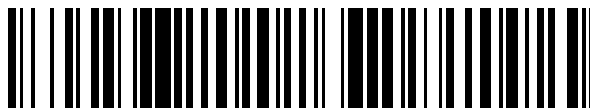


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 769**

21 Número de solicitud: 201330947

51 Int. Cl.:

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

24.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.12.2014

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

18.03.2015

Fecha de la concesión:

07.08.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.08.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (50.0%)
C/ Ramiro de Maeztu, 7
28040 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANGULO BARRIOS, Carlos;
CANALEJAS TEJERO, Víctor;
CARRASCO GARRIDO, Sergio;
MORENO BONDI, María Cruz y
NAVARRO VILLOSLADA, Fernando**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Método de obtención de una estructura de polímero de impronta molecular (MIP)**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un nuevo método para la realización de patrones de MIP a escala micrométrica y sub-micrométrica por escritura directa por haz de electrones. La mezcla precursora de MIP contiene compuestos sensibles a la irradiación electrónica y se deposita en forma de película sobre un sustrato. Las zonas de la película irradiadas con un haz de electrones son eliminadas con un disolvente químico o revelador. La película resultante contiene los patrones deseados y se polimeriza utilizando luz y/o calor. El método de síntesis de patrones de MIPs de la invención permite la realización de matrices de numerosos sensores basados en MIPs sobre un sustrato o chip de pequeñas dimensiones para la detección simultánea de múltiples compuestos (bio)químicos, además de otras diversas aplicaciones.

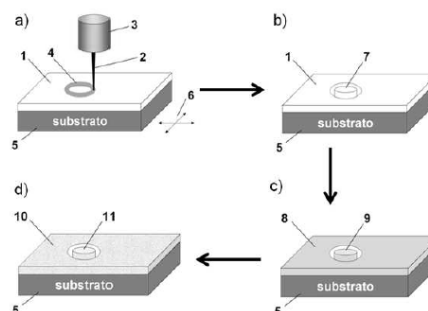


Figura 1

ES 2 525 769 B2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE UNA ESTRUCTURA DE POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR (MIP)

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la fabricación o síntesis de estructuras para detección molecular. En concreto, en la producción de microsensores químicos basados en patrones de polímeros de impronta molecular (MIPs) sobre sustratos, en la fabricación de chips para detección de analitos con aplicación en química analítica y
10 medicina.

Antecedentes de la invención

La tendencia de la técnica en el desarrollo de dispositivos sensores químicos es su miniaturización a escala micrométrica o sub-micrométrica. La utilización de
15 componentes miniaturizados presenta numerosas ventajas, entre otras que el volumen de analito puede ser reducido, el consumo de energía para su funcionamiento también es menor, se reducen los costes de producción y diversifican las aplicaciones.

La técnica ha desarrollado transductores ópticos, eléctricos y mecánicos basados en
20 los materiales tradicionales de la industria microelectrónica, que son los semiconductores y dieléctricos inorgánicos, metales y resinas poliméricas. Sin embargo, dotar a estos transductores de una función sensora tal como el reconocimiento molecular para identificar analitos de origen químico o biológico requiere la incorporación de materiales sensores o funcionales "blandos". Los
25 materiales blandos son materiales orgánicos amorfos de alta viscosidad que normalmente no son compatibles con las técnicas de fabricación utilizadas en la industria de semiconductores.

Los biosensores integran biomoléculas como elementos de reconocimiento tales como
30 enzimas, anticuerpos o ADN, con frecuencia inestables cuando se sacan de su ambiente natural. Suelen requerir conservación a bajas temperaturas y pueden no resistir ciertas condiciones de operación y almacenamiento, lo cual limita su utilidad especialmente en sistemas portátiles.

Una estrategia alternativa es la integración en el sensor de receptores sintéticos biomiméticos, tales como los polímeros de impronta molecular o MIPs (“Molecularly Imprinted Polymers”) (K. Haupt, “Creating a good impression”, Nat. Biotech. **2002**, 20, 884).

5

Los MIPs son materiales sintéticos que se utilizan como elementos de reconocimiento molecular. La patente EP 1237936 B1 describe un procedimiento general para la obtención de MIPs basado en la formación de una estructura macromolecular entrecruzada alrededor de una molécula que actúa como plantilla molecular o molde y que se extrae tras la polimerización. Cuando los MIPs son estructurados a escala sub-micrométrica aumenta su sensibilidad en el reconocimiento de moléculas debido a que presentan una mayor superficie de detección.

10

Entre las ventajas que aporta el empleo de MIPs frente a los biomoléculas, por ejemplo anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas, etc., constan su capacidad de trabajar en condiciones extremas de pH, temperatura y en presencia de disolventes orgánicos, sin perder por ello su estructura o afinidad por el analito.

15

La mayoría de MIPs se preparan en la técnica a partir de mezclas precursoras de monómeros. Las mezclas precursoras que utilizan oligómeros o polímeros se desarrollan para usos y analitos muy específicos. Li describe la preparación de una mezcla precursora de MIPs para teofilina que comprende polímeros de composición muy parecida a las de la presente invención, también con presencia de dobles enlaces en cadenas laterales de dichos polímeros (Li et al. “Synthesis and Characterization of Functional Methacrylate Copolymers and their Application in Molecular Imprinting”, Macromolecules 2005, 38, 2620-2625). La publicación especula con la posibilidad de utilizar estos MIPs como biosensores, aunque no dice ni sugiere ningún procedimiento para realizarlo, y por tanto el experto en la técnica no encontraría obvio llegar a la presente invención a partir de las enseñanzas de esta publicación.

20

25

El desarrollo de biochips basados en MIPs se realiza por estampación sobre un sustrato, normalmente una oblea. En la técnica actual esto se ha conseguido realizar a escala micrométrica utilizando distintos métodos, que se pueden clasificar en técnicas de “contacto” y “sin contacto”.

30

35

Entre las técnicas de contacto se encuentran el depósito con una micropunta (F. Vandeveldel y col. "Direct patterning of molecularly imprinted microdot arrays for sensors and biochips", *Langmuir* 2007, 23, 6490), la litografía "blanda" (M. Yan y col. "Fabrication of molecularly imprinted polymer microstructures", *Anal. Chim. Acta* 2001, 5 435, 163) y, recientemente, la fotolitografía de contacto por radiación UV ($\lambda = 365$ nm) (S. Guillón y col. "Single step patterning of molecularly imprinted polymers for large scale fabrication of microbiochips", *Lab Chip* 2009, 9, 2987). Los métodos de contacto presentan el inconveniente de la incompatibilidad química de las superficies que interaccionan. Por ejemplo, en litografía blanda un sello de polidimetil siloxano (PDMS) 10 se pone en contacto con la solución precursora del MIP para formar el patrón definido por el sello; sin embargo el PDMS es incompatible con los disolventes más habituales empleados en la síntesis de MIPs, y degrada la calidad del material. La reciente demostración realizada por Guillón del uso de fotolitografía para estampar MIPs a escala de oblea con resolución micrométrica es un avance significativo hacia la 15 fabricación en paralelo de biochips basados en MIPs; no obstante, estos autores utilizaron el método fotolitográfico de contacto, es decir, que la máscara contacta la película de material polimérico con el consecuente problema de la calidad final del material.

20 Los métodos sin contacto evitan este inconveniente. Sin embargo, el número de estrategias de polimerización sin contacto aplicadas a MIP y probadas en la técnica se reduce a dos.

La primera requiere el empleo de un haz de radiación electromagnética focalizado 25 para polimerizar el material por un mecanismo fotoquímico o térmico. Se han reportado dos realizaciones de esta aproximación: La micro-estereo-litografía por haz láser de $\lambda=364$ nm consiguió realizar estructuras MIP del orden de decenas de micras (P.G. Conrad II, y col. "Functional molecularly imprinted polymer microstructures fabricated using microstereolithography", *Advanced Materials* 2003, 15, 1541); La 30 segunda realización emplea un haz láser de CO₂ de 750 mW que permite incrementar la temperatura local hasta 70°C empleando 35 pulsos consecutivos de 5 ms, para obtener microarrays de puntos de 300 μ m de diámetro (O.Y.F. Henry, y col. "Fabrication of molecularly imprinted polymer microarray on a chip by mid-infrared laser pulse initiated polymerisation", *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23, 1769).

35

La segunda estrategia emplea foto-máscaras para la polimerización de las zonas de interés. Esta aproximación se ha aplicado para la fabricación arrays de μ -puntos de MIP selectivos a fluoresceína de 70-90 μm de diámetro (A.V. Linares y Col. "Patterning Nanostructured, Synthetic, Polymeric Receptors by Simultaneous Projection
5 Photolithography, Nanomolding, and Molecular Imprinting" *Small*, 2011, 7, 2318). La máscara se proyecta a través de un objetivo 10x sobre la solución precursora del MIP depositada sobre un portaobjetos de microscopio para su polimerización con una lámpara de mercurio. Alternativamente, empleando moldes de alúmina nanoporosa funcionalizados con fluoresceína o mioglobina, se han preparado puntos de aprox. 90
10 μm de diámetro formados por nanofilamentos improntados superficialmente con la molécula plantilla de interés, dispuestos paralelamente con un diámetro individual de 150 nm y 4 μm de longitud.

En una aproximación parecida, Byrne ha preparado geles improntados
15 microestructurado, improntados con D-glucosa, con un espesor de 13 μm y distintas configuraciones geométricas (Byrne y col. "Microfabrication of intelligent biomimetic networks for recognition of D-glucose" *Chem. Mater.* 2006, **18**, 5869).

Tanto las técnicas de contacto como sin contacto de biochips basados en MIPs
20 presentan resoluciones espaciales superiores a la micra. Sin embargo las estructuras sensoras necesitan reducirse por debajo de la micra para incrementar significativamente su sensibilidad. Esto se ha logrado gracias a la posibilidad de crear fenómenos de confinamiento óptico, eléctrico o magnético en regiones sub-
25 micrométricas, lo que consigue una mayor interacción entre el analito y la señal utilizada para su detección. Además, el empleo de estructuras sub-micrométricas permite reducir considerablemente tanto el volumen de muestra como la energía que precisa el sensor.

Las ventajas más significativas de los sistemas de escritura por haz de electrones para
30 la micro- y nano-fabricación son primero que no se precisa de máscara, eliminando así los costes de amortización de las tradicionales máscaras de litografía y acelerando los ciclos de desarrollo de los chips; y además su capacidad de resolución sub-100 nm, que cumple todos los requerimientos litográficos programados por la ITRS (International Technology Roadmap for Semiconductors) para las futuras generaciones

de circuitos integrados. Además, la gran mayoría de las máscaras de fotolitografía utilizadas en la industria microelectrónica hoy día se fabrican por LHE.

5 El problema de la técnica es pues conseguir biochips a escala submicrométrica para la detección de analitos. La solución propuesta por la presente invención es un procedimiento que comprende la irradiación parcial de un haz de electrones sobre una película precursora de MIPs, para utilizar como biosensor un motivo dibujado en dicha película que no habría sido irradiado por el haz de electrones.

10

Descripción de la invención

La invención refiere a un procedimiento de micro-nano-estructuración de películas de MIPs depositadas sobre sustratos para la fabricación de microbiochips.

15 De forma que la presente invención es un método de obtención de una estructura de polímero de impronta molecular, que comprende las siguientes etapas:

- (a) irradiación parcial con haz de electrones de una película formada por una mezcla precursora de polímeros de impronta molecular sobre un sustrato, preferiblemente una oblea de silicio o un vidrio, en que dicha mezcla precursora comprende cadenas poliméricas ramificadas;
- 20 (b) eliminación por revelado con un disolvente químico de las moléculas afectadas por dicha irradiación con haz de electrones,
- (c) polimerización de la película resultado de la etapa b); y
- (d) extracción de dicho analito de la película polimerizada del paso c) por lavado
- 25 químico.

En una realización preferible, el método comprende la etapa previa de preparar la película sobre el sustrato por técnica de espineado o "spin-coating". Esta técnica consiste en depositar una gota o gotas de la mezcla precursora del polímero que se desea formar sobre un sustrato, haciéndolo girar a continuación a una determinada velocidad típicamente con un rotor con capacidad para adherir el sustrato con un sistema de vacío. El resultado final es la formación de una película de gran uniformidad sobre el sustrato.

30

Se define "mezcla precursora" o de prepolimerización de MIPs como aquella mezcla de monómeros, oligómeros y/o polipéptidos de la que se obtiene un MIP capaz de reconocer una molécula orgánica tras un proceso de polimerización. Típicamente la mezcla también comprende un disolvente químico, y la molécula orgánica o analito
5 sirve como plantilla molecular. Puede contener también un iniciador de la reacción de polimerización.

Se define "polímero" como una secuencia de monómeros con peso molecular igual o mayor de 1,5 kD. Por debajo de ese peso molecular se trataría de cadenas de oligómeros, que no son objeto de la presente invención.
10

En una realización preferible de la invención, dicha irradiación de la etapa a) se realiza con una máquina de litografía por haz de electrones. El método sin contacto para la realización de estructuras MIP de escritura directa por haz de electrones resulta una
15 herramienta adecuada para nanofabricación gracias a su resolución sub-micrométrica, y puede ser utilizada para la fabricación de biochips de múltiples nanosensores químicos o bioquímicos. De forma que una realización muy preferible es que la zona no irradiada de la película resultado de la etapa a) sea inferior a 1 μm en alguna de sus dimensiones.

20 Las mezclas precursoras de MIPs cualquiera sea su composición presentan grupos funcionales y dobles enlaces que determinan la reacción con el analito y su propia polimerización. La proporción de dobles enlaces en las cadenas laterales de los polímeros de la mezcla precursora de la presente invención es del 10% respecto del
25 total de grupos funcionales.

En otra realización de la invención, dicho analito es una molécula orgánica seleccionada entre el grupo formado por péptidos, antibióticos, pesticidas, micotoxinas, drogas, colorantes, biomoléculas y moléculas sintéticas de biomoléculas,
30 preferiblemente un colorante. En otra realización muy preferible dicha molécula orgánica es una molécula fluorófora.

En otra realización preferible más, dicho disolvente químico de la etapa b) con el que se revela la película afectada por el haz de electrones es tetrahidrofurano, metanol o
35 isopropanol, o sus mezclas.

En otra realización preferible, la polimerización de la etapa c) de la mezcla precursora se realiza por calor y/o radiación electromagnética.

- 5 En una realización preferible más, dicho lavado químico final del paso (d) se realiza en presencia de metanol, etanol, acetonitrilo, agua, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético o sulfato de tetra-n-butilamonio, o sus mezclas.

10 La realización más preferible de la invención es una estructura de MIP que presenta un área polimerizada funcional parcial.

La posibilidad de emplear procedimientos de funcionalización compatibles con los procesos convencionales microelectrónicos aumenta el campo de aplicación y utilidad de los micro y nano-biosensores, además de simplificar su proceso de fabricación.

15 Desde el punto de vista del proceso litográfico, esto requiere métodos para litografiar motivos sub-micrométricos en materiales funcionales para el reconocimiento de moléculas orgánicas o biomoléculas.

El método de la invención comprende las siguientes etapas desarrolladas (Figura 1):

20

- A) Escritura (4) de los patrones deseados por irradiación con un haz de electrones (2) sobre una película delgada (1) de la mezcla precursora o de prepolimerización de MIP. Una vez polimerizada, la película de MIP actuará como sensor en aquellas zonas que no han sido irradiadas.
- 25 Típicamente, los monómeros funcionales constituyentes en una mezcla precursora de MIP están seleccionados de entre monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, carbohidratos y heterociclos; monómeros entrecruzantes que estabilicen la estructura polimérica en presencia de la
- 30 plantilla molecular seleccionados entre diacrilatos o dimetacrilatos de polioles, como 1,2-bis(metacrililoiloxi)etano o 2,2-bis(2-metil-2-propanoiloximetil)butil-2-metil-2-propanoato; bisacrilamidas como N,N'-metilenbisacrilamida; y compuestos divinílicos como el divinilbenceno y sus análogos. En la mezcla precursora de la presente invención, estos
- 35 monómeros están presentes formando polímeros. La mezcla precursora

típica de un MIP también comprende un porógeno, preferiblemente un disolvente orgánico, y una plantilla molecular o analito.

5 La película es depositada sobre un sustrato (5) por cualquier técnica de recubrimiento de sustratos.

10 El proceso de escritura con el haz de electrones se puede realizar con una máquina de litografía o cualquier instrumentación que disponga de un cañón de electrones (2) y una plataforma de traslación en un plano (6), sobre la que se deposita el sustrato (5). La plataforma de traslación es un sistema electromecánico que puede moverse manual y/o automáticamente en un plano (X-Y). Así, una vez fijado el sistema sustrato (5) - película (1) sobre la plataforma de traslación, es posible escribir con el haz de electrones (2), que suele permanecer en una posición fija, gracias al desplazamiento de la plataforma en el plano X-Y.

15

B) Eliminación por disolución de las regiones irradiadas (4) de la película (1) con una disolución química que actúe como revelador. La película (1) se sumerge en el revelador, que actúa sobre el material de la mezcla afectado por la irradiación electrónica (4) con gran selectividad sobre el material no irradiado (1,7). El tiempo de revelado dependerá de la velocidad de disolución del material irradiado.

20

C) Polimerización de la película nanoestructurada (8, 9) que permanece adherida sobre el sustrato y no ha sido irradiada con el haz de electrones. El proceso de polimerización se inicia en presencia de los radicales libres generados en la ruptura homolítica del doble enlace carbono-carbono de las cadenas laterales del polímero lineal tras irradiación con luz UV o tratamiento térmico. Alternativamente, la polimerización puede iniciarse en presencia de iniciadores de radicales libres del tipo peróxido y azo-compuesto, que son compuestos que contienen enlaces covalentes cuya ruptura homolítica origina radicales libres (8,9). El resultado de la polimerización es la formación de una estructura polimérica entrecruzada tridimensional.

25

30

35

D) Extracción de la plantilla molecular de la película entrecruzada nanoestructurada (10,11). Esto se realiza por inmersión de la película (8,9) en un disolvente orgánico del tipo alcohol o nitrilo, o acuoso, capaz de disociar la plantilla molecular del material polimérico entrecruzado.

5

Así, el método de la invención crea patrones sub-micrométricos en la película por la eliminación selectiva del material alrededor de ellos. El MIP se comportaría como una resina positiva porque la parte irradiada se elimina con el revelado. Los patrones remanentes sobre el sustrato, es decir la película estructurada, no reciben bombardeo electrónico, lo cual representa una gran ventaja de la invención ya que la irradiación electrónica podría dañar las plantillas moleculares contenidas en la mezcla, y por tanto degradar las prestaciones del MIP.

A este respecto, los electrones incidentes sobre las moléculas producen una serie de reacciones de ruptura de enlaces químicos que favorecen la posterior disolución en un revelador químico de las zonas irradiadas. Para que este efecto tenga lugar, la mezcla precursora de MIP debe contener en su composición moléculas suficientemente reactivas y sensibles a la irradiación electrónica tales como oligómeros, polímeros o copolímeros entrecruzables. La sensibilidad a la irradiación electrónica de estas moléculas se debe en la invención a la presencia de dobles enlaces C=C- en los grupos laterales de dichas cadenas. Al incrementar el número de dobles enlaces aumenta la sensibilidad a la irradiación electrónica. Los dobles enlaces son altamente reactivos cuando interaccionan con electrones energéticos, y pueden romperse para generar radicales libres y sustancias susceptibles de ser disueltas en el revelador. La energía del haz de electrones y dosis electrónica (número de electrones por unidad de tiempo y unidad de área) óptimas del proceso dependerán del grado de reactividad de la mezcla. Como valores ilustrativos, la energía del haz electrónico suele ser del orden de varios KeV, mientras que las dosis electrónicas típicas son del orden de mC/cm².

Otro aspecto clave del método de la invención es que el entrecruzamiento de la mezcla de prepolimerización tiene lugar después del dibujo de los nanopatrones. El proceso de entrecruzamiento es fundamental para crear un MIP. Sin embargo, este entrecruzamiento suele endurecer mecánica y químicamente el material, haciendo difícil trabajarlo a posteriori en condiciones adecuadas para su uso como sensor de moléculas.

35

El método de la invención se puede aplicar a cualquier mezcla precursora de MIPs que contenga compuestos químicos sensibles a la irradiación con electrones, de forma que el resultado de esta irradiación sea la ruptura de enlaces químicos y la consiguiente
5 formación de moléculas capaces de ser disueltas en un disolvente orgánico.

La litografía con haz de electrones pertenece al sector de la nanofabricación de componentes electrónicos, ópticos y/o magnéticos con resinas, mientras que los MIPs pertenecen al área de materiales funcionales para fines sensores. La combinación de
10 estas tecnologías en la presente invención pertenece a distintas áreas técnicas, no está sugerida y no resulta obvia para el experto en la técnica y por tanto debe conferir inventividad a la presente invención.

La comparación entre el MIP de la invención y un NIP muestra que el proceso de irradiación con haz de electrones mantiene la capacidad de actuar como impronta
15 molecular de la parte de película no irradiada, frente a un NIP que no reconoce la plantilla molecular (Figura 3). El MIP es altamente selectivo a rodamina 123 ya que no presenta reactividad cruzada frente a moléculas estructuralmente similares a la plantilla tales como rodamina B y rodamina 6G que no contienen el grupo amino
20 primario característico de la rodamina 123, al que se atribuye el reconocimiento selectivo por parte del MIP (Figura 4).

La invención posibilita la fabricación de estructuras de MIPs con tamaño inferior a la micra sin necesidad de utilizar ninguna máscara o cualquier otro artilugio en contacto
25 con el MIP, evitando así contaminarlo. El método sin contacto de la invención puede ser llevado a cabo industrialmente utilizando equipamiento disponible comercialmente para realizar Litografía por Haz de Electrones (LHE).

Desde el punto de vista económico, la posibilidad de fabricar biochips de múltiples
30 nanosensores basados en MIPs utilizando técnicas propias de la industria de semiconductores permitiría reducir los costes de producción considerablemente. Esta reducción no sólo estaría motivada por la posibilidad de fabricación en masa; la utilización de materiales biológicamente robustos como los MIPs, que actuarían como “anticuerpos artificiales” eliminaría los gastos de conservación que requieren las
35 delicadas macromoléculas biológicas de reconocimiento. Por otro lado, las estructuras

sub-micrométricas sensoras, además de ofrecer una mayor sensibilidad, requieren menores volúmenes de muestras y de potencia de funcionamiento. Ambos factores contribuirían a su vez a reducir los costes de utilización de los biochips.

- 5 Como se ha comentado arriba, las modificaciones químicas introducidas en los MIPs para ser capaces de reconocer selectivamente a la rodamina y poder configurar el sensor de la invención, es específica. Si la molécula orgánica que actúa como plantilla es otra, los MIPs correspondientes se tendrían que desarrollar también de forma específica. Esto es por lo que sólo se aporta un ejemplo de realización y sin embargo
10 la invención muestra una línea inventiva común a todos los procesos comprendidos dentro del alcance de la reivindicación principal.

Breve descripción de los dibujos

- 15 **Figura 1:** Esquema de procedimiento de la invención.

- A) Escritura por haz de electrones sobre la película:
1. Película de mezcla precursora de MIP.
 2. Haz de electrones.
 3. Cañón de electrones.
 - 20 4. Motivo escrito con el haz de electrones en la película (1).
 5. Substrato.
 6. Plataforma de traslación X-Y.
- B) Revelado de la película:
7. Patrón deseado en la película.
- 25 C) Polimerización del MIP:
8. Película polimerizada o entrecruzada.
 9. Patrón deseado en la película.
- D) Extracción del analito:
10. Película polimerizada sin la molécula plantilla.
 - 30 11. Patrón deseado en la película.

Figura 2: Espectro de ¹H-RMN del polímero sintetizado según el ejemplo de realización (300 MHz, d₆-DMSO) δ (ppm): 12.39 (br s, HOOC-), 5.99 and 5.63 (s, CH₂=C), 4.10 (br s, CO-NH-), 1.85 (s, =C(CH₃-), 1.23, 1.04 and 0.95 (br s, CH₃-C).

35

Figura 3: Gráfico de la intensidad de fluorescencia de la Rodamina 123 reconocida o capturada por el MIP sintetizado en el Ejemplo 2 en función del tiempo de inmersión en una disolución 20 nM de Rodamina 123 en acetonitrilo. Representa la curva de reconocimiento de la plantilla molecular Rodamina 123 por parte del MIP. También se muestra la intensidad de fluorescencia procedente de un Polímero No Imprimado (“Non-Imprinted Polymer”, NIP) con la plantilla molecular en las mismas condiciones de incubación.

Figura 4: Gráfico de la intensidad de fluorescencia de la Rodamina 123, Rodamina B y Rodamina 6G, reconocida o capturada por el MIP sintetizado en el Ejemplo 2 tras inmersión en una disolución 5 μ M del indicador en acetonitrilo. Tiempo de incubación 3 h.

Descripción detallada de la invención

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Preparación de la mezcla de polimerización

El polímero lineal empleado posteriormente para la obtención del MIP se preparó mezclando 4,5 mL de metacrilato de trimetilsililo (SIMA, ABCR, 97%) con 525 mg de metacrilato de 2-aminoetilo (AEM, Aldrich, 90%) en 20 mL de metanol y polimerizando térmicamente con 50 mg de iniciador 2,2-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilo) (ABDV, Wako Pure Chemical Industries). El polímero se precipitó en acetona y redisolvió en 30 mL de dimetilformamida (DMF, Carlo Ebra), añadiendo 543 mg de N-(metacriloxi)succinimida (MAOS; ABCR) y 1 mL de trietilamina (TEA, Fischer Scientific, síntesis de péptidos). A continuación, se precipitó sobre una disolución de ácido trifluoroacético (TFA, Fluorochem, síntesis de péptidos) en agua al 10 % en volumen y lavó con acetona obteniéndose un sólido blanco pulverulento. Este polímero presentó una cantidad de dobles enlaces del 10% respecto de la cantidad total de grupos funcionales, medido en la relación de señales del espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 2). La mezcla precursora de polimerización se obtuvo disolviendo 1 g del polímero sintetizado en 50 mL de metanol y añadiendo 1,5 mg de Rodamina 123, que actuó de plantilla molecular.

Ejemplo 2: Fabricación de un nanopatrón de MIP sobre un sustrato de Si capaz de reconocer la molécula Rodamina 123.

Sobre un sustrato de silicio (5) se depositó una película (1) de la mezcla de pre-polymerización obtenida en el Ejemplo 1 por la técnica de espineado (D.W. Schubert, T. Dunkel, Spin coating from a molecular point of view: its concentration regimes, influence of molar mass and distribution; Materials Research Innovations Vol. 7, p. 314 (2003)) El espesor de esta película fue aproximadamente de 100 nm. Se dibujó el motivo (4) del patrón según la Figura 3 con un haz de electrones (2) generado por un cañón (3) (CRESTEC CABL-9500C) y acelerados hacia la película (1), siendo la energía de los electrones de 50 KeV y la dosis de 2 mC/cm², produciendo la rotura de enlaces químicos. La escritura se realizó gracias al movimiento de la plataforma (6) sobre la que se encuentra situado el sustrato (5). Se sumergió entonces la película (1) adherida al sustrato (5) en un revelador de tetrahidrofurano (THF) durante un minuto que eliminó la zona irradiada (4) dando lugar al patrón deseado (7). A continuación se aplicó calor (170 °C, 30 min) a la película estructurada (1,7) convirtiéndola en una película estructurada polimerizada o entrecruzada (8,9). Finalmente se extrajeron las moléculas de rodamina de la película estructurada entrecruzada (8,9) por inmersión de la película entrecruzada en una disolución de etanol con ácido trifluoroacético (TFA) al 10 % (v/v), obteniendo una película de MIP con estructuras sub-micrométricas (10,11) de acuerdo con el patrón escrito (4) con el haz de electrones (2) (Figura 3). El patrón obtenido es capaz de detectar moléculas de Rodamina 123, es decir, es un sensor de Rodamina 123 basado en MIPs.

Reivindicaciones

1. Método de obtención de una estructura de polímero de impronta molecular, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - 5 (a) irradiación parcial con haz de electrones de una película formada por una mezcla precursora de polímeros de impronta molecular sobre un sustrato, en que dicha mezcla precursora comprende cadenas poliméricas ramificadas;
 - (b) eliminación por revelado con un disolvente químico de las moléculas afectadas por dicha irradiación con haz de electrones,
 - 10 (c) polimerización de la película resultado de la etapa b); y
 - (d) extracción de dicho analito de la película polimerizada del paso c) por lavado químico.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa
- 15 previa de preparar dicha película sobre el sustrato por técnica de espineado.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicho sustrato es una oblea de silicio.
4. Método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicho sustrato es un vidrio.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha irradiación de la etapa a) se realiza con una máquina de litografía por haz de electrones.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la zona no irradiada de la película resultado de la etapa a) es inferior a 1 μm en
- 25 alguna de sus dimensiones.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicho analito es una molécula orgánica seleccionada entre el grupo formado por péptidos, antibióticos, pesticidas, micotoxinas, drogas, colorantes, biomoléculas y moléculas sintéticas de biomoléculas.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, caracterizado por que dicha molécula orgánica es un colorante.
9. Método según una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado por que dicha molécula orgánica es una molécula fluorófora.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que dicho disolvente químico de la etapa b) es tetrahidrofurano, metanol o isopropanol, o sus mezclas.
- 5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que dicha polimerización de la etapa c) se realiza por calor y/o radiación electromagnética.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que dicho lavado químico del paso (d) se realiza en presencia de metanol, etanol, acetonitrilo, agua, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético o sulfato de 10 tetra-n-butilamonio, o sus mezclas.

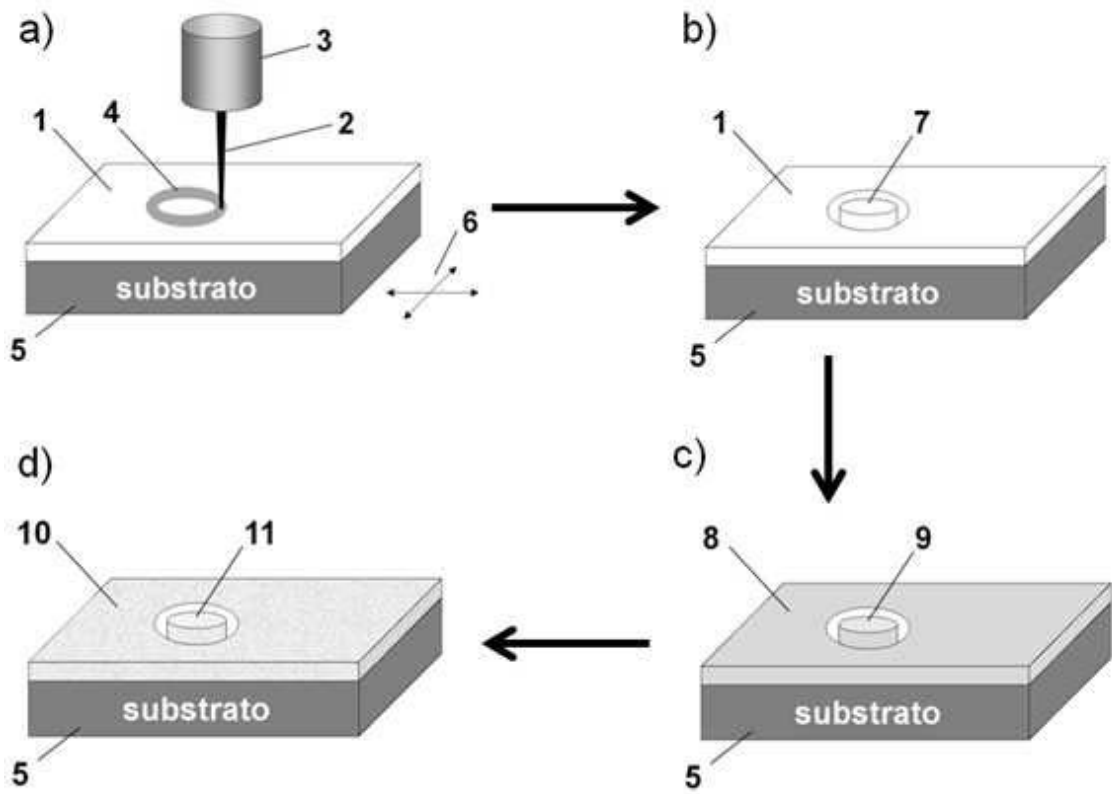


Figura 1

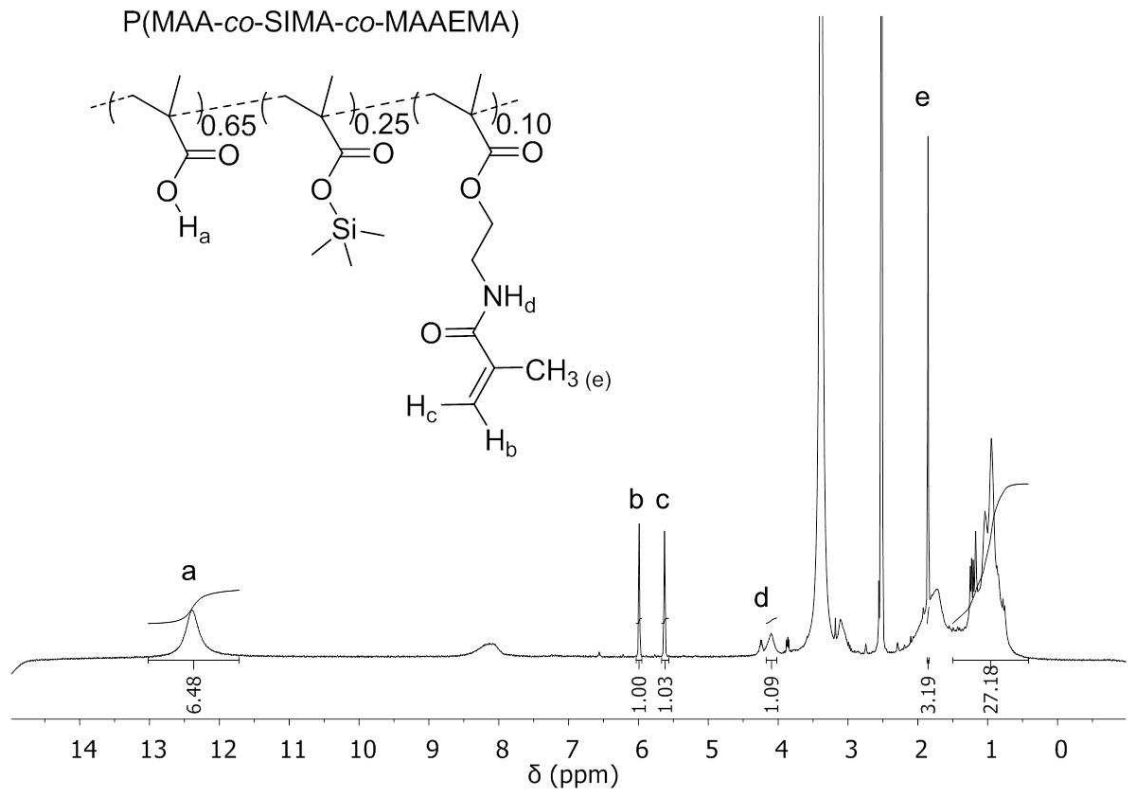


Figura 2

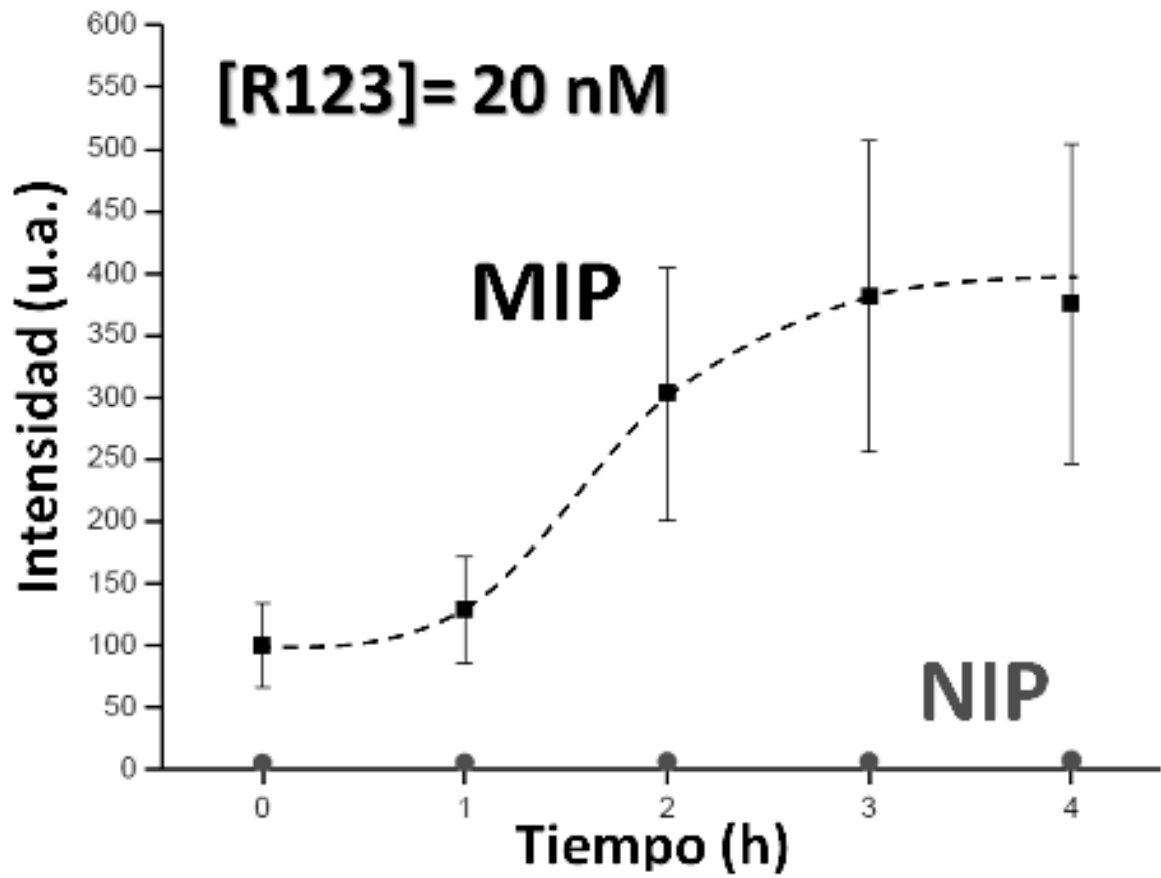


Figura 3

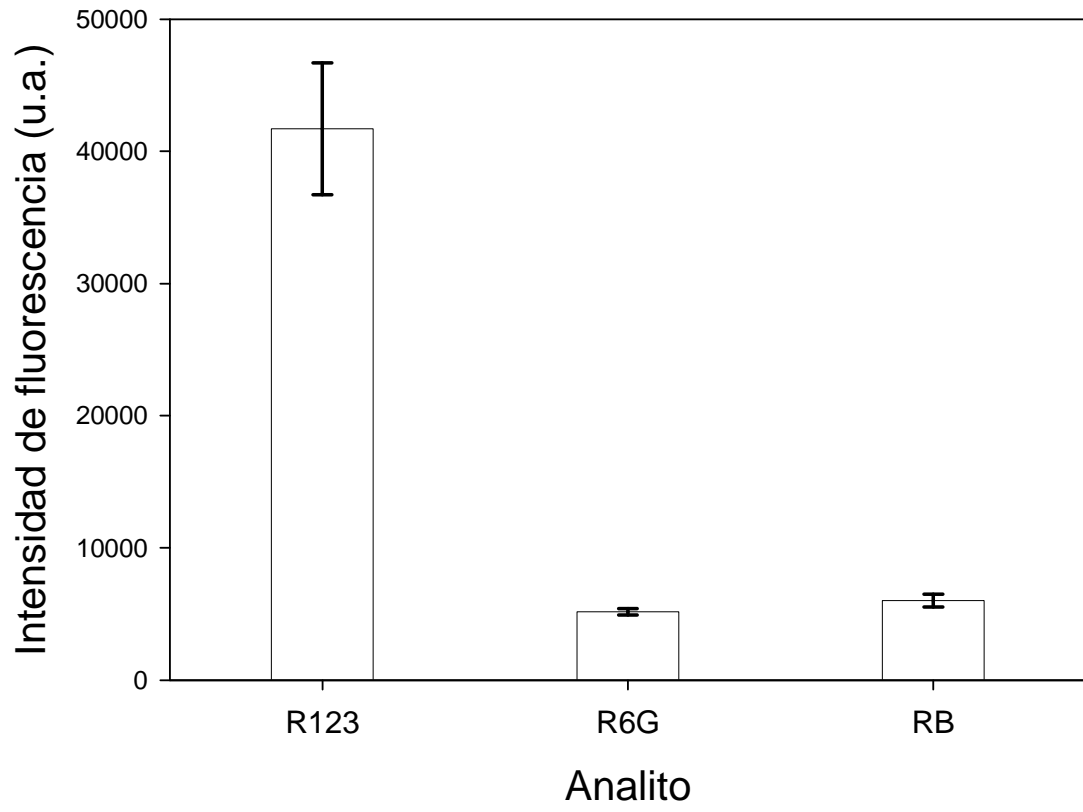


Figura 4



②① N.º solicitud: 201330947

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2002059184 A2 (VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY) 01.08.2002, página 1, líneas 8-13; página 8, líneas 15-17; página 9, línea 20 – página 10, línea 9; página 12, líneas 11-28; página 13, líneas 16-18; página 20, línea 28 – página 21, línea 2.	12
X	US 20060079648 A1 (LUTSEN, L. & VANDERZANDE, H.) 13.04.2006, párrafos [0002],[0034]-[0037],[0046],[0048],[0054],[0056].	12
X	WO 2009118525 A1 (CRANFIELD UNIVERSITY) 01.10.2009, página 1, líneas 4-6; página 11, líneas 6-9; página 13, línea 21 – página 14, línea 7; página 15, líneas 5-23; página 30, ejemplo 9; página 32, ejemplo 12; reivindicaciones; figura 2.	12
A	WO 1996041235 A1 (THE STATE OF OREGON & ADVANCED MICROBIOTICS CORPORATION) 19.12.1996, página 2, línea 26 – página 3, línea 2; página 9, líneas 9-17; páginas 14-16, tabla 2; página 18, ejemplo 4.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.10.2013

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B01J20/26 (2006.01)

B01J20/30 (2006.01)

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B01J, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, TXTE, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, NPL, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones 13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones 13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2002059184 A2	01.08.2002
D02	US 20060079648 A1	13.04.2006
D03	WO 2009118525 A1	01.10.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un método de obtención de una estructura de **polímero de impronta molecular** en varias etapas y una **estructura** de polímero de impronta molecular que presenta un área polimerizada funcional parcial.

El documento D01 divulga un método de obtención de partículas poliméricas de impronta molecular que pueden unirse selectivamente a compuestos específicos (ver página 8, líneas 15-17), y que utiliza un propelente como disolvente y agente dispersante (ver página 1, líneas 8-13). En la primera etapa una corriente de partículas se somete a una fuente de energía (radiante o calor) suficiente para provocar una polimerización inicial, en la que la viscosidad de las partículas aumenta y comienza a establecerse su morfología física. De esta manera se llega a **partículas parcialmente polimerizadas** que comprenden la molécula patrón o analito que, en una segunda etapa, se depositan sobre la superficie de un soporte, donde se someten nuevamente a energía, lo que da lugar a la polimerización total de la matriz de partículas directamente sobre el soporte (ver página 12, líneas 11-28). El analito se extrae después de la formación de las partículas poliméricas, utilizando un exceso de propelente o cualquier otro fluido supercrítico (ver página 13, líneas 16-18). Como patrón puede utilizarse cualquier molécula o sustrato químico o biológico (toxina, carcinógeno, antígeno, enzima, etc.) que pueda ser liberado desde un polímero formado a partir de los monómeros y que incluya dicho sustrato, lo que permite la aplicación del polímero en biología o biotecnología (ver página 9, línea 20-página 10, línea 9). La técnica permite la deposición del polímero de impronta molecular sobre la superficie de un dispositivo utilizando una máscara temporal que cubra zonas específicas que deban quedar sin recubrimiento, de forma que **las partículas se unan sólo a las zonas deseadas** de la superficie (ver página 20, línea 28-página 21, línea 2).

Por tanto, el objeto de la invención, tal y como se define en la reivindicación **13**, no es nuevo según lo divulgado en el documento D01 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

Sin embargo, el procedimiento divulgado en el documento D01 se diferencia del de la invención principalmente en que en este último la polimerización se lleva a cabo sobre una película de los precursores del polímero situada sobre un sustrato, utilizando como disolvente tetrahidrofurano, metanol y/o isopropanol. Por otro lado, el procedimiento del documento D01 utiliza máscaras para dejar zonas de la superficie sin recubrir.

El documento D02 divulga un procedimiento para la preparación de polímeros conjugados de impronta molecular utilizando iniciadores conjugados, así como los dispositivos electrónicos que comprenden dichos polímeros (ver párrafo [0002]). En la primera etapa de reacción se hace reaccionar un monómero que comprende un grupo iniciador (como ditiocarbamato) con un compuesto básico, en presencia de un disolvente orgánico, para obtener un polímero precursor (párrafo [0037]). Dicho polímero precursor, en una segunda etapa, por calentamiento de una película formada por "spin coating", se transformará en un **polímero "parcialmente conjugado"** que todavía posee grupos iniciadores que no han reaccionado (ver párrafos [0034]-[0036]). El polímero parcialmente conjugado puede dar lugar, por polimerización radicalica bajo radiación UV, a polímeros de impronta molecular (ver párrafo [0046]), por reacción con monómeros funcionales y en presencia de una molécula patrón, que puede ser orgánica o inorgánica (anticuerpos, antígenos, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, etc.) (ver párrafo [0048]). Después de una etapa de lavado se puede obtener el polímero de impronta molecular con cavidades libres, una vez liberada la molécula patrón (ver párrafo [0054]), lo que permite el uso de dicho polímero en sensores químicos y biológicos (ver párrafo [0056]).

En consecuencia, se considera que el objeto de la reivindicación **13**, según se define en la solicitud, no presenta novedad a la luz de lo divulgado en el documento D02 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

Por otro lado, el procedimiento divulgado en el documento D02 se diferencia del de la invención, entre otras características, en que en este último la mezcla precursora del polímero de impronta molecular utilizada en la primera etapa del proceso incluye los monómeros correspondientes, el analito y el disolvente.

El documento D03 divulga polímeros que incluyen cadenas conjugadas (ver página 1, líneas 4-6) que, si se preparan en presencia de un patrón molecular o macromolecular, dan lugar a polímeros de impronta molecular, de forma que una vez eliminado dicho patrón, los polímeros comprenden cavidades complementarias al patrón en tamaño, forma y funcionalidad, por lo que son útiles como sensores para reconocimiento (ver página 13, línea 21-página 14, línea 7).

Los polímeros divulgados se preparan mediante una **polimerización o copolimerización en dos etapas** de un monómero que comprende dos grupos funcionales reactivos, de forma que la primera polimerización tiene lugar sobre uno de los grupos funcionales, dando lugar a una cadena polimérica conjugada que, en la posterior etapa de polimerización, que afecta al segundo grupo funcional, proporciona el polímero final (ver página 11, líneas 6-9; figura 2; página 30, ejemplo 9; página 32, ejemplo 12). En una realización particular recogida en este documento, sobre una película de un monómero que comprende dos grupos funcionales reactivos junto a un iniciador y que ha sido generada mediante "spin-coating", se realiza una primera polimerización iniciada mediante irradiación a través de una máscara que da lugar a un modelo litográfico, de forma que el tratamiento con un disolvente después de la exposición provoca la disolución selectiva de los monómeros frente al polímero (ver página 15, líneas 5-23; reivindicaciones).

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicación **13**, tal y como se define en la solicitud, no es nuevo a la luz de lo divulgado en el documento D03 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

Sin embargo, el procedimiento de la invención se diferencia del divulgado en el documento D03, principalmente, en que este último se basa en la polimerización secuencial de dos grupos funcionales con diferente reactividad presentes en el monómero (además del uso de máscaras), en lugar de en la irradiación parcial de la mezcla.

En consecuencia, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia un método de obtención de una estructura de polímero de impronta molecular en varias etapas como el de la invención, que comprende la irradiación de la mezcla precursora con un haz de electrones, la eliminación de las moléculas afectadas con un disolvente químico, la polimerización de la película resultante y la extracción del analito de dicha película polimerizada.

Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-12** reúne, respecto al estado de la técnica, los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.