tiol que hace posible la unión a la superficie respectiva y además un enlace disulfuro intramolecular escindible y puede enlazar la superficie respectiva con la plantilla. Como se emplea en esta memoria, los agentes reticulantes son versátiles y se pueden aplicar a cualquier clase de material portador siempre que presente las funciones químicas adecuadas. Como un ejemplo no taxativo, la siguiente lista enumera los diferentes reticulantes amino reactivos escindibles que modifican el material portador que puede ser utilizado en el método según la presente invención:

- EGS (etilenglicol bis[succinimidilsuccinato]), *escindible con hidroxilamina*
- Sulfo-EGS (bis[sulfosuccinimidilsuccinato] de etilenglicol) *escindible con hidroxilamina*
- BSOOES (bis[2-(succinimidooxicarbonilo)etil]sulfona), *escindible con una base*
- DSP (ditiobis[succinimidilpropionato]), *escindible con un tiol*
- DTSSP (3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]), *escindible con un tiol*
- DTBP (3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo·2 HCl), *escindible con un tiol*
- DST (disuccinimidil tartrato), *escindible con periodato*

Los agentes reticulantes también están disponibles para el reticulado de amina en funciones de sulfhidrilo (tiol).

- Sulfo-LC-SMPT (4-sulfosuccinimidil-6-metil-a-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato)}, *escindible con un tiol*
- SPDP (3-(2-piridilditio)-propionato de N -succinimidilo), *escindible con un tiol*

- LC-SPDP (6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo), *escindible con un tiol*
- SMPT (4-succinimidiloxicarbonil-metil-a-[2-piridilditio]tolueno), *escindible con un tiol*

Los agentes reticulantes también están disponibles para el reticulado de sulfhidrilo en funciones de sulfhidrilo (tiol).

- DRDPB (1,4-Di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido]butano), *escindible con un tiol*
- 5
- DTME (ditio-bismaleimidoetano), *escindible con un tiol*
 - BMDB (1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxi-butano), *escindible con periodato*.

Preferiblemente, el medio de enlace se distribuye homogéneamente en la superficie del material portador a causa de una superficie moldeada del material portador. Particularmente, la superficie moldeada del material portador puede ser complementaria a una forma de la plantilla. La superficie moldeada se puede obtener de varias maneras tal como con la preparación de una superficie que está compuesta de partículas, es decir, nanopartículas, en donde cada partícula tiene un diámetro predefinido. Además, una superficie moldeada se puede obtener mediante la estructuración de la superficie con áreas atrayentes y no atrayentes distribuidas de forma homogénea en la superficie del material portador. Las áreas atrayentes, por ejemplo, presentan una afinidad por un medio de enlace. En cambio, las áreas no atrayentes presentan una afinidad reducida o nula por los medios de enlace y, por lo tanto, el medio de enlace no puede unirse a la superficie del material portador. Dichas superficies estructuradas se pueden obtener mediante técnicas conocidas, p. ej., un enfoque fotolitográfico o impresión de microcontacto.

Preferiblemente, el método según la invención comprende la etapa de proveer bloques de construcción complementarios a la plantilla antes de iniciar la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador.

20 Si la plantilla y/o la diana tienen/tuvieron una estructura conocida (p. ej., un virus), se pueden identificar las funciones químicas de la superficie de la plantilla o la diana. Por lo tanto, la selección de los bloques de construcción utilizados para preparar el material de reconocimiento puede depender de la estructura conocida de la plantilla y/o la diana con el fin de adaptar la afinidad del material de reconocimiento. De manera alternativa, los bloques de construcción también pueden ser suministrados a la plantilla independientemente del material de reconocimiento, p. ej., antes de proveer el material de reconocimiento. Esta etapa permite el autoensamblado de los bloques de construcción en la plantilla y define la especificidad del material de reconocimiento con el fin de poder participar de una unión específica de su plantilla o diana. La elección de los bloques de construcción que pueden ser utilizados en la preparación del material de reconocimiento puede depender de la estructura conocida de la plantilla o la diana con el fin de adaptar la afinidad del material de reconocimiento a su necesidad respectiva. La composición del material de reconocimiento depende de las mezclas de reacción tales como los bloques de construcción estructural (p. ej., tetraetilortosilicato (TEOS)) y/o los bloques de construcción de reconocimiento (p. ej., tetraetilortosilicato (TEOS), 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), n-propiltrietoxisilano (PTES), isobutiltrietoxisilano (IBTES), hidroximetiltrietoxisilano (HTMEOS), benciltrietoxisilano (BTES), ureidopropiltrietoxisilano (UPTES), carboxietilenetoxisilano (CETES)) y la auto preorganización de estos bloques de construcción en torno a la plantilla a través de interacciones de fuerza débil tales como unión de hidrógeno, interacciones electroestáticas, interacciones hidrofóbicas o interacciones de van-der-Waals, apilamiento π - π .

Preferiblemente, el método según la invención comprende las etapas de analizar una estructura de la superficie de la plantilla o la diana antes del suministro de los bloques de construcción y de elegir los bloques de construcción correspondientes a la estructura de la superficie. Esta etapa puede ser útil para permitir una unión específica de la plantilla/diana al material de reconocimiento, en particular si la plantilla y/o diana tienen una estructura conocida como se expuso anteriormente.

Preferiblemente, una superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado enfrentada al material portador se neutraliza antes de liberar la plantilla de la superficie del material portador y el material de reconocimiento polimerizado. Tal neutralización se puede llevar a cabo con el fin de modificar las propiedades químicas de la superficie exterior de manera que disminuya la interacción indefinida de la superficie exterior. Como se emplea en esta memoria, "interacción indefinida" hace referencia a interacciones de fuerza débil que posiblemente ocurran entre la superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado y las moléculas indefinidas que adsorben esta superficie. Estas interacciones de fuerza débil pueden ser enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas o interacciones de van der Waals, apilamiento π - π . Esto hace posible el aumento de la selectividad del elemento de reconocimiento para la diana. Preferiblemente, la neutralización de la superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado comprende una modificación química y/o física y/o bioquímica de la superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado en la superficie del material portador. Dicha neutralización también puede ser útil para disminuir las propiedades de interacción indefinidas de la superficie exterior de las interacciones de fuerza débil del material de reconocimiento polimerizado.

Preferiblemente, la liberación de la plantilla de la superficie del material portador y el material de reconocimiento polimerizado comprende la ruptura de la unión entre la plantilla y el material portador sin afectar la plantilla. Con dicha etapa se permite una liberación moderada de la plantilla y, por lo tanto, la liberación de la plantilla puede volver

- a utilizarse en la preparación de otro elemento de reconocimiento molecular. Esto puede ser particularmente adecuado para materiales de plantilla costosos y/o extraños. Tal liberación moderada de la plantilla puede lograrse mediante la ruptura de la unión entre la plantilla y el material portador que a su vez se puede conseguir mediante el uso de reacciones químicas reversibles tal como la ruptura de una base de Schiff haciendo uso del tratamiento con ácido, la reducción o la oxidación del enlace disulfuro o haciendo uso de agentes reticulantes escindibles, es decir, DTSSP (3,3-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]) escindible, por ejemplo, mediante el uso de DTT (Ditiotreitol) como un agente reductor.
- 5
- Preferiblemente, la unión de la plantilla a la superficie del material portador es un enlace covalente. Un enlace covalente de la plantilla en el método según la presente invención contribuye a una unión fuerte de la plantilla a la superficie del material portador. Por lo tanto, una plantilla unida de forma covalente contribuye a la estabilidad de la superficie del material portador que posee las plantillas, el cual puede proveer condiciones estables para la polimerización del material de reconocimiento.
- 10
- Preferiblemente, la plantilla se selecciona de un grupo que consiste en complejos supramoleculares, virus, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgánicas, células procariotas, células eucariotas, células vegetales y derivados de ellas.
- 15
- Preferiblemente, el material portador se selecciona de un grupo que consiste en óxidos inorgánicos tales como óxidos de silicio u óxidos de titanio, compuestos orgánicos, inorgánicos, poliméricos o inorgánicos-orgánicos y material orgánico autoensamblado. Por ejemplo, el material portador puede ser una capa de la superficie de un chip o un fármaco o similar.
- 20
- Preferiblemente, el material portador es una superficie de óxido de silicio. En el caso de que la superficie de silicio esté compuesta de partículas, puede unirse una plantilla por partícula, siempre que el tamaño de la partícula, es decir, el diámetro, corresponda al tamaño de la plantilla. De manera alternativa, pueden unirse más plantillas por partícula, en función de la relación del tamaño de la partícula respecto al tamaño de la plantilla. Preferiblemente, hay aproximadamente 200 improntas por nanopartícula.
- 25
- En un aspecto adicional de la presente invención, una composición farmacéutica comprende un elemento de reconocimiento preparado mediante el método según la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección o los síntomas de tal enfermedad seleccionada de infecciones virales y cáncer.
- 30
- En otro aspecto adicional de la presente invención, se concibe el uso de un elemento de reconocimiento preparado mediante el método según la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección o los síntomas de tal enfermedad seleccionada de infecciones virales y cáncer.
- 35
- De este modo, la enfermedad, el trastorno o la afección o los síntomas de dicha enfermedad tales como infecciones virales y/o cáncer pueden ser tratados de manera eficaz mediante el uso del elemento de reconocimiento obtenido a partir del método conforme a la presente invención. Por ejemplo, el elemento de reconocimiento molecular obtenido a partir del método descrito anteriormente puede ser parte de la formulación de una crema diseñada para el tratamiento de infecciones víricas de la piel a través de la aplicación tópica (p. ej., sarampión, varicela, rubéola). La presencia del elemento de reconocimiento molecular hace posible la retención de las partículas virales y fortalece la eficiencia de los agentes farmacéuticos terapéuticos. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en la purificación de los virus en el tratamiento terapéutico.
- 40
- En otro aspecto adicional de la presente invención, se contempla el uso de un elemento de reconocimiento preparado a partir del método conforme a la presente invención para identificar, purificar o analizar biomacromoléculas, diagnósticos médicos, terapia genética, productos de limpieza, dispositivos para el cuidado de la salud, equipos protectores y sistemas de advertencia, aplicación ambiental, agrícola o de la industria alimenticia.
- 45
- El método según la presente invención puede ser ampliamente aplicado y particularmente útil en el campo del análisis tal como en la purificación de anticuerpos, es decir, la producción de material para la purificación de anticuerpos para la producción de vacunas contra enfermedades virales. Luego de la inmunización, los anticuerpos mono/policionales contenidos en el volumen del extracto podrían aplicarse a lechos compactos que consisten en materiales con impronta. Las soluciones amortiguadoras adecuadas para las etapas de aplicación y elución permitirán la recuperación de anticuerpos purificados por afinidad.
- 50
- La presente invención puede además utilizarse en diagnósticos médicos para detectar e identificar rápidamente las infecciones virales. Un cromóforo puede estar embebido en la capa de reconocimiento durante su síntesis y sucesivamente devolver una señal colorimétrica al unirse con el virus diana. Tal herramienta de diagnóstico rápido se utilizaría como un kit portátil. Las partículas con impronta del virus (VIP) se pueden inmovilizar en la superficie de un dispositivo sensorial (p. ej., una microbalanza de cristal de cuarzo, una resonancia de plasmones superficiales) o en una placa de microtitulación y utilizarse en aplicaciones de diagnóstico.
- 55
- Además, las terapias genéticas que utilizan vectores virales pueden ser una aplicación adicional de la presente

5 invención, p. ej., la liberación controlada o la recuperación de los virus utilizados para transportar genes. En una formulación, las VIP, precargadas con especies virales pertinentes, se pueden utilizar para administrar dichos virus (es decir, que contienen los genes a ser transfectados a las células defectuosas) de forma controlada. Por el contrario, el material de reconocimiento se puede aplicar al paciente para "recuperar" los demás virus que anteriormente fueron utilizados en el transporte de los genes a los efectos de evitar una posible contaminación vírica como efecto secundario causado por la terapia genética basada en virus.

10 El método según la presente invención también puede ser particularmente útil en el campo de la industria farmacéutica, p. ej., tratamientos terapéuticos: ingrediente para una formulación de los agentes farmacéuticos terapéuticos para un tratamiento de enfermedades virales. El elemento de reconocimiento molecular obtenido mediante el método según la presente invención puede ser parte de la formulación de una crema diseñada para el tratamiento de infecciones víricas de la piel a través de la aplicación tópica (p. ej., sarampión, varicela, rubeola). La presencia del elemento de reconocimiento molecular puede hacer posible la retención de las partículas virales y fortalece la eficiencia de los agentes farmacéuticos terapéuticos. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en la purificación de los virus. La presente invención también se puede aplicar en el tratamiento antiviral y en aplicaciones quirúrgicas, p. ej., la eliminación selectiva de los virus. Antes de la administración del material de reconocimiento al paciente, las modificaciones del material de reconocimiento mediante recubrimiento/unión de fármacos antivirales (p. ej., Zidovudina (AZT)) pueden permitir la eliminación selectiva de los virus, los cuales pueden unirse al material de reconocimiento.

20 Además, la presente invención puede ser aplicable en técnicas de separación, p. ej., en la producción de material para las aplicaciones cromatográficas para purificar las cepas de virus. Se puede llevar a cabo el empaquetado de materiales de reconocimiento en columnas para retener/purificar específicamente los virus de interés cuando se encuentran en una mezcla de virus o en extractos biológicos complejos en laboratorios de investigación y desarrollo.

25 La presente invención también se puede aplicar a productos de cuidado personal / productos de limpieza industrial y para el hogar, p. ej., productos antivirales para el cuidado personal/cuidado de la salud tales como lociones, jabones y cremas antivirales, p. ej., ungüentos contra el virus del herpes simple. Un ejemplo no taxativo puede ser la adición del material de reconocimiento mediante la formulación de un bálsamo con propiedades antiproliferativas para un tratamiento de aplicación local contra, p. ej., el virus del herpes simple o el virus zona.

30 La formulación de productos de limpieza/desinfectantes para los hogares y los edificios públicos y los medios de transporte también se puede realizar mediante el método de la presente invención. La aplicación puede consistir en la adición del material de reconocimiento en la formulación de los productos de limpieza/desinfectantes para el hogar mencionados anteriormente.

35 La presente invención se puede aplicar además a equipos protectores y aplicaciones del sistema de advertencia, p. ej., sistemas de advertencia sobre la contaminación de las cañerías y los tanques de agua potable (p. ej., ataques terroristas). El material de reconocimiento puede inmovilizarse/recubrirse/embeberse en varias capas sensoriales de las sondas, las cuales están conectadas a transductores de señales. Las instalaciones y los tanques de depósito utilizados para la producción de agua de consumo se pueden equipar con tales sistemas de advertencia basados en sensores para evitar el uso de esta agua en caso de un ataque terrorista biológico. Los sistemas que se describieron podrían ser utilizados como sistemas de advertencia para evitar la contaminación de las líneas industriales o de producción (alimentación, productos farmacéuticos, tratamiento medioambiental, etc.).

40 Asimismo, se pueden realizar sistemas de advertencia para la liberación de los virus fuera de los laboratorios mediante el uso de la presente invención. Los materiales que reconocen específicamente los virus manipulados en los laboratorios de bioseguridad nivel 3 y 4 se pueden utilizar para la producción de sensores, los cuales se embeben, por ejemplo, en los filtros que tratan el aire en dichas instalaciones. Se puede utilizar sensores similares para que los sistemas de advertencia detecten la presencia de virus transmitidos por el aire, sistemas de calefacción y refrigeración.

45 Sin embargo, otros procesos industriales tal como los de la industria alimenticia pueden aplicar la presente invención, p. ej., en la industria alimenticia se puede utilizar la producción del material de reconocimiento específico para los virus (p. ej., los procesos de fermentación de lácteos u otros productos sensibles a los bacteriófagos). Se pueden utilizar en esta preparación de columna cargada, en la inmovilización hasta un material adicional, p. ej., las membranas de filtración, o como formulaciones en polvo para capturar los virus no deseados.

50 Además, las aplicaciones de biología molecular se pueden realizar según la presente invención cuando se requieren los virus u otro material celular/molecular. Cuando el material genético de virus específicos es necesario, se pueden preparar columnas de purificación mediante el uso del material de reconocimiento.

55 Sin embargo, la presente invención se puede aplicar a dispositivos de cuidado de salud personal tal como equipos y mascarillas de protección antiviral. Una posible aplicación del material de reconocimiento es su uso para el recubrimiento directo de las mascarillas de protección. Para las mascarillas equipadas con filtros de cartuchos para aire, se contempla la inclusión del material en el cartucho. El material de reconocimiento puede ser utilizado para la producción de equipos protectores para el ejército en caso de bioterrorismo. Esto puede lograrse mediante

tecnologías habituales de recubrimiento, deposición, copolimerización empleadas en la industria textil.

5 Otra aplicación de la presente invención son las aplicaciones de diagnóstico personal, por ejemplo, para determinar una nueva epidemia de infecciones virales, p. ej., el virus del herpes simple (HSV). Una posible aplicación puede ser la inclusión del material de reconocimiento en kits que suministren información sobre el proceso de aparición de las infecciones. Tales kits pueden basarse en tecnologías económicas tal como la colorimetría.

10 Otra aplicación de la presente invención pueden ser las aplicaciones agrícolas/veterinarias y del cuidado del jardín tal como un pesticida, p. ej., el material de reconocimiento puede ser utilizado con un ingrediente para la formulación de pesticidas/agentes terapéuticos antivirales preventivos y curativos para la reproducción de animales, la acuicultura y agricultura; la aplicación de diagnóstico, p. ej., la producción de kits y dispositivos para el diagnóstico. El material de reconocimiento se puede utilizar en forma de sondas o kits de detección basados en microplacas para el diagnóstico de enfermedades virales en vegetales, el ganado y los peces. Los principios posibles de detección pueden basarse en la colorimetría, la espectrofotometría y espectrofluorometría; tecnologías de tratamiento/sensoriales, p. ej., depender del uso del material de reconocimiento puede aplicarse al diagnóstico de contaminación viral de las instalaciones utilizadas para la producción de vegetales, acuicultura y reproducción de ganado.

15 La presente invención también puede ser aplicable en aplicaciones medioambientales tal como el tratamiento de aguas residuales, p. ej., el material para eliminar los contaminantes virales durante el tratamiento de las aguas residuales. El material de reconocimiento puede ser utilizado directamente en la preparación de los sistemas del reactor de lecho compacto para tratar el agua a través de un proceso de percolación. Otra tecnología posible es la inmovilización/inclusión de estos materiales de reconocimiento en las membranas de filtración que tratan los efluentes. Una aplicación más simple es el uso directo del material de reconocimiento como una suspensión de polvo fino en el agua residual depurada para capturar los virus en sistemas que contengan las partículas. Los sistemas mencionados anteriormente se pueden utilizar para la preparación libre de virus durante la recuperación/el reciclaje de las aguas servidas tratadas. Estas tecnologías también se pueden utilizar para eliminar los contaminantes virales durante la producción de agua potable. Esta aplicación puede verse en el formato de un filtro para la depuración del agua sanitaria, lo cual puede ser pertinente en un país en vías de desarrollo.

20 En otro aspecto adicional de la presente invención, se contempla el uso de un elemento de reconocimiento preparado mediante el método según la presente invención como un fármaco, un catalizador, un inhibidor competitivo de la afinidad por el ligando, un competidor, un agonista, un antagonista o un agente de diagnóstico. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la realización o las realizaciones que se describen más adelante y se dilucidarán haciéndose referencia a ellas.

Breve descripción de las figuras

El método según la invención se describe a continuación en la presente más detalladamente mediante realizaciones de ejemplo y con respecto a las figuras adjuntas, en las que:

35 la Figura 1 exhibe una micrografía electrónica por barrido de nanopartículas de sílice (SNP) como material portador en una realización del método según la invención;

la Figura 2 exhibe el espesor de la capa de un material de reconocimiento medido en función del tiempo en una superficie de un material portador;

40 la Figura 3 exhibe una micrografía electrónica por barrido de partículas con impronta del virus (VIP) que comprende las SNP de la Figura 1 como un elemento de reconocimiento molecular provisto por la realización del método según la invención;

la Figura 4 exhibe una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) que representa un ensayo de interacción para analizar una interacción VIP-diana en comparación con una interacción partículas sin impronta (NIP)-diana en donde las VIP son el elemento de reconocimiento molecular de la Figura 3;

45 la Figura 5 exhibe los porcentajes de TBSV (virus del enanismo ramificado del tomate) libre en función del tiempo de uso de las NIP de la Figura 4 y las VIP de la Figura 3 para unirse a TBSV;

la Figura 6 exhibe los porcentajes de TYMV (virus del mosaico amarillo del nabo) libre en función del tiempo de uso de las NIP de la Figura 4 y las VIP de la Figura 3 para unirse a TYMV;

50 la Figura 7 exhibe el espesor de los materiales de reconocimiento polimerizados de las VIP (partículas con impronta del virus) en función de la duración de la polimerización como otros elementos de reconocimiento molecular provistos por otra realización del método según la invención;

la Figura 8 exhibe porcentajes de BMV (virus del mosaico del bromo) libre en función de las VIP de la Figura 7 que presentan material de reconocimiento polimerizado de diferentes espesores;

la Figura 9 exhibe una vista esquemática de un material portador adicional que presenta agentes reticulantes unidos a su superficie en otra realización del método según la invención;

la Figura 10 exhibe una vista esquemática del material portador de la Figura 9 en donde un virus como una plantilla está unido al agente reticulante;

5 la Figura 11 exhibe una vista esquemática del material portador de la Figura 10 en donde se provee al virus bloques de construcción autoensamblados;

la Figura 12 exhibe una vista esquemática del material portador de la Figura 11 en donde el material de reconocimiento de un primer espesor se encuentra polimerizado en la superficie del material portador;

la Figura 13 exhibe un primer elemento de reconocimiento molecular provisto por el método de la Figura 9;

10 la Figura 14 exhibe una vista esquemática del material portador de la Figura 11 en donde el material de reconocimiento de un segundo espesor se encuentra polimerizado en la superficie del material portador como alternativa al espesor que se muestra en la Figura 12; y

la Figura 15 exhibe un segundo elemento de reconocimiento molecular provisto por el método de la Figura 9.

Descripción detallada de la presente invención y realizaciones preferidas

15 La Figura 1 exhibe una micrografía electrónica por barrido de nanopartículas de sílice (SNP) 3 que se puede utilizar como material portador en una realización del método según la invención. Las SNP 3 pueden ser, básicamente, monodispersas, en donde cada una de las SNP 3 puede tener un tamaño definido en un intervalo de entre 20 nm y varios μm , p. ej., alrededor de 400 nm tal como se muestra en la Figura 1.

20 La Figura 2 exhibe un espesor de la capa del material de reconocimiento polimerizado medido en función del tiempo según la presente invención, en donde un TYMV (virus del mosaico amarillo del nabo) ha sido utilizado como plantilla. Por ejemplo, si el espesor del material de reconocimiento polimerizado es de forma similar tan bajo como 2 nm, entonces la duración de la polimerización es de alrededor de 2 horas. Para un espesor más alto (por ejemplo 10 nm) del material de reconocimiento polimerizado, la duración de la polimerización es de alrededor de 8 horas. Por lo tanto, es posible predefinir con exactitud un espesor objetivo del material de reconocimiento polimerizado al definir
25 previamente una duración de la polimerización.

La Figura 3 exhibe una micrografía electrónica por barrido de partículas con impronta del virus (VIP) 111 que se puede utilizar como un elemento de reconocimiento molecular que comprende un material de reconocimiento polimerizado en una realización del método según la invención. Se han eliminado los virus como plantillas y, por lo tanto, se han formado improntas 120 en la superficie de cada VIP. Cada impronta 120 formada en el material de reconocimiento polimerizado es complementaria a una diana. Dentro de las improntas existen grupos químicos funcionales orientados específicamente tal como las funciones de unión del reconocimiento a los efectos de interactuar con la diana.
30

La Figura 4 exhibe una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) representativa que muestra un ensayo de interacción para la interacción partícula-virus, en las primeras seis líneas del lado izquierdo de la Figura 4 (0 minutos a 60 minutos) se analizan los sobrenadantes de las muestras que son una mezcla de BSA (albúmina de suero bovino), TBSV (virus del enanismo ramificado del tomate: virus no plantilla) y TYMV (virus del mosaico amarillo del nabo: virus plantilla) y se tratan con VIP_{TYMV} como elemento de reconocimiento provisto según una realización del método inventivo. En las segundas seis líneas del lado derecho de la Figura 4 (0 minutos a 60 minutos), se analizan los sobrenadantes de las muestras tratadas con NIP (partícula sin impronta) como elementos de reconocimiento. Por lo tanto, la banda superior A representa a BSA como diana, la banda del medio B representa a TBSV (virus no plantilla) como diana y la banda inferior C representa a TYMV (virus plantilla) como diana. Ni el virus no plantilla (TBSV) ni BSA se unen específicamente a VIP_{TYMV} o a NIP. A diferencia de ello, el virus plantilla TYMV se une específicamente a VIP_{TYMV} , mientras que de manera no específica se une a las NIP. En el primer minuto de interacción, el virus plantilla TYMV se une específicamente a VIP_{TYMV} con la mayor parte de su cantidad inicial.
45

La Figura 5 muestra porcentajes de TBSV (virus del enanismo ramificado del tomate) libre en función del tiempo para las NIP (partículas sin impronta) como elemento de reconocimiento y para las VIP (partículas con impronta del virus) como elemento de reconocimiento provisto según una realización del método inventivo. Tal como puede observarse en la Figura 5, el uso de los resultados de las VIP en una unión significativamente mejorada del TBSV en comparación con el uso de las NIP. Además, en la Figura 5 puede observarse que la mayor parte de la unión de TBSV libre ocurre en un período de tiempo comparablemente más corto, independientemente del elemento de reconocimiento utilizado. Se empieza con una velocidad de unión comparablemente alta en los primeros dos o tres minutos, la velocidad de unión no mejora más luego de alrededor de 30 minutos.
50

La Figura 6 muestra porcentajes de TYMV (virus del mosaico amarillo del nabo) libre en función del tiempo para NIP (partícula sin impronta) como elemento de reconocimiento y para VIP (partícula con impronta del virus) como
55

elemento de reconocimiento provisto según una realización del método inventivo. Tal como puede observarse en la Figura 6, el uso de los resultados de las VIP en una unión significativamente aún más mejorada del TYMV en comparación con el uso de las NIP que en la Figura 5. Además, en la Figura 6 también puede observarse que la mayor parte de la unión de TYMV libre ocurre en un período de tiempo comparablemente más corto, independientemente del elemento de reconocimiento utilizado. Se empieza con una velocidad de unión comparablemente alta en el primer o segundo minuto, la velocidad de unión no mejora más luego de alrededor de 10 minutos.

La Figura 7 exhibe un espesor de la capa de un VIP (partícula con impronta del virus) medido en función del tiempo como un elemento de reconocimiento molecular que comprende un material de reconocimiento polimerizado provisto por una realización del método según la invención. En él, los BMV (virus del mosaico del bromo) han sido utilizados como plantillas. Por ejemplo, si el espesor es de forma similar tan bajo como 15 nm, entonces la duración de la polimerización es de alrededor de cinco horas. Para obtener un espesor mayor (por ejemplo 20 nm) del material de reconocimiento polimerizado, la duración de la polimerización es de alrededor de 20 horas. Por lo tanto, en la Figura 7 puede observarse que la duración de la polimerización puede proveer un ajuste preciso del espesor del material de reconocimiento polimerizado en una realización del método según la presente invención.

La Figura 8 muestra porcentajes de BMV (virus del mosaico del bromo) libre en función de un espesor de la capa de un VIP (partícula con impronta del virus) que se puede utilizar como elemento de reconocimiento molecular provisto por una realización del método según la invención. Un espesor del material de reconocimiento polimerizado se puede ajustar con respecto a la plantilla y/o el tipo de diana mediante la determinación de un espesor objetivo óptimo del material de reconocimiento polimerizado que permita la unión de la plantilla y/o el tipo de diana (p. ej., BMV) respectivos en una cantidad conforme a la necesidad de la aplicación. Para BMV como plantilla y/o diana, el espesor objetivo óptimo del material de reconocimiento polimerizado es alrededor de 17 nm. Por lo tanto, se puede ajustar la afinidad de la VIP por la diana según la necesidad de la aplicación a través del espesor del material de reconocimiento polimerizado.

La Figura 9 exhibe una vista esquemática de un material portador 30 en una realización del método según la invención. En una superficie del material portador 30, los agentes reticulantes 2 están distribuidos por lo que se utilizan como un medio de enlace. Los agentes reticulantes se distribuyen homogéneamente en la superficie del material portador 30. Por lo tanto, se provee un espaciado idéntico entre los agentes reticulantes 2, lo cual puede ser una condición para la unión homogénea de plantillas. Los agentes reticulantes 2 son reactivos reticulantes o agentes reticulantes que contienen extremos reactivos hacia grupos funcionales específicos (p. ej., aminas primarias, sulfhidrilos, etc) que se unen por un lado a la superficie del material portador 3 y por el otro lado a la plantilla (véase más adelante). Por ejemplo, un agente reticulante 2 se puede inmovilizar en una superficie de sílice como un material portador 3 y luego se puede unir una plantilla a un sitio de unión desocupado del agente reticulante (véase más adelante). De manera alternativa, el agente reticulante 2 también puede unirse, en primer lugar, a la plantilla y luego al agente reticulante 2 unido a la plantilla con su sitio de unión desocupado a la superficie del material portador 3. El agente reticulante 2 utilizado en el interior se puede seleccionar según el tipo de material portador 3 a ser utilizado. Por ejemplo, el agente reticulante 2 puede ser un agente reticulante escindible, es decir, un agente reticulante que es capaz de escindir su enlace al recibir estímulos externos tales como temperatura, pH, electricidad, luz o un agente reticulante tal como DTSSP (3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]) que puede escindirse, por ejemplo, mediante el uso de DTT (ditiotreitól) como un agente reductor. Como un ejemplo no taxativo, se puede modificar una superficie de silicio como un material portador 3 con el agente reticulante 2 que presenta un enlace base de Schiff y enlaza la superficie de sílice con la plantilla. En el caso de una superficie de oro o titán como material portador 3, un agente reticulante 2 puede presentar un extremo tiol que permita la unión a la superficie respectiva y además un enlace disulfuro intramolecular escindible y puede enlazar la superficie respectiva con la plantilla.

Lo siguiente se aplica a la siguiente descripción. Si, a los efectos de aclarar los dibujos, una figura contiene símbolos de referencia que no se explican en la parte de la descripción directamente asociada a ellos, entonces se hace referencia a secciones anteriores de la descripción.

La Figura 10 exhibe un virus 4 como una plantilla unida a la superficie del material portador 30, o inmovilizada en ella, a través de uno de los agentes reticulantes 2. El virus 4 comprende los sitios de unión 41 que están desocupados.

En la Figura 11 se proveen bloques de construcción monoméricos 42 complementarios a los sitios de unión 41 del virus 4 de modo que puedan ocupar los sitios de unión 41 del virus 4. Los bloques de construcción 42 comprenden monómeros estructurales y fragmentos de reconocimiento. Los fragmentos de reconocimiento o monómeros de reconocimiento, respectivamente, comprenden monómeros estructurales tales como tetraetilortosilicato (TEOS). Los bloques de construcción 42 también pueden, de forma alternativa, unirse en primer lugar a una plantilla no inmovilizada que posteriormente se inmoviliza en el material portador 3. Después de que se proveen los bloques de construcción 42 al virus 4, se suministra un material de reconocimiento monomérico líquido sobre la superficie del material portador 30. Luego, el material de reconocimiento es polimerizado para una duración predefinida de manera que se forme un material de reconocimiento polimerizado, con un espesor correspondiente con la duración de la polimerización, sobre la superficie del material portador 30. En función de esta duración predefinida, se forman

improntas de un tamaño predefinido proporcionalmente en el material de reconocimiento polimerizado.

La Figura 12 exhibe una realización de un material de reconocimiento polimerizado 6 que se construye en la superficie del material portador 30 luego de una primera duración de polimerización predefinida. El material de reconocimiento polimerizado 6 presenta una impronta 10 inducida por el virus 4. El tamaño (p. ej., diámetro, forma) de la impronta 10 depende del tamaño del virus 4 y del espesor del material de reconocimiento polimerizado 6. También la cantidad de funciones de unión construidas por los bloques de construcción 42 integrados al material de reconocimiento polimerizado depende del espesor del material de reconocimiento polimerizado 6. Luego, el virus 4 es liberado de la impronta 10 del material de reconocimiento polimerizado 6. Preferiblemente, dicha liberación del virus 4 se lleva a cabo de forma moderada, es decir que el virus 4 liberado puede volver a utilizarse. Tal liberación moderada del virus 4 se puede lograr mediante la ruptura de la unión entre la plantilla y el material portador 30.

En la Figura 13 se exhibe una realización de un elemento de reconocimiento molecular 1 con el material de reconocimiento polimerizado 6. Tal como se muestra en la Figura 13, el espesor del material de reconocimiento polimerizado es comparablemente menor debido a la duración en comparablemente menos extensa de la primera polimerización. En consecuencia, el tamaño de la impronta 10 es comparablemente más pequeño y la cantidad de funciones de unión 415 es comparablemente menor. Dado que la afinidad del material de reconocimiento polimerizado 6 por una diana depende del tamaño de la impronta 10 y de la cantidad de funciones de unión 415, la afinidad del elemento de reconocimiento molecular 1 es comparablemente menor. Tales elementos de reconocimiento molecular 1 de baja afinidad son preferidos en muchas aplicaciones posibles.

La Figura 14 exhibe otra realización de un material de reconocimiento polimerizado 60 que se construye en la superficie del material portador 30 luego de una segunda duración de polimerización predefinida. El material de reconocimiento polimerizado 60 presenta una impronta 100 inducida por el virus 4. El tamaño de la impronta 100 también depende del tamaño del virus 4 y del espesor del material de reconocimiento polimerizado 60. También la cantidad de funciones de unión construidas por los bloques de construcción 42 integrados en el material de reconocimiento polimerizado depende del espesor del material de reconocimiento polimerizado 6. El virus 4 es entonces nuevamente liberado de la impronta 100 del material de reconocimiento polimerizado 60.

En la Figura 15 se exhibe otra realización de un elemento de reconocimiento molecular 11 con el material de reconocimiento polimerizado 60. Tal como se muestra en la Figura 15, el espesor del material de reconocimiento polimerizado es comparablemente mayor debido a la duración comparablemente más extensa de la segunda polimerización. En consecuencia, el tamaño de la impronta 100 es comparablemente más grande y la cantidad de funciones de unión 420 es comparablemente mayor. Dado que la afinidad del material de reconocimiento polimerizado 60 por una diana depende del tamaño de la impronta 100 y de la cantidad de funciones de unión 420, la afinidad del elemento de reconocimiento molecular 1 es comparablemente mayor. Tales elementos de reconocimiento molecular 1 de alta afinidad también son preferidos en muchas aplicaciones posibles.

La descripción antecedente se entenderá por completo con referencia a los siguientes Ejercicios. Tales ejemplos son, no obstante, ejemplos de métodos de la puesta en práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Reconocimiento molecular específico de virus vegetales

Las partículas con impronta del virus (VIP) son producidas en un proceso de tres etapas que implica el anclaje covalente de las partículas virales en la superficie de las nanopartículas de sílice (SNP), cultivadas a partir de una capa ultrafina de sílice (<20 nm) en las partículas obtenidas de esta manera (400 nm) en agua y la eliminación del virus plantilla, en donde cada partícula producida presenta un tamaño de partícula general de $440 \text{ nm} (400 \text{ nm} + (20 \text{ nm} \times 2) = 440 \text{ nm})$.

Síntesis de nanopartículas de sílice

Las SNP se sintetizan mediante el uso del ya conocido método de Stöber adaptado de A. Imhof *et al.* (J. Phys. Chem. B, 1999, 103, 1408). En un matraz de fondo redondo de 1 L se agregó: etanol (345,4 mL), amoníaco al 25 % (39,3 ml) y TEOS (tetraetilortosilicato, 15,3 µL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación (600 rpm) durante 24 horas a una temperatura constante (20 °C). En la Figura 1 se ofrece una imagen representativa de las nanopartículas producidas.

Inmovilización del virus

En primer lugar, las SNP son modificadas en la superficie con APTES (3-aminopropiltriethoxisilano). Con agitación magnética, se agregaron 10 µL de APTES a 10 mL de una suspensión acuosa de SNP a una concentración de 3 mg/ml. Las partículas se lavaron luego de 30 minutos de reacción. Luego, las partículas modificadas con amino obtenidas de esta manera se hacen reaccionar con un excedente de glutaraldehído a una concentración final de 1 % durante 1 hora en condiciones de agitación (400 rpm) con el fin de facilitar la unión de la plantilla a la superficie modificada por la partícula. Después del lavado, se agregó una solución de virus del mosaico amarillo del nabo

(TYMV) a una concentración final de 75 µg/mL. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 1 hora. Por lo tanto, la plantilla (es decir, TYMV) se une a la superficie de la partícula (Figura 10).

De manera alternativa, el agente reticulante (es decir, APTES, glutaraldehído) se puede unir, en primer lugar, a la plantilla y luego el agente reticulante unido por la plantilla puede unirse a la superficie de sílice de la partícula con su sitio de unión desocupado. El agente reticulante, como se emplea en esta memoria, puede depender del tipo de material portador a ser utilizado. Preferiblemente, el agente reticulante puede ser un agente reticulante escindible, es decir, un agente reticulante que es capaz de escindir su enlace al recibir estímulos externos tales como temperatura, pH, electricidad, luz o un agente reticulante tal como DTSSP (3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]) que puede escindirse, por ejemplo, mediante el uso de DTT (ditiotreitolo) como un agente reductor. Como un ejemplo no taxativo, se puede modificar una superficie de sílice como un material portador con el agente reticulante que presenta un enlace base de Schiff y enlaza la superficie de sílice con la plantilla.

Crecimiento de la capa de reconocimiento

A los efectos de evaluar la cinética de crecimiento de la capa, a 10°C, se agregaron 10 mL de TEOS (= bloques de construcción estructurales (monómeros)) a una suspensión de SNP modificadas por el virus y la mezcla se mantuvo en agitación. Después de 2 horas, se agregó una mezcla específica de bloques de construcción (monómeros) de "reconocimiento" (hidroximetiltrietoxisilano, HMTEOS, 5 µL; benciltrietoxisilano, BTES, 5 µL, n-propiltrietoxisilano, PTES, 5 µL y APTES, 5 µL) (Figura 11). El crecimiento del material de reconocimiento en la superficie de sílice se detiene mediante un doble lavado con agua cuando, básicamente, se iguala un espesor objetivo del material de reconocimiento que crece. Por ejemplo, si el material de reconocimiento que crece presenta una propiedad de baja afinidad para unir la plantilla o la diana, el espesor objetivo será menor que la mitad del diámetro de la plantilla (Figura 12), es decir, para una plantilla-virus tal como un virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) que tiene un diámetro de alrededor de 28 nm, el espesor objetivo de un material de reconocimiento de baja afinidad se encuentra en un intervalo de entre 1 % y 10 % del diámetro de la plantilla.

Si el material de reconocimiento que crece presenta una propiedad de baja afinidad para unir la plantilla o la diana, el espesor objetivo será medio (Figura 14), es decir, para una plantilla-virus tal como un virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) que tiene un diámetro de 28 nm, el espesor objetivo de un material de reconocimiento de alta afinidad se encuentra en un intervalo de entre 30 % y 45 % del diámetro de la plantilla.

Si un material de reconocimiento que crece presenta una propiedad de alta afinidad para la unir la plantilla o la diana, el espesor objetivo será alto (Figura 14), es decir, para una plantilla-virus tal como el virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) que tiene un diámetro de 28 nm, el espesor objetivo de un material de reconocimiento se encuentra en un intervalo de entre 45 % y 50 % del diámetro de la plantilla.

Las muestras seleccionadas se analizaron con un microscopio electrónico de barrido (Zeiss, SUPRA 40 VP) y las imágenes adquiridas se utilizaron en la medición del tamaño de las partículas mediante el uso del paquete de software analysis® (Olympus) (~ 100 mediciones por muestra).

En la Figura 2 se observa la medición del crecimiento de la capa durante un período de tiempo. Debe advertirse que la cinética medida depende de la composición de la mezcla de reacción y de las condiciones de la reacción.

A los efectos de neutralizar las superficies sin impronta, las VIP obtenidas de esta manera (10 mL, 3 mg/mL) se incubaron durante 2 horas con 40 µl de PEOTMS (2-[metoxi(polietileno)propil]trimetoxisilano_6 a 9 unidades de óxido de etileno) en agitación.

Luego las VIP se lavaron dos veces con agua. Como los virus siguen estando presentes en las cavidades, no se puede acceder a la superficie de los sitios de unión para llevar a cabo la modificación que sólo modificará químicamente las áreas sin impronta del material portador. Las cadenas de oligoetilenglicol controlarán la adsorción no específica en la superficie del material portador.

Eliminación de los virus plantilla

La eliminación de los virus se lleva a cabo mediante la incubación de las VIP a temperatura ambiente durante 30 minutos en la solución amortiguadora de eliminación (RB, HCl 1 M, Triton-X 100 al 0,1 %) en agitación y el suministro de la mezcla para su tratamiento con ultrasonido durante otros 15 minutos. Luego, las VIP obtenidas de esta manera se analizaron mediante SEM, en la Figura 3 se observa una micrografía representativa. Las Figuras 13 y 15 ilustran un material de reconocimiento de baja y alta afinidad, respectivamente; en donde ha sido eliminada la plantilla. De manera alternativa, la liberación de la plantilla puede ser de forma moderada, es decir que la plantilla liberada no se ve afectada y, por lo tanto, la plantilla liberada puede volver a utilizarse para la preparación de otro elemento de reconocimiento molecular. Tal "liberación moderada de la plantilla" puede lograrse mediante la ruptura de la unión entre la plantilla y el material portador lo cual se puede conseguir mediante el uso de reacciones químicas reversibles tal como la ruptura de una base de Schiff haciendo uso del tratamiento con ácido, la reducción o la oxidación del enlace disulfuro o haciendo uso de agentes reticulantes escindibles, es decir, DTSSP (3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato]) que se puede escindir, por ejemplo, mediante el uso de DTT (Ditiotreitolo) como un agente reductor.

Interacción partículas-virus

Una suspensión de VIP a una concentración de 1,7 mg/mL se incubó a 25 °C en agitación (500 rpm) para aumentar la duración de la reacción con una mezcla de BSA (albúmina de suero bovino); TBSV (virus del enanismo ramificado del tomate, virus no plantilla) y TYMV (virus plantilla). Las partículas sin impronta se utilizan como referencia. Las partículas sin impronta (NIP) han sido producidas de conformidad con el mismo procedimiento que las VIP sin adición de virus.

Las muestras fueron recogidas al transcurrir 1, 5, 10, 30 y 60 minutos de la interacción y se sometieron a centrifugación para sedimentar las partículas. Se recogieron los sobrenadantes para el análisis de las proteínas mediante el uso de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio)). Se analizaron los genes obtenidos y se detectaron las bandas de intensidad mediante el uso de un software de análisis, tal como Quantity one® (Bio-Rad).

En las Figuras 5 y 6 se observa la cuantificación de TBSV y TYMV libres, respectivamente. A partir de estos resultados, resulta evidente que no hay diferencia pertinente entre las VIP y las NIP con respecto al virus no plantilla (TBSV). Se observa el mismo resultado para BSA (no se muestra). A diferencia del BSA y TBSV, el virus plantilla TYMV se une específicamente a las VIP. Mientras que se une de forma no específica a los NIP. En el primer minuto de interacción, el virus plantilla TYMV se une específicamente a la VIP, casi al 50 % de su cantidad inicial, y este valor se mantiene constante.

Ejemplo 2: Afinidad ajustable para virus vegetales

Las partículas con la impronta del virus (VIP) se producen de conformidad con el mismo procedimiento que en el Ejemplo: 1 mediante el uso del virus del mosaico del bromo (BMV) como plantilla (VIPBMV).

Se incubó una solución acuosa de BMV con una concentración de 250 µg/mL con VIP_{BMV} que presenta un espesor de la capa de reconocimiento a una concentración de 5 mg/ml a 25° C con agitación (500 rpm). En la Figura 7 se observa la medición del crecimiento de la capa durante el período de utilización de la VIP en este experimento. Las muestras fueron recogidas a los 60 minutos de interacción y se sometieron a centrifugación para sedimentar las partículas. Se recogieron los sobrenadantes para medir las proteínas mediante el uso de Agilent 2100 Bioanalyzer. En la Figura 8 se observa la cuantificación de BMV libre en relación con el espesor de la capa de reconocimiento. A partir de estos resultados, es posible ver una clara correlación entre la afinidad de las VIP por su diana (es decir, virus plantilla) y el espesor de la capa que crece. En efecto, si el espesor de la capa es mayor que el radio del virus (> 17 nm), las improntas son menos accesibles para los virus debido a que los virus se esconden durante el crecimiento de la capa. Mientras que en el caso de las capas con espesor de reconocimiento muy bajo, las improntas no son lo suficientemente profundas y el contacto entre el virus y la impronta no es suficiente como para hacer posible una unión estable. El espesor de la capa de reconocimiento está íntimamente relacionado con la afinidad/especificidad de las VIP obtenidas de esta manera. La capacidad de controlar con precisión esta etapa (temperatura, composición de silano) provee un método para producir nanomateriales de afinidad ajustable para su (bio)molécula diana.

Si bien la invención se ha ilustrado y descrito detalladamente en los dibujos y la descripción antecedente, tal ilustración y descripción se considerarán a modo ilustrativo o de ejemplo y no como restrictivas. Se entenderá que los expertos en la técnica pueden realizar cambios y modificaciones dentro del alcance y el espíritu de las siguientes reivindicaciones, en particular, la presente invención abarca realizaciones adicionales con cualquier combinación de características de distintas realizaciones que se describieron anteriormente y más adelante.

La invención también abarca todas las demás características que se muestran en las Figuras de forma individual aunque puedan no haber sido descritas en la descripción antecedente o siguiente. Además, en las reivindicaciones, la expresión "que comprende" no excluye otros elementos u otras etapas, y el artículo indefinido "un/una" o "unos/as" no excluye una diversidad. Una única etapa puede cumplir con las funciones de varias características enumeradas en las reivindicaciones. Las expresiones "básicamente", "alrededor de", "aproximadamente" y similares en relación con un atributo o un valor específico también definen el atributo exacto o el valor exacto, respectivamente. No deberá ser interpretado como limitante del alcance cualquier símbolo de referencia en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un elemento de reconocimiento molecular (1, 11, 111) que comprende las etapas de
- 5 unir una plantilla (4) a una superficie de un material portador (3, 30),
 proveer un material de reconocimiento a la superficie del material portador (3, 30),
 iniciar la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30),
 detener la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30) y
 liberar la plantilla (4) de la superficie del material portador (3, 30) y el material de reconocimiento polimerizado (6, 60),
 10 caracterizado porque
 un tamaño objetivo de improntas individuales (10, 100, 120) es predefinido, y
 se detiene la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30) cuando un tamaño de la impronta individual (10, 100, 120) del material de reconocimiento polimerizado (6, 60) básicamente iguale el tamaño objetivo predefinido.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde la definición previa del tamaño objetivo comprende predefinir un espesor objetivo, en donde se detiene la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30) cuando un espesor del material de reconocimiento polimerizado (6, 60) básicamente iguale el espesor objetivo predefinido.
- 20 3. El método según la reivindicación 2, en donde la definición previa del espesor objetivo comprende predefinir una duración de la polimerización objetivo en las condiciones dadas y en donde se lleva a cabo la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30) en las condiciones dadas y se detiene cuando una duración de la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30) básicamente iguale la duración predefinida de la polimerización objetivo.
- 25 4. El método según la reivindicación 2 o 3, en donde la plantilla (4) es un virus o un análogo estructural de un virus y el espesor objetivo se encuentra dentro de un intervalo de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 % de un diámetro de la plantilla (4) o, de forma opcional, de aproximadamente 45 % a aproximadamente 50 % de un diámetro de la plantilla (4) o, de forma opcional, de aproximadamente 47 % a aproximadamente 50 % de un diámetro de la plantilla (4) o, de forma opcional, de aproximadamente de 48 % a aproximadamente 50 % de un diámetro de la
 30 plantilla (4) o, de forma opcional, de aproximadamente de 49 % a aproximadamente 50 % de un diámetro de la plantilla (4).
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende la etapa de activar la superficie del material portador (3, 30) antes de unir la plantilla (4) a la superficie del material portador (3, 30) en donde un medio de enlace (2) se distribuye homogéneamente en la superficie del material portador (3, 30).
- 35 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende la etapa de proveer bloques de construcción (42, 415, 420) complementarios a la plantilla (4) antes de iniciar la polimerización del material de reconocimiento en la superficie del material portador (3, 30).
7. El método según la reivindicación 6 que comprende las etapas de analizar una estructura de la superficie de la plantilla (4) o la diana antes del suministro de los bloques de construcción (42, 415, 420) y de elegir los bloques de construcción (42, 415, 420) correspondientes a la estructura de la superficie.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado (6, 60) enfrentado al material portador (3, 30) se neutraliza antes de la liberación de la plantilla (4) de la superficie del material portador (3, 30) y el material de reconocimiento polimerizado (6, 60).
- 45 9. El método según la reivindicación 8, que en ese sentido neutraliza la superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado (6, 60), comprende la modificación química y/o física y/o bioquímica de la superficie exterior del material de reconocimiento polimerizado (6, 60) en la superficie del material portador (3, 30).

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la liberación de la plantilla (4) de la superficie del material portador (3, 30) y el material de reconocimiento polimerizado (6, 60) comprende la ruptura de la unión entre la plantilla (4) y el material portador (3, 30) sin que afecte a la plantilla.
- 5 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la unión de la plantilla (4) a la superficie del material portador (3, 30) es un enlace covalente.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la plantilla (4) se selecciona de un grupo que consiste en complejos supramoleculares, virus, péptidos, proteínas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgánicas, células procariotas, células eucariotas, células vegetales y derivados de ellas.
- 10 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el material portador (3, 30) se selecciona de un grupo que consiste en óxidos inorgánicos tales como óxidos de silicio u óxidos de titanio, compuestos orgánicos, inorgánicos, poliméricos o inorgánicos-orgánicos y material orgánico autoensamblado.

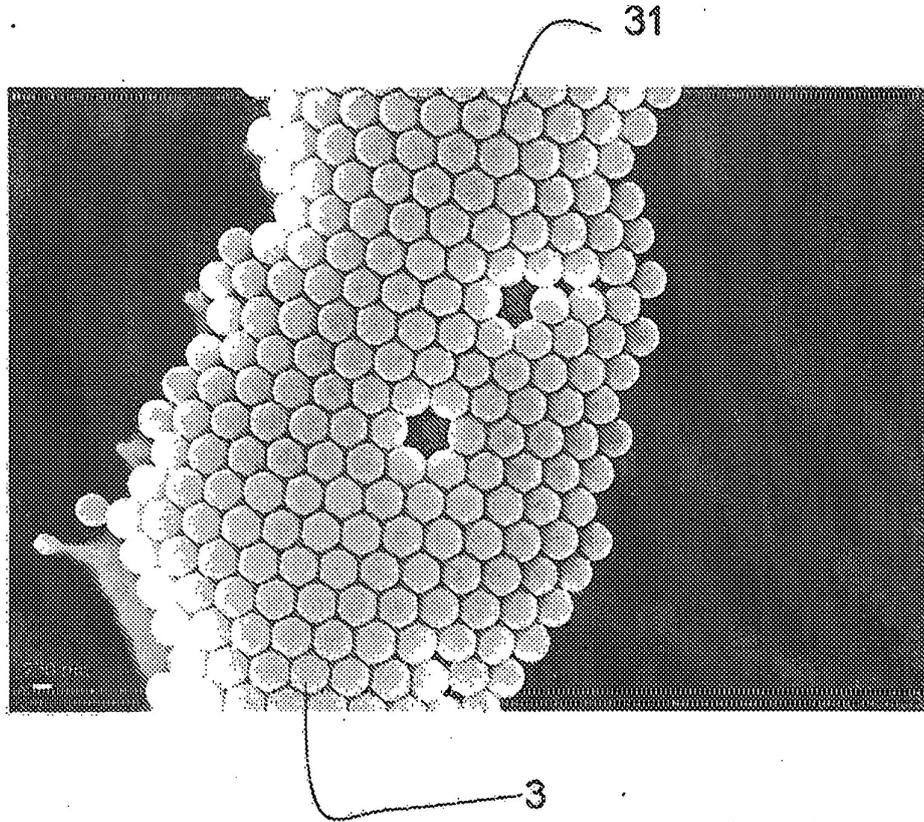


Fig. 1

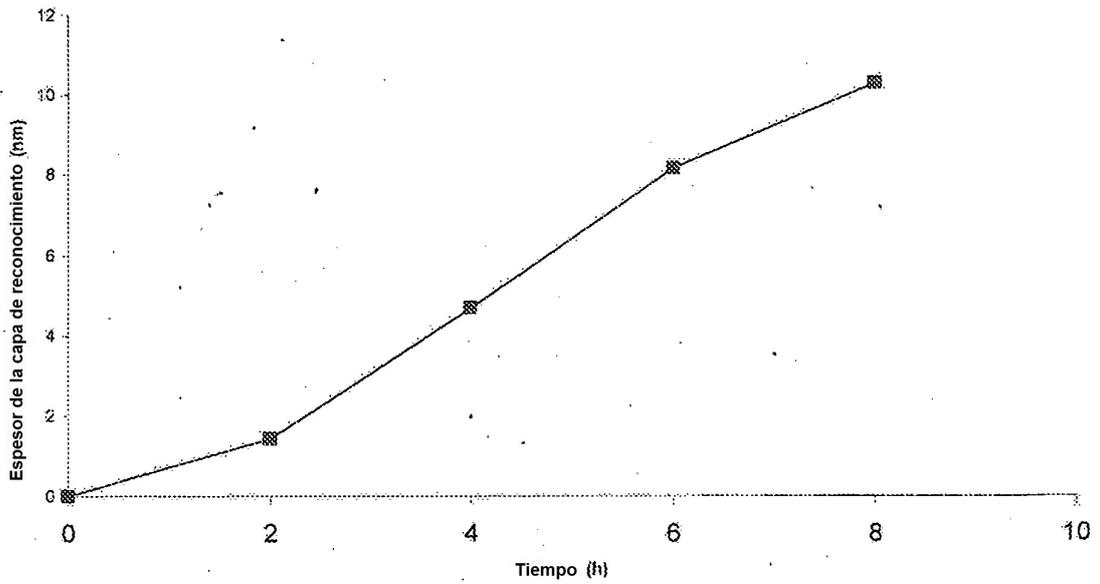


Fig. 2

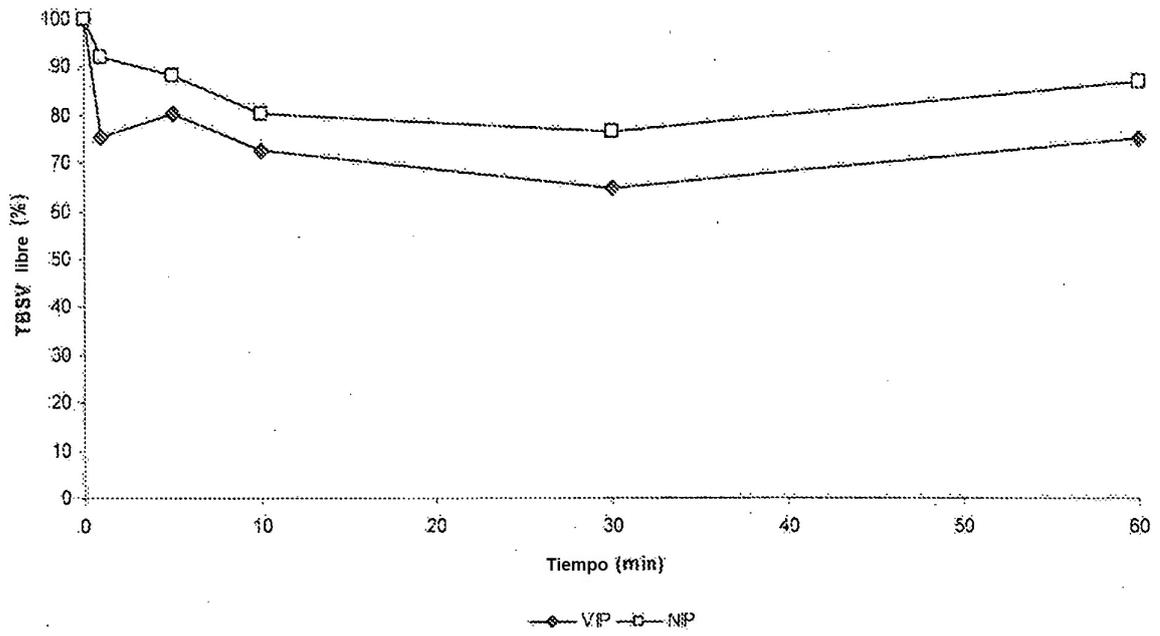


Fig. 5

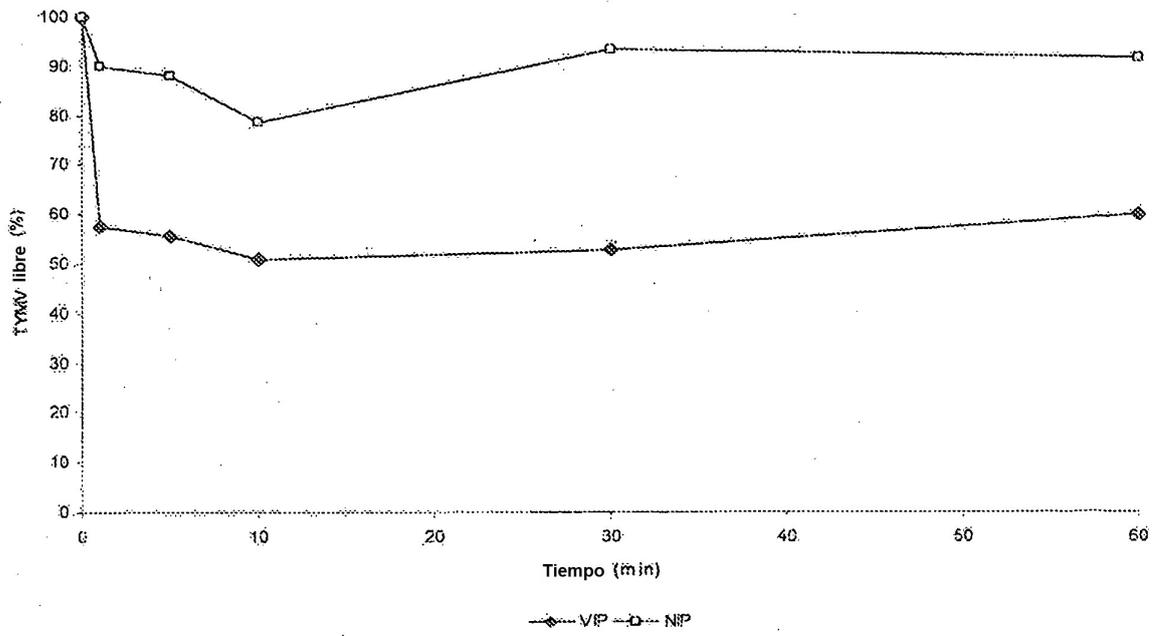


Fig. 6

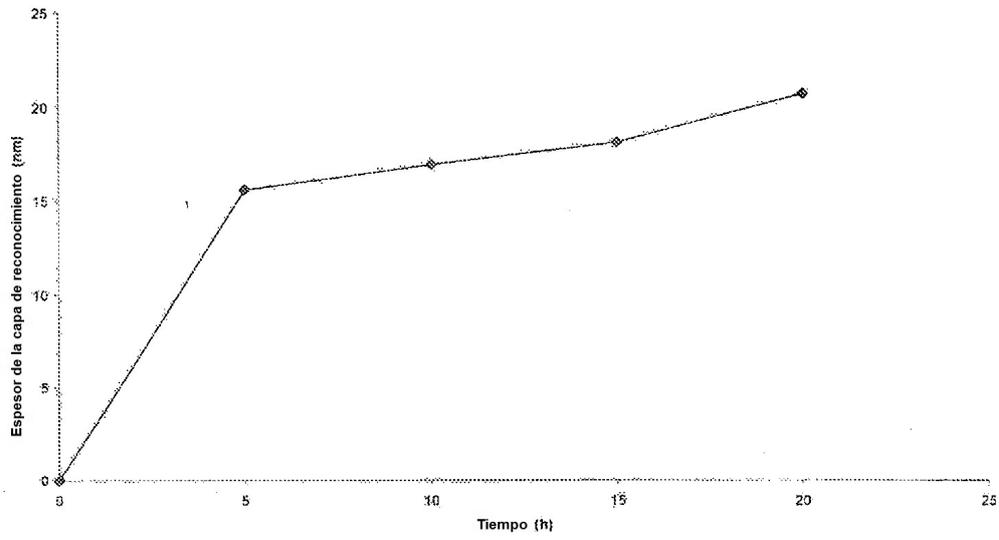


Fig. 7

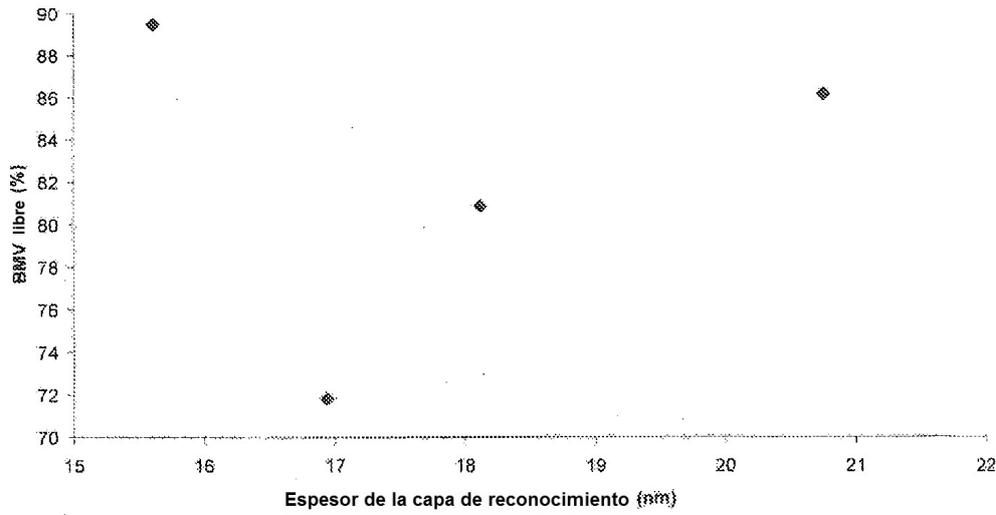


Fig. 8

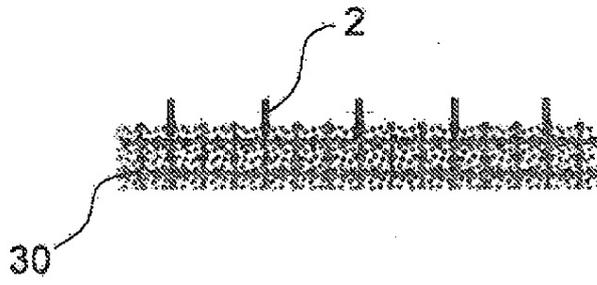


Fig. 9

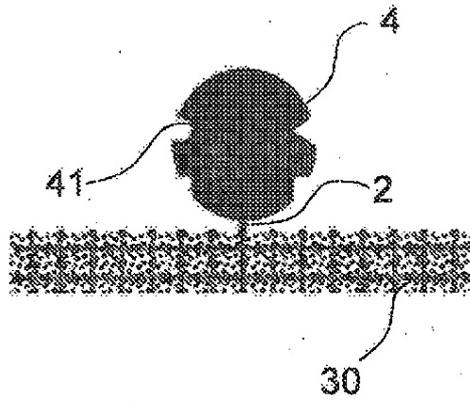


Fig. 10

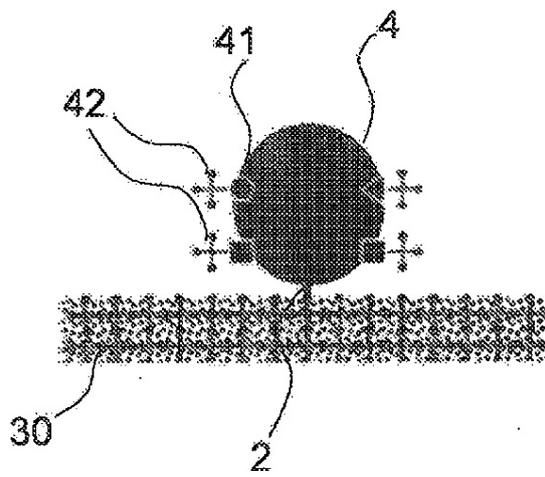


Fig. 11

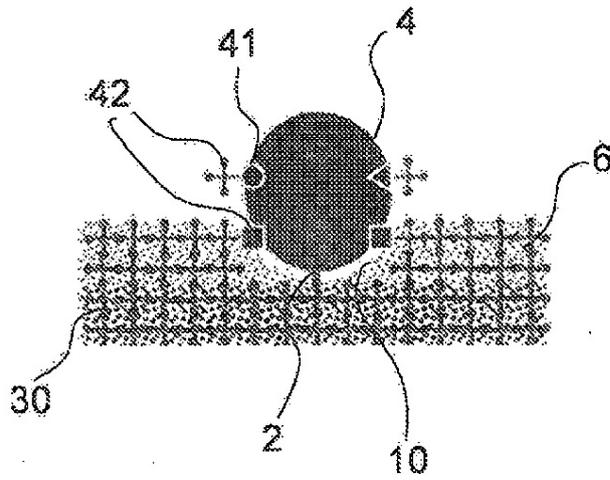


Fig. 12

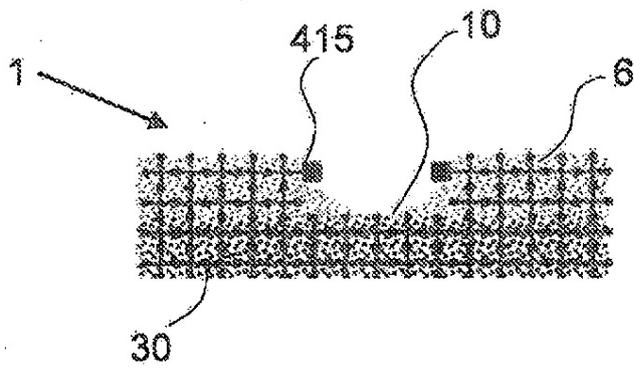


Fig. 13

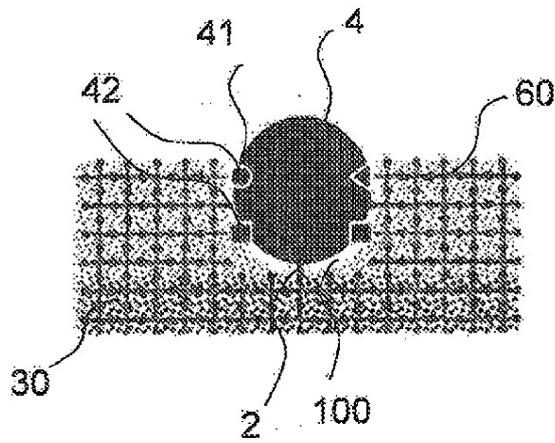


Fig. 14

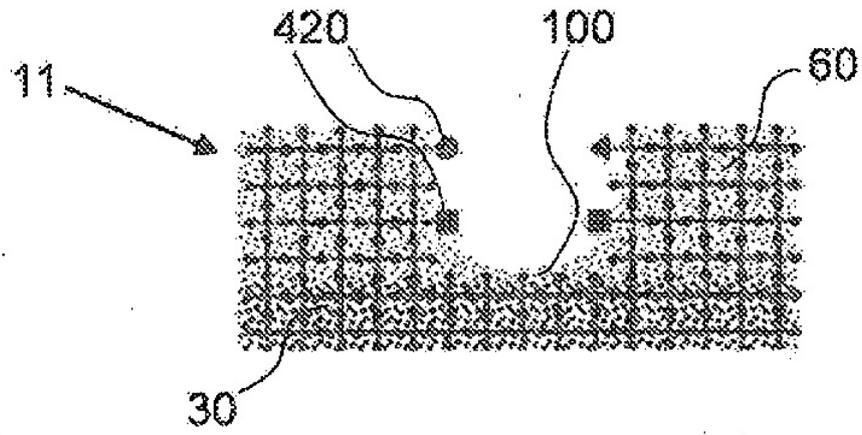


Fig. 15