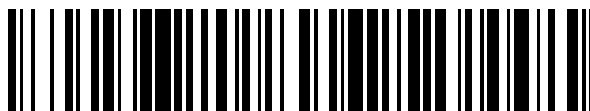


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 554**

51 Int. Cl.:

C08F 293/00 (2006.01) **C08F 8/30** (2006.01)

C08F 220/00 (2006.01)

C08F 2/48 (2006.01)

C08F 2/38 (2006.01)

C07C 333/20 (2006.01)

C07D 249/04 (2006.01)

B01J 20/26 (2006.01)

C08F 222/10 (2006.01)

C08F 8/14 (2006.01)

C08F 8/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2009 E 09737043 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2342247**

54 Título: **Método de preparación de polímeros de impresión molecular (PIM) mediante polimerización por radicales**

30 Prioridad:

05.09.2008 FR 0804874

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE DE COMPIÈGNE
- UTC (100.0%)
Rue Roger Couttolenc, B.P. 20529
60205 Compiègne Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**HAUPT, KARSTEN;
CUTIVET, ARNAUD;
TSE SUM BUI, JEANNE BERNADETTE y
ÇAKIR, PINAR**

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

ES 2 569 554 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

Método de preparación de polímeros de impresión molecular (PIM) mediante polimerización por radicales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de preparación de un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) mediante polimerización por radicales usando al menos un iniciador que comprende al menos dos funciones químicas capaces de formar radicales reactivos, y por tanto obtener una concentración localmente elevada de radicales que permite iniciar la polimerización sobre o alrededor de la entidad o molécula de impresión.

La presente invención también se refiere a los polímeros de impresión(s) molecular(s) (PIM) susceptibles de obtención con el método de la invención así como a su uso en la realización de biosensores biomiméticos, biochips biomiméticos, sensores químicos, dispositivos de separación por adsorción específica, así como revestimiento en particular para la liberación de productos activos.

En la descripción que sigue a continuación, las referencias entre corchetes ([]) se refieren al listado de referencias presentado al final del texto.

20 Estado de la técnica

Los sensores químicos o los biosensores son dispositivos que permiten retener al menos temporalmente una sustancia química o biológica a detectar y/o cuantificar como por ejemplo la medida o detección de un gas (medida de la contaminación, reactivos químicos, etc.), la detección de un principio activo (fármaco, herbicida, etc.), detección de sustancias humanas o animales (células, proteínas, etc.), virus, etc.

Los biosensores y las fases estacionarios de separación por afinidad disponibles en la actualidad usan a menudo biomacromoléculas o macromoléculas biológicas como elementos de reconocimiento específicos, en particular anticuerpos, enzimas o ácidos nucleicos. Dichas biomacromoléculas presentan una baja estabilidad química y física, en particular a disolventes orgánicos, ácidos y bases, temperaturas elevadas. Las biomacromoléculas son caras y difíciles de obtener, y difíciles de integrar en procesos de fabricación industriales. En este contexto, el uso de polímeros y/o copolímeros que presentan uno o varios tipos de impresión(s) molecular(s) (PIM) se impone como una alternativa a estas biomacromoléculas. Se trata de materiales biomiméticos que reproducen la capacidad de reconocimiento molecular que se observa en ciertas macromoléculas biológicas [1].

Ya existen polímeros que presentan uno o varios tipos de impresión(s) molecular(s) (PIM). Sin embargo, su uso práctico se ve obstaculizado por una aplicación demasiado compleja como la forma óptima para la aplicación prevista.

La síntesis de polímeros mediante polimerización por radicales usando concentraciones relativamente bajas de iniciador y monómeros, como en el caso del iniciador inmovilizado en un soporte sólido [2] o una solución diluida para la síntesis de microgeles y nanogeles [3] ya se ha descrito. El polímero obtenido presenta en general una forma de "fractal", no lo suficientemente denso para su adaptación a la síntesis de PIM [4].

Para la síntesis de polímeros de impresión molecular en forma de microgeles, se ha propuesto superar este inconveniente mediante el uso de una concentración elevada de reactivos en una primera etapa, para diluir la solución justo antes de la macrogelación para obtener microgeles densos [5]. Este enfoque es, sin embargo, delicado y difícil de realizar, especialmente en un contexto industrial, por el hecho de que parece difícil conseguir un aumento de escala de forma reproducible.

Por lo tanto, existe una necesidad real de un método de preparación de polímeros de impresión(s) molecular(s) (PIM) que permitan superar estas desventajas, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior.

En particular, hay una necesidad real de un método que sea reproducible, que se pueda realizar a escala industrial, que permita la preparación de polímeros de impresión(s) molecular(s) (PIM) de manera densa y localizada, a escala micro o nanométrica, que, además, pueda permitir un control del tamaño, de la morfología y de la forma de los polímeros (PIM) obtenidos.

60 Descripción de la invención

La presente invención tiene como objetivo precisamente responde a esta necesidad proporcionando un método de preparación de un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) mediante polimerización por radicales en el que:

a) se pone en contacto:

- al menos una entidad o molécula de impresión ;

- monómeros idénticos o diferentes, capaces de formar el polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM);
- al menos un iniciador que comprende al menos dos funciones químicas (F1) capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización de dichos monómeros sobre o alrededor de dicha entidad o molécula de impresión;

- 5 b) la polimerización se realiza bajo la acción de un haz luminoso de longitud de onda visible o UV o bajo la acción de un aporte de energía térmica formando de este modo sobre o alrededor de dicha entidad o molécula de impresión un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) ;
- 10 c) se elimina el o los monómeros no polimerizados y/o toda o parte de la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) con un disolvente o una mezcla de disolvente(s) apropiado(s).

15 El método de polimerización de acuerdo con la invención aplica un nuevo tipo de iniciador para la preparación de polímeros de impresión(s) molecular(s) (PIM) que permite la generación localizada de un número elevado de radicales y un buen control del tamaño, la forma y la morfología de las cadenas macromoleculares durante la polimerización.

Esto permite mejorar las propiedades de los polímeros (PIM) y por lo tanto optimizar a la vez la selectividad del reconocimiento y la sensibilidad de la respuesta de un dispositivo basado en un polímero de este tipo (PIM).

20 La obtención del polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) se basa en el principio de impresión molecular. La impresión molecular es una técnica bien conocida por el experto en la materia. En general, esta consiste, en su principio fundamental de crear imágenes complementarias de una molécula en un material, en generar un polímero sintético. La o las moléculas o entidades con respecto a las que se deben generar las impresiones (molécula o entidad de impresión en el contexto de la presente invención) se ponen en contacto con una mezcla de monómeros

25 que portan grupos funcionales capaces de formar complejos con dicha o dichas moléculas o entidades mediante enlaces no covalentes, mediante enlaces de coordinación o mediante enlaces covalentes reversibles.

30 Como se explicará con más detalle a continuación, es fundamental que la naturaleza del enlace de cada entidad o molécula de impresión con el PIM sea reversible para poder, en condiciones determinadas, liberar o desvincular dicha o dichas entidades o moléculas del polímero o materiales de impresión(s) que se desea sintetizar y que a continuación servirá para detectar, captar y/o liberar las sustancias relevantes en función de la aplicación o del uso deseado.

35 En la descripción, los términos polímero y material de impresión(s) molecular(s) se pueden usar indistintamente. Por polímero o material, en el contexto de la presente invención, hay que entender todos los tipos de polímeros, homopolímeros (sintetizados a partir de un solo tipo de monómero y cuyos motivos de repetición también son de naturaleza química) y copolímeros (un polímero que contiene varios tipos de motivos de repetición) orgánicos o inorgánicos usados normalmente para este tipo de técnica.

40 En el contexto de la invención, un radical es una especie química que posee uno o varios electrones no emparejados. La presencia de un electrón individual confiere a estas especies una gran reactividad, lo que significa que éstas tienen la posibilidad de reaccionar con otros compuestos.

45 Además, continuando con la descripción, los términos « fijarse » y « unirse » se usan indistintamente para hacer referencia al enlace que se forma entre los átomos o moléculas. Según el caso, se puede tratar de enlace: covalente, de coordinación, hidrógeno, biónico, Van der Waals, o una interacción hidrófoba. Según el caso, el enlace puede ser reversible o no.

50 En el contexto de la presente invención, por dendrón se entiende una molécula arborescente construida mediante procesos repetitivos (que se pueden producir varias veces) a partir de una molécula que comprende, por un lado, un sitio que tiene ramificaciones provistas de extremidades reactivas y, por otra parte, un sitio apto para su fijación sobre un soporte molecular o sólido. El tamaño del dendrón es función del número de repeticiones también denominado generación. Cuanto más elevado es el número de repeticiones o generaciones, más grande será el tamaño del dendrón. Una generación x corresponde a x repeticiones, siendo x un número entero que corresponde al

55 número de repeticiones. Cuando más importante sea la generación de dendrones, más importante será número de extremidades reactivas.

60 Por dendrítica se entiende una estructura de tipo dendrón. El término iniferter (en inglés « Initiator - Transfer Agent - Terminator » y en francés « Agent Initiateur, de Transfert et de Terminaison ») que se refiere a un tipo de iniciador de polimerización viva por radicales tal como se describe en la referencia [6].

Como se indica, la polimerización de los monómeros se puede realizar sobre la entidad o molécula de impresión o alrededor de la misma.

65 La polimerización se realiza sobre la entidad o molécula de impresión cuando el polímero o los polímeros formados se unen directamente a dicha entidad molecular y no la recubren más que parcialmente. Esto se puede producir en

particular cuando la entidad o molécula de impresión y el o los polímeros formados tienen dimensiones parecidas. Esto se puede observar, por ejemplo, si un polímero (PIM) en forma de partículas de tamaño nanométrico se sintetiza para una proteína como molécula de impresión que por sí misma tiene un diámetro de algunos nanómetros. Esto también se puede producir cuando la entidad o molécula de impresión se fija sobre un soporte durante la síntesis del polímero (PIM) et y por lo tanto tiene una accesibilidad limitada.

La polimerización se realiza alrededor de la entidad o molécula de impresión cuando el o los polímeros formados se unen directamente a dicha entidad o molécula y la recubren completamente al final de la polimerización. Un ejemplo es un polímero (PIM) en forma de nanopartículas para una molécula de impresión pequeña como un aminoácido; en este caso, el polímero (PIM) tiene un tamaño superior a uno o varios órdenes de magnitud que la molécula de impresión.

En la etapa a), la entidad o molécula de impresión está destinada a generar, en el polímero, impresiones moleculares, dando como resultado un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM). En el contexto de la invención, se denomina entidad o molécula diana a la entidad o molécula destinada a su unión de manera reversible al polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) durante su uso.

La entidad o molécula de impresión puede ser idéntica a la entidad o molécula diana. También puede ser un derivado de estructura y formas parecidas a las de la entidad o molécula diana. La entidad o molécula de impresión de nuevo puede corresponder solamente a una parte de la entidad o molécula diana.

En el método de la invención se puede usar cualquier tipo de entidad o molécula de impresión.

De forma más particular, la entidad o molécula de impresión puede seleccionarse del grupo que comprende:

- aminoácidos, osas, lípidos, nucleósidos, nucleótidos, oligómeros y polímeros obtenidos a partir de estas entidades o moléculas, en particular péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos y polisacáridos,
- entidades o moléculas biológicamente activas, en particular medicamentos, en particular antibióticos, hormonas esteroideas, vitaminas, toxinas, enzimas, agentes de dopaje, pesticidas, insecticidas, fungicidas y herbicidas,
- sustancias explosivas,
- sustancias tóxicas,
- disruptores endocrinos,
- micotoxinas o toxinas bacterianas,
- nanopartículas,
- células de bacterias procariotas y eucariotas
- células animales, en particular células de levaduras, células de hongos y células animales y humanas
- células vegetales,
- virus, y
- tejidos celulares.

La entidad o molécula de impresión puede seleccionarse, de forma más particular, del grupo que comprende tripsina, calicreína, S-propranolol, teofilina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, beta-estradiol, testosterona, atrazina, morfina, cocaína, tetrahidrocannabinol.

En el contexto de la presente invención, es posible fabricar materiales que no presentan más que un solo y único tipo de impresión (destinado a no fijar más que una sola entidad o molécula interesa, al igual que se pueden predecir varios tipos diferentes de impresiones (por ejemplo, para una serie de moléculas de naturaleza o de tamaño similar o que tengan un mismo tipo de funcionalidad química o de receptor biológico), sea cual sea la densidad de la impresión o de los diferentes tipos de impresiones presentes en la superficie y/o en el material (jaula, red tridimensional), es decir, el número de impresiones por m^2 o m^3 .

Naturalmente, se puede variar la densidad de acuerdo con el tipo de impresión si se está en presencia del material que posea varios tipos de impresiones diferentes.

De acuerdo con un modo de realización en particular, en la etapa a), además de la entidad o molécula de impresión, también se puede añadir un sustrato, preferentemente sólido. En este modo de realización, la entidad o molécula de impresión, el iniciador y/o polímero de impresiones moleculares (PIM), en el transcurso de la formación, se pueden fijar sobre este sustrato.

En el contexto de la invención, por sustrato se hace referencia a cualquier material sólido, soluble o no, o cualquier material líquido, que pueda servir de soporte que permita la fijación del iniciador y/o del polímero (PIM).

El sustrato puede ser, de forma ventajosa, un sustrato de soporte homogéneo e isotrópico, o un material no homogéneo o de tipo compuesto.

El sustrato puede seleccionarse del grupo que comprende vidrio, cuarzo, mica, silicio, germanio, carburo de silicio,

óxido de estaño-indio, dióxido de titanio, óxido de aluminio, un polímero orgánico opcionalmente reticulado en particular poliestireno, poli(estireno-co-metacrilato), poli(metacrilato de metilo), poli(acrilonitrilo), una poliamida, un poliéster, un poliuretano, poli(dimetilsiloxano), polibutadieno, o un metal, en particular oro, plata, platino, o un compuesto de dos o varios de estos materiales.

5 Para la realización del método de acuerdo con la invención, puede convenir cualquier monómero que comprenda al menos una función polimerizable mediante polimerización por radicales. El experto en la materia sabrá seleccionar fácilmente los monómeros conocidos por sí mismos, que se adaptarán a la realización del método de acuerdo con la invención.

10 De forma más particular, en el método de acuerdo con la invención, los monómeros portan grupos funcionales capaces de formar enlaces reversibles con dicha o dichas entidades o moléculas de impresión, mediante uno o varios enlaces no covalentes de tipo hidrógeno, iónico van der Waals, o mediante interacción hidrófoba, o mediante uno o varios enlaces de coordinación, o covalentes.

15 Los monómeros de acuerdo con la invención pueden ser «monómeros de fijación» opcionalmente en mezcla con «monómeros de reticulación».

20 En el contexto de la invención, por «monómero de fijación» se hace referencia a un monómero capaz de formar, de manera reversible, al menos un enlace débil, de coordinación y/o covalente con la entidad o molécula de impresión, asegurando de este modo un enlace reversible entre dicha entidad o molécula de impresión y el polímero de impresión molecular obtenido al final del método.

25 El enlace débil, de coordinación y/o covalente, entre el monómero de fijación y la entidad o molécula de impresión, se puede formar con una función seleccionada del grupo que comprende las funciones hidroxilo, ácido, éster, amida, amina, tiol, éter, amidina, guanidina, aldehído y cetona, urea, tiourea, piridina, imidazol, quelato metálico, estando presente dicha función en el monómero de fijación y/o en el monómero de reticulación.

30 Por «monómero de reticulación», se hace referencia a un monómero bi o multifuncional que comprende al menos dos funciones polimerizables mediante polimerización por radicales, capaz de formar de manera permanente, enlaces covalentes, con otros monómeros de fijación y/o de reticulación conduciendo de este modo a un polímero con una red polimérica tridimensional que constituye el polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM).

35 En la etapa a), los monómeros, ya sea de fijación o de reticulación, pueden comprender al menos una función vinilo u otra función etilénica adaptada para una polimerización por radicales.

Preferentemente, estos monómeros que comprenden al menos una función vinilo se eligen entre el grupo que comprende:

- 40 - ácido metacrílico, ácido trifluorometilacrílico, ácido acrílico, ácido itacónico, ácido estirenosulfónico, ácido acrilamidopropanosulfónico, ácido 4-vinilfenilborónico, ácido 4-vinilbenzoico, acrilato de carboxietilo, metacrilato fosfato de hidroxietilo, 2-vinilpiridina, 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol, 4(5)-vinilimidazol, le metacrilato de 2-aminoetilo, metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo, acrilato de aminoetilo, cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de glicidilo, acrilamida, metacrilamida, isopropilacrilamida, 4-vinilbenzamidina, 4-metacrilamidobenzamidina, estireno, metacrilato de fenilo, metacrilato de ciclohexilo, metacrilato de metilo, metacrilato de butilo, metacrilato de hexilo, metacrilato de octilo, dimetacrilato de metilenglicol, dimetacrilato de hexanodiol, trimetacrilato de trismetilopropano, dimetacrilato de polietilenglicol, dimetacrilato de trietilenglicol, triacrilato de pentaeritrol, divinilbenceno, bisacrilamida de etileno, bisacrilamida de metileno, bisacriloil piperazina, N,N-bisacriloilcistamina, bisacrilamida de N,N-1,2-dihidroxietileno, N,O-bismetacriloil etanolamina ;
- 50 - o una mezcla de los mismos.

Los monómeros de la invención también pueden seleccionarse del grupo que comprende monómeros híbridos que comprenden una función vinilo polimerizable mediante polimerización por radicales y una función de tipo silano polimerizable mediante un método de sol-gel, como por ejemplo 3-metacriloxipropil-trimetoxisilano.

60 Por método de sol-gel, se hace referencia a un método que conduce a la elaboración, a baja temperatura, de sólidos amorfos transparentes y densos, en los que se pueden introducir especies moleculares orgánicas permitiendo de este modo el desarrollo de nuevos materiales híbridos orgánicos-inorgánicos. Este tipo de método se describe en particular en [7].

Como se ha indicado anteriormente, en la etapa a), se usa al menos un iniciador que comprende al menos dos funciones químicas capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización.

5 Por lo tanto, el iniciador usado es un iniciador de polimerización por radicales que comprende de forma ventajosa al menos dos, incluso varias funciones químicas que pueden formar radicales de forma simultánea. Al mismo tiempo, este iniciador puede comprender de forma ventajosa una o varias funciones químicas (F2) que le permiten fijarse de manera covalente o no covalente sobre la o las entidades o moléculas de impresión de la impresión molecular, o sobre un sustrato. De este modo, la presente invención permite preparar polímeros de impresión(s) molecular(s) de manera densa y localizada sobre o alrededor de la o las entidades o moléculas de impresión.

10 Como se ha indicado anteriormente, en la etapa a), se usa al menos un iniciador que comprende al menos dos funciones químicas (F1) capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización de los monómeros sobre o alrededor de la entidad o molécula de impresión.

15 El iniciador puede comprender hasta 64 funciones (F1), preferentemente de 2 a 16, y más preferentemente de 4 a 8 funciones químicas (F1) capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización de los monómeros sobre o alrededor de la entidad o molécula de impresión.

20 Las funciones químicas (F1) del iniciador capaz de formar radicales que permiten iniciar la polimerización pueden proporcionarse, por ejemplo, por un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- éteres de benzoína en particular metiléter de benzoína, feniléter de benzoína, butiléter de benzoína, isopropiléter de benzoína, acetofenonas en particular 2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona, 2-hidroxi-2-metil-1-fenil-propan-1-ona o 2-metil-1-[4-(metiltio)fenil]-2-morfolinopropan-1-ona, benzofenonas sustituidas ;
- 25 - peróxidos sustituidos en particular bis(terc-butil ciclohexil)peroxidicarbonato, derivados de óxidos de fosfina en particular óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fenilfosfina, amino-cetonas, oxisulfonil-cetonas, sulfonil-cetonas o uno de estos derivados, y los compuestos de tipo azo en particular azo-bis-isobutironitrilo, azo-bis-dimetilvaleronitrilo, ácido 4,4'-azobis-cianoaléxico, 2,2'-azobis(2-amidinopropano) ;
- hidroxil-alquilaminas en particular metildietanolamina, bencilaminas, derivados de anilina, paradimetilaminobenzoato de etilo, N-fenilglicina (NPG);
- 30 - ácido ascórbico ;
- un derivado de ditiocarbamato en particular bencil-N,N-dimetilditiocarbamato, bencil-N,N-dietilditiocarbamato, bencil-N,N-di(carboximetil)ditiocarbamato, bencil-N,N-di(2-hidroxi-etil)ditiocarbamato, bencil-N-metil-N-(2-hidroxi-etil)ditiocarbamato, bencil-N-metil-N-carboximetilditiocarbamato, di(benciléster) del bencil-N,N-di(carboximetil)ditiocarbamato.

35 No siendo este listado limitante, las funciones químicas (F1) del iniciador también pueden proporcionarse por cualquier otro compuesto capaz de formar radicales que permitan iniciar la polimerización.

40 El iniciador también puede comprender al menos una segunda función química (F2) que permita establecer un enlace débil, de coordinación y/o covalente entre dicho iniciador y la entidad o molécula de impresión.

45 Esta función (F2) puede asegurar de este modo un enlace reversible o irreversible entre el polímero de impresión(s) molecular(s) y la entidad o molécula de impresión.

50 Cuando se añade un sustrato, en particular un sustrato sólido soluble o no, o un sustrato líquido en la etapa a), esta segunda función (F2) también puede establecer un enlace débil, de coordinación y/o covalente entre el iniciador y dicho sustrato.

55 Esta segunda función química (F2) puede seleccionarse del grupo que comprende hidroxilo, ácido carboxílico, éster carboxílico, tioéster, amida, amina, tior, éter, amidina, guanidina, urea, tiourea, aldehído, cetona, alquilo, fenilo, bencilo, ácido iminodiacético, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético, un quelato metálico, en particular ácido iminodiacético-Cu, ácido iminodiacético-Co, ácido iminodiacético-Ni, ácido iminodiacético-Zn, ácido nitrilotriacético-Ni.

60 Preferentemente, las funciones químicas del iniciador son ácido carboxílico, benzamida.

De acuerdo con una primera variante, dicho método realiza la fijación del iniciador de polimerización sobre un sustrato de manera suficientemente densa. De este modo se obtiene una película con un espesor uniforme y homogéneo, espesor que es variable en función del tiempo de polimerización.

65 De acuerdo con una segunda variante, dicho método realizará fijación del iniciador de polimerización sobre un sustrato de manera bastante poco densa. De este modo se obtienen nanoestructuras o microestructuras unidas al sustrato, de dimensiones uniformes y de distribución homogénea. De esta manera se obtiene un producto denominado « estructurado », lo que permite responder a las demandas variadas que interesan a las diferentes ramas de la industria que usan este tipo de producto. Esto tiene como ventaja permitir la fabricación de estructuras

que optimicen la transducción de un sensor siempre aumentando la superficie específica del PIM.

De acuerdo con una tercera variante, dicho método poner en práctica el uso del iniciador de polimerización en solución con los monómeros y la entidad o la molécula de impresión. De este modo se obtienen polímeros de impresión(s) molecular(s) en forma de partículas esféricas o no esféricas de tamaño comprendido entre 10 nm y 100 μm, o nanogeles solubles de tamaño inferior a 1 μm.

En una cuarta variante de la invención, dicho método pone en práctica de forma ventajosa el uso de un iniciador que porta una o varias funciones químicas complementarias permitiéndole formar enlaces covalentes o no covalentes con la entidad o la molécula de impresión. De este modo, el iniciador de polimerización desempeñar al mismo tiempo el papel de un monómero de fijación, y las cadenas de polímeros se forman a partir de la entidad o de la molécula de impresión esto de manera localizada. La entidad o molécula de impresión se recubre de este modo completa o parcialmente con un polímero (PIM) suficientemente denso. De acuerdo con esta variante, el iniciador de polimerización está en solución con los monómeros y la entidad o la molécula de impresión.

En la etapa a), el iniciador puede estar en mezcla con un compuesto sensibilizador seleccionado del grupo que comprende:

- acridinas, en particular Acriflavina[®] o Naranja de Acridina[®], fenazinas, en particular Safranina O[®], oxazinas, tiazinas, en particular Azul de Metileno o tionina, xantenos, en particular Eosina Y[®], Rosa de Bengala[®] o Eritrosina[®], rodaminas, tioxantenos, polimetinas;
- derivados de tioxantona, en particular isopropiltioxantona o clortioxantona, cumarina o sus derivados, en particular cetocumarinas.

De forma ventajosa, la puesta en contacto de la etapa a) se realiza en presencia de al menos un agente porógeno apto para formar poros en el polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) que se desea obtener, preferentemente mediante adición de un disolvente o de una mezcla de disolvente(s) porógeno(s), o incluso mediante la adición de un agente porógeno en un disolvente en una solución en la que están presentes sustancias reactivas.

De este modo se obtiene un polímero de impresión(s) molecular(s) de estructura porosa, lo que facilita el acceso y/o la partida de las entidades o moléculas de impresión del polímero (PIM).

Preferentemente, el método de acuerdo con la invención usa al menos un agente porógeno que confiere al polímero (PIM) una estructura porosa cuyo diámetro de los poros está comprendido entre 0,1 nm y 10 μm, y preferentemente entre 1 nm y 1 μm. Más preferentemente con el disolvente porógeno puede ser un disolvente acuoso o no acuoso, orgánico o no. Preferentemente, la puesta en contacto de la etapa a) se realiza en presencia de al menos un disolvente porógeno seleccionado del grupo que comprende:

- benceno, tolueno, xileno, disolventes clorados, en particular cloroformo, diclorometano, dicloroetano y 1,1,2,2-tetracloroetano, y/o disolventes perfluorados, en particular hexafluorociclohexano, éteres, en particular tetrahidrofurano, dietilenglicol dimetil éter y trietilenglicol dimetil éter, amidas, en particular dimetilformamida y formamida, nitrilos, en particular acetonitrilo y capilonitrilo, cetonas, en particular acetona, ésteres, en particular acetato de etilo, alcanos, en particular hexano y heptano, alcoholes, en particular metanol, etanol, iso-propanol, butanol, decanol, agua;
- o una mezcla de los mismos.

El o los disolventes mencionados anteriormente pueden comprender, además, un agente co-porógeno en particular de naturaleza polimérica u otra, preferentemente un polímero lineal soluble en dicho disolvente, en particular polietilenglicol, alcohol de polivinilo, acetato de polivinilo, poliestireno, metacrilato de polimetilo. Este agente tendrá como función inducir y acelerar la formación de poros. Algunos agentes de este tipo también se describen en el documento [8].

Como se ha indicado anteriormente, en la etapa b) la polimerización se realiza bajo la acción de un haz luminoso de longitud de onda visible o UV o bajo la acción de un aporte de energía térmica para formar un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) sobre o alrededor de dicha entidad o molécula de impresión.

De acuerdo con otra característica, en la etapa b) el método de acuerdo con la invención usar radiaciones o haces luminosos en forma de un rayo o haz de rayos luminosos de longitud de onda visible o UV.

Por lo tanto, en la etapa b) la polimerización se realiza bajo la acción de un haz luminoso de longitud de onda visible o UV de una longitud de onda comprendida entre 100 nm y 1200 nm. Preferentemente, la longitud de onda está comprendida entre 150 nm y 750 nm, y más preferentemente entre 250 nm y 550 nm.

De acuerdo con otra característica, en la etapa b) la polimerización se realiza mediante un aporte de energía térmica que permite la activación del iniciador de polimerización. Esto se puede realizar, por ejemplo, colocando la mezcla de polimerización en una cámara termostática cuya temperatura se puede regular.

5 Por lo tanto, la polimerización se puede realizar en la etapa b) con un aporte de energía térmica a una temperatura comprendida entre 0 °C y 200 °C. Preferentemente, la temperatura está comprendida entre 25 °C y 100 °C, y más preferentemente entre 40 °C y 70 °C.

10 Preferentemente la polimerización se realiza sin modificar químicamente la o las entidades o moléculas de impresión.

15 Como se ha indicado anteriormente, en la etapa c) del método de acuerdo con la invención, el o los monómeros no polimerizados y/o toda o parte de la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) se elimina con un disolvente o una mezcla de disolvente(s) apropiado(s).

El disolvente puede seleccionarse del grupo que comprende agua, metanol, etanol, iso-propanol, acetonitrilo, cloroformo, heptano, tolueno, ácido acético, o sus mezclas, o CO₂ supercrítico. Preferentemente, el disolvente es una mezcla de metanol y de ácido acético.

20 Además de los disolventes indicados, la entidad o molécula de impresión también se puede eliminar del polímero formado en b) con otro agente o con otro tratamiento susceptible de facilitar la eliminación de la entidad o molécula de impresión.

25 De acuerdo con una variante de la invención, en la etapa c), además del disolvente o la mezcla de disolventes, la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) se puede eliminar con un disolvente o una mezcla de disolventes que contiene otro agente seleccionado del grupo que comprende:

- un detergente, en particular dodecilsulfato sódico, bromuro de cetil trimetilamonio, Triton X-100[®], Empigen BB[®];
- urea;
- 30 - ácido trifluoroacético ;
- trietilamina ;
- una enzima hidrolítica seleccionada del grupo que comprende una peptidasa o una proteasa, en particular tripsina o la proteinasa K;
- una nucleasa, en particular la nucleasa de *Staphylococcus aureus* o la ribonucleasa A;
- 35 - una lipasa, en particular, la lipasa pancreática porcina o la lipasa XIII de *Pseudomonas sp.*;
- una glucosidasa, en particular, beta-glucosidasa, alfa-glucosidasa, o beta-galactosidasa;
- una sal, en particular, tiosulfato sódico.

40 El experto en la materia reconoce el o los disolventes apropiado(s) y, si fuera el caso, el agente, en particular entre los mencionados anteriormente, para realizar la etapa c) en la que se elimina el o los monómeros no polimerizados y/o toda o parte de la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b).

45 De acuerdo con otra variante de la invención, además del disolvente, la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) se elimina aplicando un campo eléctrico comprendido preferentemente entre 1 V/cm y 100 V/cm. En esta variante, el polímero (PIM) está retenido por una membrana sin impermeable que la entidad o molécula de impresión puede atravesar.

50 La invención también tiene como objeto un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) susceptible de obtención con el método de la invención.

El polímero de impresión(s) molecular(s) susceptible de obtención mediante la realización del método de acuerdo con la invención se puede presentar en forma de una película de un espesor comprendido entre 1 nm y 100 μm, preferentemente en forma de una película de espesor constante o ligeramente constante.

55 También se puede presentar en forma de una película estructuran el espacio, que presenta preferentemente motivos geométricos cuyos diámetros o dimensiones laterales están comprendidos entre 1 nm y 10 μm.

60 Dicho polímero también se presentan en forma de partículas esféricas, en particular en forma de microperlas o nanoperlas esféricas en suspensión, o microgeles o nanogeles en solución, cuyo diámetro está comprendido preferentemente entre 1 nm y 100 μm.

65 El polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) susceptible de obtención de acuerdo con el método de la invención, puede tener una estructura porosa en la que el diámetro de los poros puede estar comprendido entre 0,1 nm y 10 μm.

Otro objeto de la invención es el uso de un polímero susceptible de obtención con el método de la invención en la

realización de biosensores biomiméticos, biochips biomiméticos, sensores químicos, dispositivos de separación mediante adsorción específica, como revestimiento para la liberación de productos activos en particular.

5 Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de un polímero de impresión(s) molecular(s) obtenido mediante la realización del método de acuerdo con la invención para la fabricación de un detector cualitativo y/o cuantitativo de la presencia de al menos una entidad o molécula diana en una muestra a analizar así como el detector obtenido mediante la realización del método de acuerdo con la invención.

10 La presente invención también se refiere a un polímero de impresión(s) molecular(s) obtenido mediante la realización del método de acuerdo con la invención para la fabricación de un sensor reversible de al menos una entidad o molécula diana así como el sensor reversible obtenido mediante la realización del método de acuerdo con la invención.

15 Por último, la presente invención se refiere al uso de un polímero de impresión(s) molecular(s) obtenido mediante la realización del método de acuerdo con la invención para la fabricación de un dispositivo de separación por afinidad para al menos una entidad o molécula diana así como el dispositivo de separación por afinidad obtenido mediante la realización del método de acuerdo con la invención.

20 La presente invención permite resolver el problema de la conformación, así como el problema de la morfología y la estructura interna, de materiales o polímeros de impresiones moleculares (PIM) con el objeto de fabricar, en particular, sensores químicos en el contexto mencionado anteriormente cuyo funcionamiento se basa en el principio de reconocimiento molecular.

25 El método de preparación de PIM también permite tener una estructuración en múltiples escalas, como una microestructuración y una nanoestructuración simultáneas. El método también permite obtener una nanoestructuración múltiple o una microestructuración múltiple, como una superposición de varias películas de PIM sobre una superficie, o estructuras esféricas o semiesféricas de tipo cubierta de núcleo (core-shell en inglés) o multicubierta de núcleo (core-multishell en inglés).

30 Esto permite optimizar a la vez la selectividad del reconocimiento y la sensibilidad de la respuesta de los dispositivos ha pasado sobre un material de PIM nanoestructurado de este tipo en dos escalas. Esto también permite optimizar las propiedades del material, o incorporar entidades que sirven para su identificación específica por vía fisicoquímica.

35 La invención también se refiere a los iniciadores de fórmulas *D1* (figura 2), *D2* y *D6* (figura 4), *D3* (figura 9), *D4* (figura 13), *D5* (figura 14) así como a su uso para la preparación de un polímero de impresión(s) molecular(s) mediante polimerización por radicales.

40 El experto en la materia incluso podrá encontrar otras ventajas con la lectura de los ejemplos que siguen a continuación, ilustrados con las figuras adjuntas, proporcionadas a modo ilustrativo.

Breve descripción de las figuras

- 45 - La figura 1 representa un esquema simplificado de la estructura general de iniciadores de polimerización foto o termosensibles de la presente invención.
- La figura 2 representa la estructura química y la ruta de síntesis de la molécula *D1*, la molécula iniciadora específica descrita en el ejemplo 1. *D1* se sintetiza sobre la base de una estructura dendrítica en la que la función (F2) en el núcleo que permite la formación de enlaces covalentes o no covalentes es una función carboxilo, y en la que las funciones (F1) en la periferia permiten generar radicales reactivos y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales son 8 funciones bencildietilditiocarbamato (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales).
- 50 - La figura 3 representa un esquema simplificado de la preparación de polímeros (PIM) en solución o en suspensión de acuerdo con la invención (ejemplo 2).
- La figura 4 representa la estructura química y la ruta de síntesis de la molécula *D2*, la molécula iniciadora específica usada en el ejemplo 2, así como la de la molécula *D6* (también identificada como 6). *D2* se sintetiza sobre la base de una estructura dendrítica en la que la función (F2) en el núcleo que permite la formación de un enlace covalente o no covalente unido al dendrón (generación 3) es una función carboxilo, y en la que las funciones (F1) en la periferia permiten generar radicales reactivos y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales son 8 funciones bencildietilditiocarbamato (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales). La molécula 6 o *D6* se sintetiza sobre la base de una estructura dendrítica en la que la función (F2) en el núcleo es una función acetileno que permite una fijación mediante « química de clic » (« click chemistry » en inglés) sobre otra entidad que comprende un grupo azida, y en la que las 8 funciones (F1) en la periferia son funciones bencildietilditiocarbamato que permiten generar radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales.
- 60 - Las figuras 5A y 5B muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (figura 5A) y de carbono (figura 5B) de *D2*.
- 65 -

- La figura 6 representa una fotografía, tomada mediante formación de imágenes en microscopía electrónica de transmisión de partículas de PIM, obtenida con el método de acuerdo con la invención y de acuerdo con el esquema de la figura 3 (en la parte superior), de acuerdo con el ejemplo 2 ; y para comparación, una fotografía, tomada mediante formación de imágenes en microscopía electrónica de transmisión de partículas de PIM, obtenida usando un iniciador de polimerización que contiene una sola función que permite generar radicales, bencildimetilditiocarbamato (en la parte baja), siendo el número total de funciones ditiocarbamato el mismo en los dos casos.
- La figura 7 representa un gráfico que muestra la variación de la adsorción de la molécula de impresión radioetiquetada con ^3H -S-propranolol sobre un polímero de impresión molecular (PIM) (símbolos redondos) o sobre un polímero de control no impreso correspondiente (símbolos cuadrados), en función de la variación de la concentración de los polímeros, de acuerdo con el ejemplo 2.
- La figura 8 representa un esquema simplificado de una variante del método con el objetivo de fabricar un polímero de impresión molecular (PIM) en forma de nanopartículas cuyo diámetro, comprendido entre 20 nm y 500 nm, es función del tiempo de polimerización para fijar tripsina de forma específica, de acuerdo con el ejemplo 3.
- La figura 9 representa la estructura química y la ruta de síntesis de la molécula *D3*, molécula iniciadora específica usada en el ejemplo 3. *D3* se sintetiza sobre la base de una estructura dendrítica (dendrón de generación 3) en la que la función (F2) en el núcleo que permite un acoplamiento mediante enlaces covalentes o no covalente es una función benzamidina unida al dendrón a través de un brazo espaciador, y en la que las funciones (F1) en la periferia que permiten generar radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales son 8 funciones bencildietilditiocarbamato (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales).
- La figura 10 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de *D3* (en la parte baja) y, para comparación, el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de *D2* antes del acoplamiento con el compuesto 9 (en la parte superior). Las flechas indican la desaparición de la señal de la función -COOH libre seguido del acoplamiento de *D2* con el compuesto 9.
- La figura 11 representa un esquema simplificado de una variante del método usado en la figura 3, en el que el iniciador está inmovilizado sobre una superficie (ejemplo 4).
- La figura 12 representa una fotografía, tomada mediante formación de imágenes en microscopía electrónica de transmisión de partículas de PIM obtenidas con el método de acuerdo con la invención y de acuerdo con el ejemplo 5 (en la parte superior) ; el gráfico de la parte media muestra el resultado de un análisis de las partículas mediante difusión dinámica de luz : la variación del porcentaje de la intensidad en función del tamaño de partícula; el gráfico de la parte inferior muestra la variación de la adsorción de la molécula de impresión radioetiquetada, ^3H -S-propranolol, sobre un polímero de impresión molecular (PIM) específico para el S-propranolol (símbolos redondos llenos) o sobre un polímero de control no impreso correspondiente (símbolos redondos vacíos), en función de la variación de la concentración de los polímeros, de acuerdo con el ejemplo 5.
- La figura 13 representa la estructura química de la ruta de síntesis de la molécula *D4*, la molécula iniciadora específica descrita en el ejemplo 1. *D4* se sintetiza sobre la base de una estructura dendrítica en la que las funciones (F1) en la periferia permiten generar radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales son 8 funciones di(benciléster) del bencil-N,N-di(carboximetil)ditiocarbamato (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales). A partir de la molécula *D4*, la molécula 11 se puede obtener mediante hidrogenólisis catalítica de funciones éster bencilico.
- La figura 14 representa la estructura química y la ruta de síntesis de la molécula *D5*, la molécula iniciadora específica descrita en el ejemplo 1. *D5* se sintetiza sobre la base de una estructura dendrítica en la que las funciones (F1) en la periferia permiten generar radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales son 8 funciones bencildietilditiocarbamato (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales).
- Las figuras 15A y 15B muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (figura 15A) y de carbono (figura 15B) de *D5*.

Ejemplos

En los ejemplos, una de las moléculas de impresión usadas como modelo para demostrar la impresión del material de polímero es el S-propranolol (beta-bloqueante). El interés de esta molécula reside, entre otros, en su quiralidad: si uno de los enantiómeros se usa para generar la impresión, el otro constituye un excelente control de la selectividad del polímero (PIM). Otra molécula de impresión usada es la tripsina. El interés de la tripsina es que se trata de una proteína que es una molécula mucho más grande que el S-propranolol.

La selectividad de los polímeros en brutos sintetizados para una molécula dada se puede caracterizar con la ayuda de diferentes medios: uso de marcadores fluorescentes o radiactivos (ensayos en el equilibrio), cromatografía gas líquido, o mediante métodos de espectroscopía basados en fluorescencia, absorción de luz ultravioleta, visible o infrarrojos, o con efecto Raman.

Se ha validado que el método de acuerdo con la invención se puede extender a otras mezclas polimerizables compatibles con la técnica de impresión molecular. El espesor de una película y, según el caso, la dimensión lateral de las micro o nanoestructuras de polímeros, y el diámetro de las micro o nanopérlas esféricas de PIM fabricadas

están directamente relacionadas con el tiempo de radiación y con la potencia de haz usado, o con el tiempo de calentamiento para el inicio mediante aportes de energía térmica. En estas condiciones, estas dimensiones se pueden fijar fácilmente entre algunos nm y algunos μm .

5 Ejemplo 1: Multiiniciadores de polimerización de acuerdo con la invención

La figura 1 muestra una representación esquemática del multiiniciador de polimerización que también porta una función que le permite unirse a un sustrato o a la entidad o molécula de impresión.

10 1.1. Iniciador D1

Un ejemplo de realización de un multiiniciador es la molécula *D1* descrita en la figura 2. Esta molécula se basa en una estructura dendrítica (dendrón de generación 3), que contiene en el núcleo una función (F2) que es una función COOH que permite el acoplamiento con la fijación, mediante enlaces covalentes o no covalentes (enlaces de hidrógeno o iónicos), de la molécula sobre un sustrato, una superficie, la entidad o molécula de impresión, y que contiene sobre su periferia funciones (F1) iniciadoras de polimerización viva por radicales de tipo iniferter (bencildietilditiocarbamato).

20 Síntesis de la molécula D1

Las etapas de síntesis, los reactivos usados y la estructura de la molécula *D1* obtenida se ilustran en la figura 2.

La molécula 1 (1 equivalente, 1 mmol, Sigma-Aldrich 530360) y la molécula 2 (1,2 equivalentes, 1,2 mmol, Sigma-Aldrich 228680) se disuelven en 20 ml de tetrahidrofurano (THF) en atmósfera de nitrógeno. La reacción evoluciona durante 4 horas con agitación a 70 °C en atmósfera de nitrógeno. La fase orgánica se lava con una solución saturada de cloruro sódico, se seca sobre sulfato de magnesio y se concentra. Una cromatografía sobre gel de sílice del residuo permite aislar el producto esperado, 3. La molécula 3 (0,9 mmol) se hace reaccionar con N,N-diciclohexilcarbodiimida (1,5 equivalentes, 1,8 mmol, Sigma-Aldrich 36650) en diclorometano (15 ml) a 25 °C durante 2 horas. Se forma un precipitado y se elimina por filtración sobre fritas. A continuación, el filtrado se concentra en el rotavapor para proporcionar el anhídrido 4. En presencia de 4-(dimetilamino)piridina (0,2 equivalentes/-OH, 1,3 mmol) y de piridina (5 equivalentes/-OH, 32 mmol), la molécula 4 (9,6 equivalentes, 7,7 mmol, 1,5 equivalentes/-OH) y el dendrón 10 (1 equivalente, 0,8 mmol, PFD-G3-COOH-OH de Polymer Factory) se disuelven en diclorometano (20 ml). La reacción evoluciona a 25 °C durante 24 horas. La fase orgánica se aclara con una solución acuosa de carbonato sódico al 10 % y una solución saturada de cloruro sódico, se seca sobre sulfato de magnesio, a continuación se filtra a presión reducida para proporcionar un aceite. Este último se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice (heptano/acetato de etilo a 40/60) para aislar el dendrón *D1* (0,4 mmol) con un rendimiento global de un 40 %.

40 1.2. Iniciadores D2 y D6

Otro ejemplo de realización de un multiiniciador es la molécula *D2* cuya estructura se describe en la figura 4. Esta molécula se basa en una estructura dendrítica (dendrón de generación 3), que comprende:

- en el núcleo, una función (F2) que es una función ácido carboxílico que permite una fijación mediante en enlaces covalentes o no covalentes y se une al dendrón a través de una rama, y
- en la periferia, 8 funciones (F1) que son funciones bencildietilditiocarbamato que permiten generar los radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales).

La molécula *D6* (también identificada como 6) cuya estructura se describe en la figura 4, es otro ejemplo de un multiiniciador. Esta molécula se basa en una estructura dendrítica (dendrón de generación 3), que comprende en el núcleo, una función (F2) que es una función acetileno que permite una fijación mediante « química de clic » (« click chemistry » en inglés) sobre otra entidad que comprende un grupo azida. Al igual que en *D2*, en la molécula 6 o *D6*, las 8 funciones (F1) que están en la periferia, son funciones bencildietilditiocarbamato que permiten generar los radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales.

La química de clic permite desarrollar un conjunto de reacciones potentes, reproducible, selectivas y modulables. Las principales reacciones de clic consisten en la formación de enlaces del carbono-heteroátomo energicamente muy favorables [11,12].

Las etapas de síntesis, los reactivos usados y la estructura de las moléculas *D2* y 6 o *D6* obtenidas se ilustran en la figura 4.

La preparación de las moléculas 3 y 4 se realiza de acuerdo con el protocolo descrito para el iniciador *D1*. A una solución de la molécula 4 (9,6 equivalentes, 7,7 mmol, 1,5 equivalentes/-OH) en diclorometano (20 ml) se le añade el dendrón 5 (1 equivalente, 0,8 mmol, PFD-G3-Acetileno-OH de Polymer Factory) y una solución de 4-dimetilaminopiridina (0,2 equivalentes/-OH, 1,3 mmol) en piridina (5 equivalentes/-OH, 32 mmol). La reacción

evoluciona a 25 °C durante 24 horas. La fase orgánica se lava con una solución acuosa de carbonato sódico al 10 % y con una solución saturada de cloruro sódico, se seca sobre sulfato de magnesio y a continuación se concentra. Una cromatografía sobre gel de sílice (heptano/acetato de etilo) permite aislar la molécula 6 o *D6* (0,3 mmol). Como compuesto intermedio de síntesis, la molécula 7 se prepara a partir de la molécula 8 (1 equivalente, 0,5 mmol) haciéndola reaccionar con azida de sodio (1,3 equivalente, 0,65 mmol) en dimetilsulfóxido (5 ml) mediante radiación de microondas durante 30 minutos a 120 °C [9]. A una solución de la molécula 6 o *D6* (1 equivalente, 0,3 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano/agua a 1/2 (10 ml) se añaden 1,2 equivalentes de la molécula 7 (0,4 mmol) en presencia de 0,1 equivalentes de CuSO₄ y de 0,3 equivalentes de ascorbato sódico. La reacción evoluciona a 25 °C durante 24 h. La molécula *D2* se purifica a continuación mediante cromatografía sobre gel de sílice y se obtiene con un rendimiento global de un 12 % (0,2 mmol).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y de carbono de la molécula *D2* se exponen en la figura 5.

1.3. Iniciador *D3*

Síntesis de la molécula *D3*

La molécula *D2* (1 equivalente, 0,2 mmol) se deja reaccionar con 1 equivalente de la molécula 9 en presencia de 0,2 equivalentes de 4-dimetilaminopiridina y de 1,2 equivalentes de N,N-diciclohexilcarbodiimida en diclorometano (10 ml) para formar la molécula *D3* que se purifica mediante cromatografía en columna.

La molécula 9 está disponible en el mercado.

La figura 9 muestra la estructura del iniciador de polimerización usado en este ejemplo, la molécula *D3*, y su ruta de síntesis a partir de *D2*.

La figura 10 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de *D3* (espectro de la parte inferior). El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de *D2* antes del acoplamiento con el compuesto 9 también se proporciona a modo comparativo (espectro de la parte superior). Las flechas muestran bien que la señal que corresponde a la función -COOH libre desaparece en *D3*, señal que está presente en *D2* antes de su acoplamiento con el compuesto 9.

1.4. Iniciador *D4*

Otro ejemplo de realización de un multiiniciador es la molécula *D4* cuya estructura se describe en la figura 13. Esta molécula se basa en una estructura dendrítica (dendrón de generación 3), que comprende:

- en el núcleo, una función (F2) que es una función acetileno que permite una fijación mediante « química de clic » (« click chemistry » en inglés) sobre otra entidad que comprende un grupo azida, y
- en la periferia, 8 funciones (F1) que son funciones di(benciléster) del bencil-N,N-di(carboximetil)ditiocarbamato que permiten generar los radicales reactivos, y por lo tanto iniciar una polimerización por radicales (iniciador de tipo iniferter para polimerización viva por radicales).

Síntesis de la molécula *D4*

Las etapas de síntesis, los reactivos usados y la estructura de la molécula *D4* obtenida se ilustran en la figura 13.

La molécula 1 (1 equivalente, 1 mmol, Sigma-Aldrich 530360) y la molécula 13 (1,2 equivalentes, 1,2 mmol) se disuelven en 20 ml de tetrahidrofurano (THF) en atmósfera de nitrógeno (La molécula 13 se obtiene a partir de N,N-di(carboximetil) ditiocarbamato de amonio, sintetizado anteriormente por G.R. Gale *et al.*, Ann. Clin. Lab. Sci. 1983, 13, 474-481 [10], que a continuación se esterifica con alcohol bencilico). La reacción evoluciona durante 4 horas con agitación a 70 °C en atmósfera de nitrógeno. La fase orgánica se lava con una solución saturada de cloruro sódico, se seca sobre sulfato de magnesio y se concentra. Una cromatografía sobre gel de sílice del residuo permite aislar el producto esperado, 3. La molécula 3 (0,9 mmol) se hace reaccionar con N,N-diciclohexilcarbodiimida (1,5 equivalentes, 1,8 mmol, Sigma-Aldrich 36650) en diclorometano (15 ml) a 25 °C durante 2 horas. Se forma un precipitado y se elimina por filtración sobre frit. A continuación, el filtrado se concentra en el rotavapor para proporcionar el anhidrido 4. A una solución de la molécula 10 (9,6 equivalentes, 7,7 mmol, 1,5 equivalentes/-OH) en diclorometano (20 ml) se le añade el dendrón 5 (1 equivalente, 0,8 mmol, PFd-G3-Acetileno-OH de Polymer Factory) y una solución de 4-dimetilaminopiridina (0,2 equivalentes/-OH, 1,3 mmol) en piridina (5 equivalentes/-OH, 32 mmol). La reacción evoluciona a 25 °C durante 24 horas. La fase orgánica se lava con una solución acuosa de carbonato sódico al 10 % y con una solución saturada de cloruro sódico, se seca sobre sulfato de magnesio y a continuación se concentra. Una cromatografía sobre gel de sílice (heptano/acetato de etilo) permite aislar la molécula *D4* (0,3 mmol). La molécula *D4* se purificaba a continuación mediante cromatografía sobre gel de sílice y se obtiene con un rendimiento global de un 13 % (0,2 mmol).

A partir de la molécula *D4*, la molécula 11 se puede obtener mediante hidrogenólisis catalítica de las funciones éster bencílico en la periferia de *D4*.

1.5. Iniciador *D5*

Un ejemplo de realización de un multiiniciador es la molécula *D5* descrita en la figura 14. Esta molécula se basa en una estructura dendrítica (dendrón de generación 3), que contiene en el núcleo una función (F2) que es una función carboxilato de bencilo (-COBz), y que contiene sobre su periferia funciones (F1) iniciadoras de polimerización viva por radicales de tipo iniferter (bencildietilditiocarbamato).

Síntesis de la molécula *D5*

Las etapas de síntesis, los reactivos usados y la estructura de la molécula *D5* obtenida se ilustran en la figura 14.

La molécula 1 (1 equivalente, 1 mmol, Sigma-Aldrich 530360) y la molécula 2 (1,2 equivalentes, 1,2 mmol, Sigma-Aldrich 228680) se disuelven en 20 ml de tetrahidrofurano (THF) en atmósfera de nitrógeno. La reacción evoluciona durante 4 horas con agitación a 70 °C en atmósfera de nitrógeno. La fase orgánica se lava con una solución saturada de cloruro sódico, se seca sobre sulfato de magnesio y se concentra. Una cromatografía sobre gel de sílice del residuo permite aislar el producto esperado, 3. La molécula 3 (0,9 mmol) se hace reaccionar con N,N-diciclohexilcarbodiimida (1,5 equivalentes, 1,8 mmol, Sigma-Aldrich 36650) en diclorometano (15 ml) a 25 °C durante 2 horas. Se forma un precipitado y se elimina por filtración sobre frit. A continuación, el filtrado se concentra en el rotavapor para proporcionar el anhídrido 4. En presencia de 4-(dimetilamino)piridina (0,2 equivalentes/-OH, 1,3 mmol) y piridina (5 equivalentes/-OH, 32 mmol), la molécula 4 (9,6 equivalentes, 7,7 mmol, 1,5 equivalentes/-OH) y el dendrón 12 (1 equivalente, 0,8 mmol, Pfd-G3-COBz-OH de Polymer Factory) se disuelven en diclorometano (20 ml). La reacción evoluciona a 25 °C durante 48 horas para proporcionar la molécula *D5*, que se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice (heptano/acetato de etilo a 40/60), con un rendimiento global de un 40 %.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y de carbono de la molécula *D5* se exponen en las figuras 15A y 15B.

Ejemplo 2: Polímero de impresión molecular (PIM) y método de preparación de acuerdo con la invención a partir del iniciador *D2*

Este ejemplo describe la síntesis de un polímero de impresión molecular (PIM) para la molécula diana S-propranolol usando el iniciador *D2*. *D2* es capaz de establecer enlaces con el S-propranolol, sirviendo este último como molécula de impresión. El método se representa de forma esquemática en la figura 3.

Síntesis del PIM

Tabla 1: Formulaciones y reactivos

Funciones	Productos	Cantidades usadas
Molécula de impresión	S-propranolol	3,0 mg
Monómero de fijación	ninguno, el iniciador actúa como monómero de forma simultánea	-
Monómero de reticulación	Dimetacrilato de etilenglicol	154,0 µl
Iniciador	<i>D2</i>	68,6 mg
Disolvente	Acetonitrilo	3 ml

Se prepara una solución A pesando 3,0 mg de S-propranolol que se disuelven en 1,5 ml de acetonitrilo y a continuación se añaden 154 µl de dimetacrilato de etilenglicol. El conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa.

Del mismo modo se prepara una solución B pesando 68,6 mg de *D2* que se disuelven en 1,5 ml de acetonitrilo.

De nuevo, el conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa.

En la oscuridad, la solución A se mezcla con la solución B en un tubo de ensayo de vidrio de 15 ml y el tubo se cierra con un tapón de separación. El tubo se coloca en hielo durante 10 min y a continuación se hace pasar argón en la solución a través de la separación durante 3 min.

El tubo se irradia con una lámpara de UV a 350 nm durante un periodo de tiempo dado para polimerizar (de 5 min. a 12 horas). Las perlas de polímero en suspensión obtenidas se incuban a 25 °C en mezclas de metanol/ácido acético a 4:1 (3 veces durante 1 h) y en metanol (3 veces durante 1 h). Este tratamiento permite liberar las impresiones del polímero a impresiones moleculares obtenidas.

La evolución del tamaño de las partículas de PIM es proporcional al logaritmo de la dosis luminosa usada para inducir la fotopolimerización. El diámetro se puede modular fácilmente entre 30 nm y 3 µm ajustando el tiempo de exposición.

5 Características y propiedades del PIM

La figura 6 ilustra una fotografía de partículas esféricas de PIM obtenidas de acuerdo con el método de la invención, mediante microscopía electrónica de transmisión (fotografía de la parte superior). Se puede observar que usando un iniciador multifuncional de acuerdo con la invención, las partículas formadas son densas y con un diámetro de aproximadamente 1,3 µm. En la figura 6, la fotografía de la parte baja muestra partículas de PIM obtenidas con un método que usa un iniciador monofuncional, bencildimetilditiocarbamato, siendo el número total de funciones ditiocarbamato el mismo en los dos casos. Parece claramente que de acuerdo con el método y en particular con el iniciador usado, los PIM resultantes no tienen el mismo tamaño, morfología forma.

- 15 Para evaluar el efecto de la impresión molecular, el PIM y un polímero de control químicamente idéntico pero sintetizado en ausencia de S-propranolol se incuban con propranolol etiquetado con tritio (³H-S-propranolol). Para esto, en dos series de tubos de ensayo de 1,5 ml se introducen cantidades crecientes (de 100 a 900 µg) de PIM y el polímero de control, respectivamente, suspendidos en acetonitrilo que contiene un 0,5 % de ácido acético. A esta suspensión se le añade 1 pmol de ³H-S-propranolol, y a continuación los tubos se incuban con agitación durante 2 h a 25 °C. Después de centrifugación, la radiactividad en el sobrenadante determina mediante recuento de centelleo en fase líquida. El valor obtenido corresponde al ³H-S-propranolol no unido al polímero, y la fracción unida se puede calcular mediante la diferencia entre la cantidad de ³H-S-propranolol encontrado en el sobrenadante y la cantidad de ³H-S-propranolol total añadido a cada tubo de ensayo.
- 20
- 25 Los resultados obtenidos se representan en el gráfico de la figura 7. Es claramente visible que el PIM adsorbe más ³H-S-propranolol que el polímero de control, por lo tanto se produjo una creación de sitios de reconocimiento mediante impresión molecular.

30 Ejemplo 3: Polímero de impresión molecular (PIM) y método de preparación de acuerdo con la invención a partir del iniciador D3

En analogía con el enfoque descrito en la parte de ejemplos, se sintetizó un PIM capaz de reconocer una proteína usando un iniciador dendrítico acoplado a una molécula de anclaje que permitía formar una interacción estable con la proteína (figura 8).

- 35 Como ejemplo no limitante, la proteasa tripsina se eligió como molécula de impresión, y uno de sus inhibidores conocidos, la benzamidina, como molécula de anclaje. La benzamidina se acopló con el grupo COOH del iniciador dendrítico D2 proporcionando de este modo la molécula D3.

40 Síntesis del PIM

Tabla 2: Síntesis y Formulación

Funciones	Productos	Cantidades usadas
Molécula de impresión	tripsina	17,2 mg
Monómero de fijación	metacrilato de hidroxietilo (HEMA)	54 mg
Monómero de reticulación	bisacrilamida de etileno (EBA)	128,7 mg
Iniciador	D3	2,7 mg
Disolvente	tampón de fosfato 20 mM a pH 7,0	3,5 ml

- 45 Se prepara una solución A pesando 17,2 mg de tripsina en 500 µl de tampón de fosfato 20 mM a pH 7,0 y a continuación se añade una solución de HEMA y EBA en 3 ml de tampón de fosfato 20 mM a pH 7,0. El conjunto se agita suavemente hasta una disolución completa.

En la oscuridad, se prepara de manera similar una solución B pesando 2,7 mg de D3 en DMSO (100 µl). El conjunto se agita de nuevo hasta una disolución completa.

- 50 En la oscuridad, la solución A se mezcla con la solución B en un tubo de ensayo de vidrio de 15 ml y el tubo se cierra con un tapón de separación, a continuación se agita suavemente durante 10 min a 4 °C. El tubo se coloca en hielo durante 10 min y a continuación se hace pasar argón en la solución a través de la separación durante 3 min.

- 55 El tubo se irradia con una lámpara de UV a 350 nm durante un periodo de tiempo dado, a 4 °C para polimerizar. Las perlas de polímero en suspensión obtenidas se incuban a 25 °C en una solución de urea 2 M (4 veces durante 1 h) para liberar las impresiones de las moléculas de impresión.

La evolución del tamaño de las partículas de PIM es proporcional al tiempo de fotopolimerización. El diámetro se puede modular fácilmente entre 10 nm y 3 µm ajustando el tiempo de exposición.

- 5 Para evaluar el PIM y confirmar el efecto de la impresión, las partículas se incuban en un tampón de tris(hidroximetil)aminometano 5 mM a pH 8,0 con una solución de tripsina a 0,6 mM en un tampón de tris(hidroximetil)aminometano 5 mM a pH 8,0 durante 2 h a 4 °C con agitación. Después de centrifugación para sedimentar las partículas, la concentración de tripsina en el sobrenadante se determina midiendo su actividad catalítica con la ayuda de un espectrofotómetro de doble haz de UV-visible o un espectrofotómetro de fluorescencia
10 usando respectivamente un sustrato cromogénico (cloruro de N_α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida) o un sustrato fluorogénico (cloruro de Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-metilcumarina).

Se observa que el PIM adsorbe más tripsina que el polímero de control, por lo tanto se produjo creación de sitios de reconocimiento mediante impresión molecular.

15 Ejemplo 4: Polímero de impresión molecular (PIM) asociado a una superficie sólida y método de preparación de acuerdo con la invención a partir del iniciador D2

- 20 En analogía con el enfoque descrito en el ejemplo 2, se sintetizó un PIM asociado directamente a una superficie de sustrato sólido. El ejemplo describe la síntesis sobre una superficie de vidrio de un PIM selectivo para el beta-bloqueante, S-propranolol. La formulación usada en este ejemplo es similar a la usada en el ejemplo 2, con la diferencia de que la molécula iniciadora D2 se inmoviliza químicamente en la superficie de un sustrato sódico antes de la polimerización (figura 11).

- 25 Sobre un sustrato de vidrio se deposita sucesivamente una primera capa de cromo de 2 nm de espesor como capa de indignación que sirve de forma ventajosa para ayudar al depósito de una segunda capa de oro de 47 nm de espesor. Las dos capas se pueden depositar mediante cualquier técnica conocida normalmente por el experto en la materia, preferentemente mediante evaporación. La superficie se incuba a continuación en una solución de 5 mM de cisteamina en etanol durante 8 h a 20 °C, a continuación se aclara con etanol y se seca con flujo de nitrógeno.
30 Después de la primera incubación, la superficie se incuba de nuevo en una solución que contiene el iniciador D2 (0,1 mmol), hidroxibenzotiazol (0,1 mmol) y N,N-diisopropilcarbodiimida (0,1 mmol) en 3 ml de DMF anhidra, con agitación durante 12 h a 20 °C. La superficie se aclara a continuación con DMF y a continuación con metanol, y se seca con flujo de nitrógeno.

35 Síntesis del PIM

Tabla 3: Formulaciones y reactivos

Funciones	Productos	Cantidades usadas
Molécula de impresión	S-propranolol	10 mg
Monómero de fijación	Ácido metacrílico	17,0 µl
Monómero de reticulación	Dimetacrilato de etilenglicol	145,0 µl
Iniciador	-	-
Disolvente	Acetonitrilo	1,0 ml

- 40 Se prepara una solución pesando 10 mg de S-propranolol que se disuelven en 1 ml de acetonitrilo y a continuación se añaden los 17 µl de ácido metacrílico y los 145 µl de dimetacrilato de etilenglicol. El conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa. Se hace pasar argón en la mezcla a polimerizar. A continuación con esta mezcla se deposita sobre el sustrato revestido con oro y a continuación se cubre con una lámina de vidrio. La polimerización se iniciara irradiando la mezcla de reacción con una lámpara UV a 350 nm. Después de un periodo de tiempo de polimerización apropiado (de algunos segundos a algunos minutos de acuerdo con el espesor deseado), se obtiene una película fina de PIM sobre la superficie de oro.
45

- Variante 1: En lugar del sustrato cubierto por una capa de cromo y de oro, se usa un sustrato de vidrio o de silicio que se funcionaliza previamente con aminopropil trimetoxisilano para introducir grupos amino para el acoplamiento del iniciador D2. La superficie de vidrio se aclara con etanol y a continuación con agua milliQ. A continuación se colocan en un baño de amoniaco (contenido de un 4,6 %) y se mantiene durante 5 minutos a 80 °C. A continuación, se coloca en un baño de peróxido de hidrógeno (contenido de un 5 %) durante 5 minutos a 80 °C. A continuación, se coloca en una solución que contiene peróxido de hidrógeno (contenido de un 4,3 %) y ácido clorhídrico (contenido de un 5,3 %) a 80 °C durante 5 minutos. La superficie de vidrio se aclara a continuación dos veces con agua milliQ, dos veces con acetona y dos veces con tolueno. A continuación se coloca en una solución que contiene 50 ml de tolueno y 1 ml de aminopropil trimetoxisilano durante 12 h a 20 °C en un recipiente cerrado. A continuación, la superficie se aclara tres veces con acetona y a continuación se seca con un flujo de nitrógeno. El acoplamiento del iniciador D2 se realizar a continuación incubando la superficie en una solución que contiene D2 (0,1 mmol),
50
55

hidroxibenzotiazol (0,1 mmol) y diisopropilcarbodiimida (0,1 mmol) en 3 ml de DMF anhidra, con agitación durante 12 h a 20 °C. La superficie se aclara a continuación con DMF y a continuación con metanol, y se secan un flujo de nitrógeno.

- 5 Variante 2: En el momento del acoplamiento con la diisopropilcarbodiimida, se añade un exceso de ácido acético (con respecto al número de moles de D2) a la mezcla, dando como resultado un espaciado de las moléculas iniciadoras insertadas sobre la superficie del sustrato. Por ejemplo, se usan 0,099 mmoles de ácido acético y 0,001 mmoles de D2. El resultado es la obtención de una lámina de nano-islotos en lugar de una película continua sobre la superficie.

10 Ejemplo 5: Polímero de impresión molecular (PIM) y método de preparación de acuerdo con la invención a partir del iniciador D5

15 Este ejemplo describe la síntesis de un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) para la molécula diana S-propranolol usando el iniciador D5. En este ejemplo, las concentraciones de monómeros se eligen para obtener perlas de tamaño nanométrico de polímero de impresiones moleculares.

Síntesis del PIM

20

Tabla 2: Formulaciones y reactivos

Funciones	Productos	Cantidades usadas
Molécula de impresión	S-propranolol	12,0 mg
Monómero de fijación	Ácido metacrílico	31,2 µl
Monómero de reticulación	Dimetacrilato de etilenglicol	348,0 µl
Iniciador	D5	0,67 mg
Disolvente	Acetonitrilo	2000 µl

25 Se prepara una solución A pesando 12,0 mg de S-propranolol que se disuelven en 1 ml de acetonitrilo y a continuación se añade ácido metacrílico 31,2 µM y 348 µl de dimetacrilato de etilenglicol. El conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa.

Del mismo modo se prepara una solución B pesando 0,204 µmoles de D5 que se disuelven en 1 ml de acetonitrilo.

De nuevo con el conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa.

- 30 En la oscuridad, la solución A se mezcla con la solución B en un tubo de ensayo de vidrio de 4 ml y el tubo se cierra con un tapón de separación. El tubo se coloca en hielo durante 10 min y a continuación se hace pasar argón en la solución a través de la separación durante 2 min.

35 El tubo se coloca a 10 °C y se le irradia con una lámpara de UV a 365 nm durante 15 min para polimerizar. Las nanopérlas de polímero en suspensión obtenidas se incuban a 25 °C en mezclas de metanol/acético acético a 4:1 (3 veces durante 1 h) y en metanol (3 veces durante 1 h). Ese tratamiento permite liberar las impresiones del polímero de impresiones moleculares obtenido.

Características y propiedades del PIM

40

La figura 12 ilustra una fotografía de partículas esféricas de PIM obtenidas de acuerdo con el método de la invención, mediante microscopía electrónica de transmisión. Se puede observar que las partículas formadas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm. En la figura 12, el gráfico de la parte media muestra el análisis de las partículas de PIM mediante difusión dinámica de luz. Se observa bien un tamaño medio de 45 nm y una polidispersión baja. Si la misma síntesis se realiza con un método idéntico pero usando un iniciador monofuncional, bencil-N,N-dimetilditiocarbamato, siendo el número total de funciones ditiocarbamato el mismo en los dos casos, no se obtienen partículas de PIM después de la síntesis. Parece claramente que el uso del iniciador D5 permite obtener nanopérlas de PIM al contrario que el iniciador monofuncional, bencil-N,N-dimetil ditiocarbamato.

- 50 Para evaluar el efecto de la impresión molecular, el PIM y un polímero de control químicamente idéntico pero sintetizado en ausencia de S-propranolol se incuban con propranolol etiquetado con tritio (³H-S-propranolol). Para esto, en dos series de tubos de ensayo de 1,5 ml se introducen cantidades crecientes (de 100 a 4000 µg) de PIM y de polímero de control, respectivamente, suspendidos en acetonitrilo. A esta suspensión se le añade 1 pmol de ³H-S-propranolol, a continuación los tubos incuban con agitación durante 2 h a 25 °C. Después de la centrifugación, la radioactividad en el sobrenadante determina mediante recuento de centelleo en fase líquida. El valor obtenido
- 55 corresponde al ³H-S-propranolol no unido al polímero, y la fracción unida se puede calcular mediante la diferencia entre la cantidad de ³H-S-propranolol encontrada en el sobrenadante y la cantidad de ³H-S-propranolol total añadido

a cada tubo de ensayo.

Los resultados obtenidos se representan en el gráfico de la parte inferior de la figura 12. Es claramente visible que el PIM adsorbe más ^3H -S-propranolol que el polímero de control sintetizado sin la molécula de impresión, S-propranolol, por lo tanto, y si a una creación de sitios de reconocimiento mediante impresión molecular.

Ejemplo 6: Polímero de impresión molecular (PIM) y método de preparación de acuerdo con la invención a partir del iniciador D5

Este ejemplo describe la síntesis de un polímero de impresión molecular (PIM) para la molécula diana, S-propranolol, usando el iniciador D5. En este ejemplo, las concentraciones de monómeros se eligen para obtener perlas de tamaño nanométrico de polímero de impresiones moleculares.

Síntesis del PIM

Tabla 2: Formulaciones y reactivos

Funciones	Productos	Cantidades usadas
Molécula de impresión	S-propranolol	12,0 mg
Monómero de fijación	Ácido metacrílico	31,2 μl
Monómero de reticulación	Dimetacrilato de etilenglicol	348,0 μl
Iniciador	D5	6,7 mg
Disolvente	Acetonitrilo	10,5 ml

Se prepara una solución A pesando 12,0 mg de S-propranolol que se disuelven en 5 ml de acetonitrilo y a continuación se añade 31,2 μM de ácido metacrílico y 348 μl de dimetacrilato de etilenglicol. El conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa.

De la misma manera se prepara una solución B pesando 2,04 μmoles de D5 que se disuelven en 5,5 ml de acetonitrilo.

De nuevo, el conjunto se coloca en un baño de ultrasonidos hasta una disolución completa.

En la oscuridad, la solución A se mezcla con la solución B en un tubo de ensayo de vidrio de 15 ml y el tubo se cierra con un tapón de separación. El tubo se coloca en hielo durante 10 min y a continuación se hace pasar argón en la solución a través de la separación durante 2 min.

El tubo se coloca a 30 $^{\circ}\text{C}$ y se irradia con una lámpara de UV a 365 nm durante 16 h para polimerizar.

Se obtiene un rendimiento de polimerización, expresado en este ejemplo en % de conversión de los monómeros, de un 21 %. Si la misma síntesis se realiza con un método idéntico pero usando un iniciador monofuncional, bencil-N,N-dimetilditiocarbamato, siendo el número total de funciones ditiocarbamato el mismo en los dos casos, el rendimiento de polimerización no es más que un 5 %. May su inicio parece claramente que el uso del iniciador D5 permite obtener nanopartículas de PIM con un alimento superior en comparación con el iniciador monofuncional, bencil-N,N-dimetilditiocarbamato.

Listados de referencias

[1] K. Mosbach, O.Ramström, Bio/Technology 1996, 14, 163-170.

[2] B. Rückert, A. Hall, B.Sellergren, J. Mater. Chem. 2002, 12, 2275-2280.

[3] A. Biffis, N. B. Graham, G. Siedlaczek, S. Stalberg, G. Wulff, Macromol. Chem. Phys. 2001, 202, 163-171.

[4] M. Antonietti, C. Rosenauer, Macromolecules 1991, 24, 3434 -3442.

[5] G. Wulff, B.-O. Chong, U. Kolb, Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 2955 -2958.

[6] T. Otsu, J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem. 2000, 38, 2121-2136.

[7] R. C. Mehrotra, "Present status and future potential of the Sol-Gel process", en Chemistry, Spectroscopy and Applications of Sol-Gel Glasses, Vol. 77 de la serie Structure and Bonding, Springer, Berlin/Heidelberg, 1992.

[8] R. H. Schmidt, K. Haupt (2005), Chem. Mater. 17, 1007-1016.

[9] Y. Ju, D. Kumar, R. S. Varma, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 6697-6700.

[10] G.R. Gale, L.M. Atkins, E.M. Walker Jr, A.B. Smith, M.M. Jones, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1983, 13, 474-481.

5 [11] H.C. Kolb, K.B. Sharpless, *Drug Discov. Today*, 2003, 8, 1128-1137.

[12] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 2004-2021.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) mediante polimerización por radicales en el que:

- 5 a) se pone en contacto:
- al menos una entidad o molécula de impresión;
 - monómeros idénticos o diferentes, capaces de formar el polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM);
 - al menos un iniciador que comprende al menos dos funciones químicas (F1) capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización de dichos monómeros sobre o alrededor de dicha entidad o molécula de impresión;
- 10 b) la polimerización se realiza bajo la acción de un haz luminoso de longitud de onda visible o UV o bajo la acción de un aporte de energía térmica formando de este modo, sobre o alrededor de dicha entidad o molécula de impresión, un polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM);
- 15 c) el o los monómeros no polimerizados y/o toda o parte de la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) se eliminan con un disolvente o una mezcla de disolvente(s) apropiado(s).

20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la entidad o molécula de impresión se selecciona del grupo que comprende:

- aminoácidos, osas, lípidos, nucleósidos, nucleótidos, oligómeros y polímeros obtenidos a partir de estas entidades o moléculas, en particular péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos y polisacáridos,
- 25 - entidades o moléculas biológicamente activas, en particular medicamentos, en particular antibióticos, hormonas esteroideas, vitaminas, toxinas, enzimas, agentes de dopaje, pesticidas, insecticidas, fungicidas y herbicidas,
- sustancias explosivas,
- sustancias tóxicas,
- 30 - disruptores endocrinos,
- nanopartículas,
- células de bacterias procariontas y eucariotas
- células animales, en particular células de levaduras, células de hongos y células animales y humanas
- células de plantas,
- virus, y
- 35 - tejidos celulares.

3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la entidad o molécula de impresión se selecciona del grupo que comprende tripsina, calicreína, S-propranolol, teofilina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, beta-estradiol, testosterona, atrazina, morfina, cocaína, tetrahidrocannabinol.

40 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa a), además de la entidad o molécula de impresión, se añade un sustrato.

45 5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el sustrato se selecciona del grupo que comprende vidrio, cuarzo, mica, silicio, germanio, carburo de silicio, óxido de estaño-indio, dióxido de titanio, óxido de aluminio, un polímero orgánico opcionalmente reticulado, en particular poliestireno, poli(estireno-co-metacrilato), poli(metacrilato de metilo), poli(acrilonitrilo), una poliamida, un poliéster, un poliuretano, poli(dimetilsiloxano), polibutadieno, o un metal, en particular oro, plata, platino, o un compuesto de dos o varios de estos materiales.

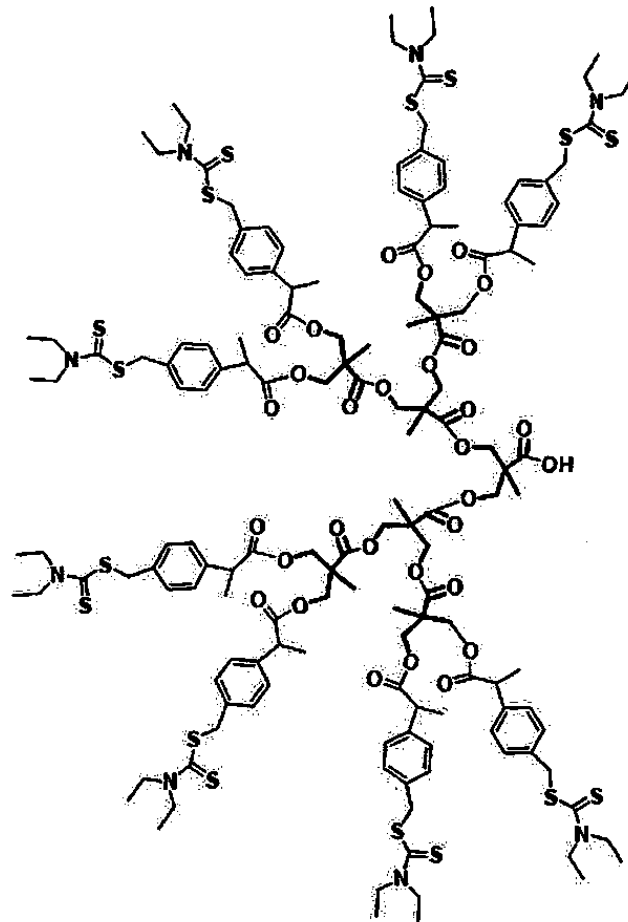
50 6. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los monómeros son monómeros de fijación opcionalmente en mezcla con monómeros de reticulación.

7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los monómeros comprenden al menos una función vinilo seleccionada del grupo que comprende:

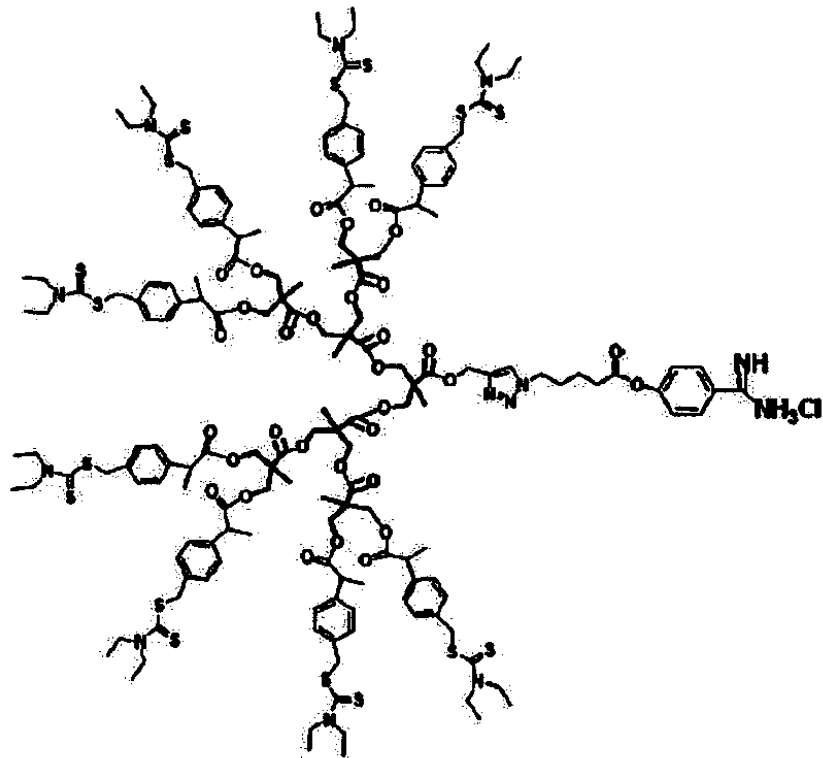
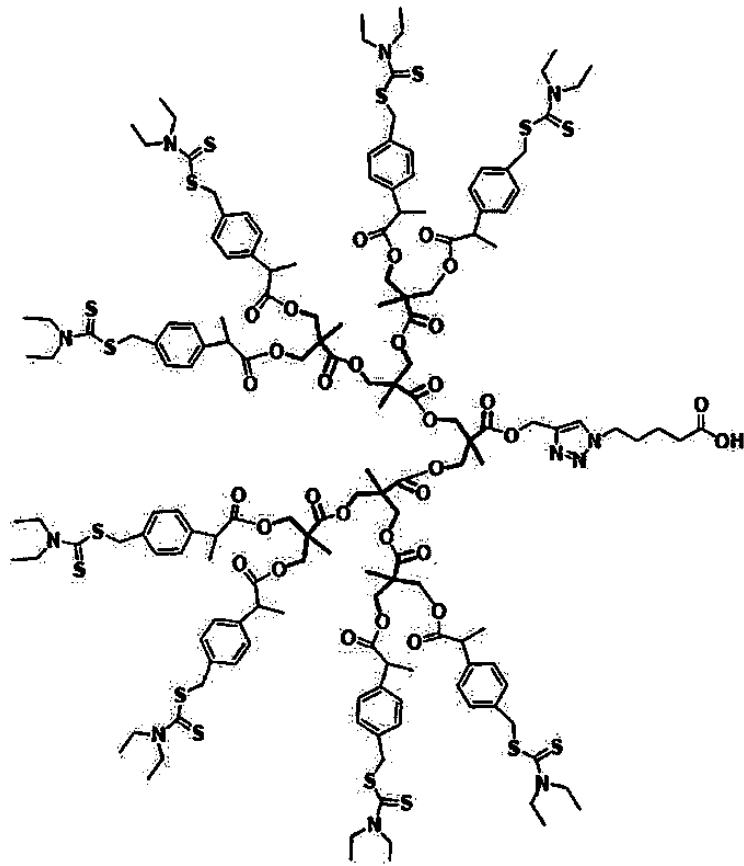
- 55 - ácido metacrílico, ácido trifluorometilacrílico, ácido acrílico, ácido itacónico, ácido estirenosulfónico, ácido acrilamidopropanosulfónico, ácido 4-vinilfenilborónico, ácido 4-vinilbenzoico, acrilato de carboxietilo, metacrilato fosfato de hidroxietilo, 2-vinilpiridina, 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol, 4(5)-vinilimidazol, metacrilato de 2-aminoetilo, metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo, acrilato de aminoetilo, cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de glicidilo, acrilamida, metacrilamida, isopropilacrilamida, 4-vinilbenzamidina, 4-metacrilamidobenzamidina, estireno, metacrilato de fenilo, metacrilato de ciclohexilo, metacrilato de metilo, metacrilato de butilo, metacrilato de hexilo, metacrilato de octilo, dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de hexanodiol, trimetacrilato de trimetilolpropano, dimetacrilato de polietilenglicol, dimetacrilato de trietilenglicol, triacrilato de pentaeritritol, divinilbenceno, bisacrilamida de etileno, bisacrilamida de metileno, bisacriloil piperazina, le N,N-bisacriloilcistamina, bisacrilamida de N,N-1,2-dihidroxietileno, N,O-bisacriloil etanolamina;
- 60 - o una mezcla de los mismos.
- 65

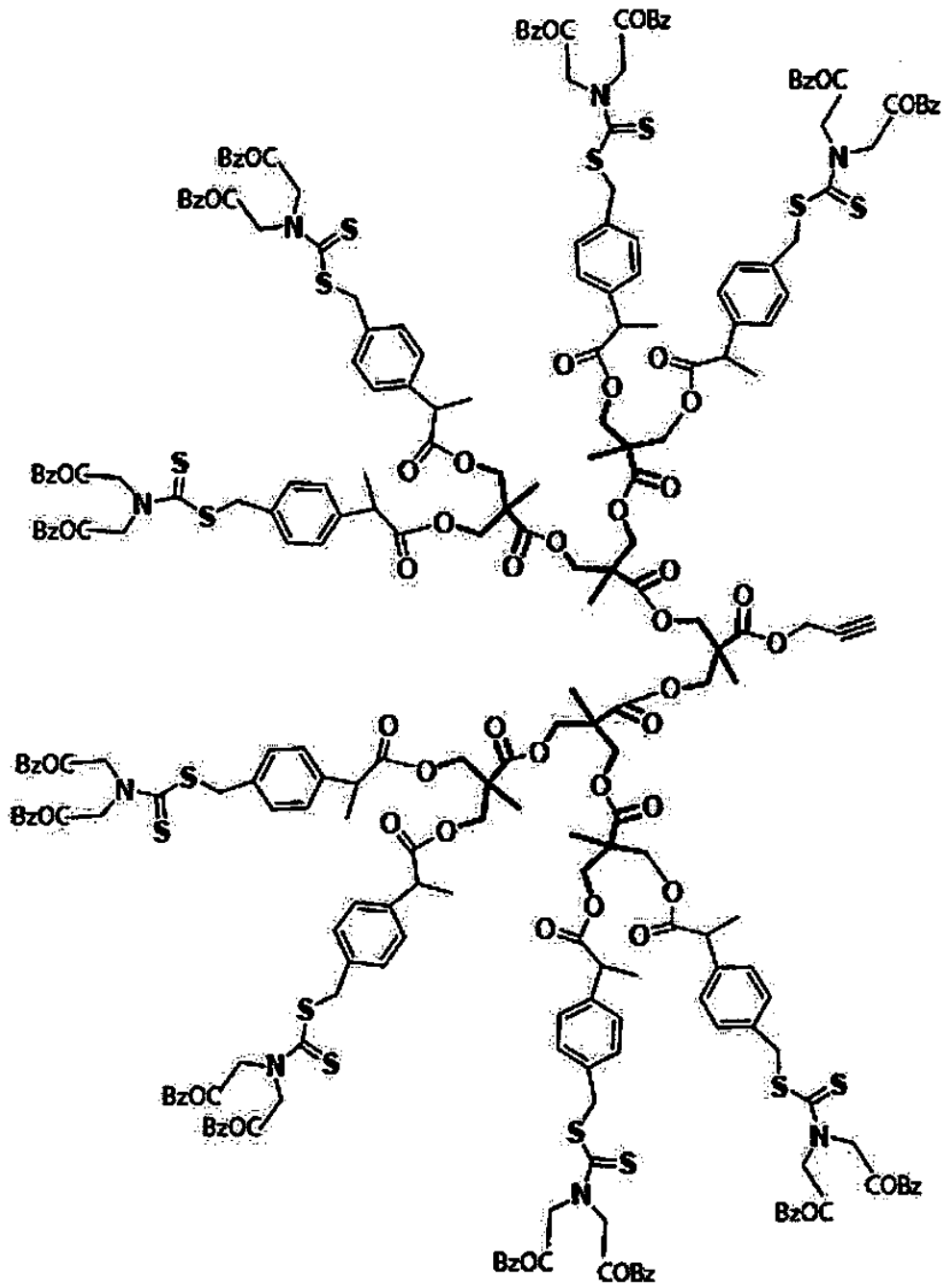
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el iniciador comprende hasta 64 funciones químicas (F1) capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización de los monómeros sobre o alrededor de dicha entidad o molécula de impresión.
- 5 9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las funciones químicas del iniciador capaces de formar radicales que permiten iniciar la polimerización están proporcionadas por un compuesto seleccionado del grupo que comprende:
- 10 - éteres de benzoína, en particular metiléter de benzoína, etiléter de benzoína, butiléter de benzoína, isopropiléter de benzoína, acetofenonas, en particular 2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona, 2-hidroxi-2-metil-1-fenil-propan-1-ona o 2-metil-1-[4-(metiltio)fenil]-2-morfolinopropan-1-ona, benzofenonas sustituidas;
- 15 - peróxidos sustituidos, en particular bis(terc-butil ciclohexil)peroxidicarbonato, derivados de óxidos de fosfina, en particular óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fenilfosfina, amino-cetonas, oxisulfonil-cetonas, sulfonil-cetonas o uno de estos derivados, y los compuestos de tipo azo en particular azo-bis-isobutironitrilo, azo-bis-dimetilvaleronitrilo, ácido 4,4'-azobis-cianoaléxico, 2,2'-azobis(2-amidinopropano);
- 20 - hidroxi-alquilaminas, en particular metildietanolamina, bencilaminas, derivados de anilina, paradimetilaminobenzoato de etilo, N-fenilglicina (NPG);
- ácido ascórbico;
- un derivado de ditiocarbamato, en particular bencil-N,N-dimetilditiocarbamato, bencil-N,N-dietilditiocarbamato, bencil-N,N-di(2-hidroxi-etil)ditiocarbamato, bencil-N-metil-N-(2-hidroxi-etil)ditiocarbamato, bencil-N-metil-N-carboximetilditiocarbamato, di(benciléster) del bencil-N,N-di(carboximetil)ditiocarbamato.
10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el iniciador comprende al menos una segunda función química (F2) seleccionada del grupo que comprende hidroxilo, ácido carboxílico, éster carboxílico, tioéster, amida, amina, tiol, éter, amidina, guanidina, urea, tiourea, aldehído, cetona, alquilo, fenilo, bencilo, ácido iminodiacético, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético, un quelato metálico, en particular ácido iminodiacético-Cu, ácido iminodiacético-Co, ácido iminodiacético-Ni, ácido iminodiacético-Zn, ácido nitrilotriacético-Ni, acetileno.
- 25 11. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que, en la etapa a), el iniciador está en mezcla con un compuesto sensibilizador seleccionado del grupo que comprende:
- 30 - acridinas, en particular Acriflavina (marca registrada) o Naranja de Acridina (marca registrada), fenazinas, en particular Safranina O (marca registrada), oxazinas, tiazinas, en particular Azul de Metileno o tionina, xantenos, en particular Eosina Y (marca registrada), Rosa de Bengala (marca registrada) o Eritrosina (marca registrada), rodaminas, tioxantenos, polimetinas;
- 35 - derivados de tioxantona, en particular isopropiltioxantona o clortioxantona, curaminas o sus derivados, en particular cetocumarinas.
- 40 12. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa a), la puesta en contacto se realiza en presencia de al menos un disolvente porógeno seleccionado del grupo que comprende:
- 45 - benceno, tolueno, xileno, disolventes clorados, en particular cloroformo, diclorometano, dicloroetano y 1,1,2,2-tetracloroetano, y/o disolventes perfluorados, en particular hexafluorociclohexano, éteres, en particular tetrahidrofurano, dietilenglicol dimetil éter y trietilenglicol dimetil éter, amidas, en particular dimetilformamida y formamida, nitrilos, en particular acetonitrilo y caprilonitrilo, cetonas, en particular acetona, ésteres, en particular acetato de etilo, alcanos, en particular hexano y heptano, alcoholes, en particular metanol, etanol, iso-propanol, butanol, decanol, agua;
- 50 - o una mezcla de los mismos.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa b), la polimerización se realiza bajo la acción de un haz luminoso de longitud de onda visible o UV de una longitud de onda comprendida entre 100 nm y 1200 nm.
14. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa b), la polimerización se realiza bajo un aporte de energía térmica a una temperatura comprendida entre 0 °C y 200 °C.
- 55 15. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa c), el disolvente se selecciona del grupo que comprende agua, metanol, etanol, iso-propanol, acetonitrilo, cloroformo, heptano, tolueno, ácido acético, o sus mezclas o CO₂ supercrítico.
- 60 16. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa c), además del disolvente o la mezcla de disolventes, la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) se elimina con un disolvente o una mezcla de disolventes que contiene otro agente seleccionado del grupo que comprende:
- 65 - un detergente, en particular dodecilsulfato sódico, bromuro de cetil trimetilamonio, Triton X-100 (marca registrada), Empigen BB (marca registrada), ;

- urea;
 - ácido trifluoroacético ;
 - trietilamina ;
 - una enzima hidrolítica seleccionada del grupo que comprende una peptidasa o una proteasa, en particular, tripsina o la proteinasa K;
 - una nucleasa, en particular, la nucleasa de *Staphylococcus aureus* o la ribonucleasa A;
 - una lipasa, en particular, la lipasa pancreática porcina o la lipasa XIII de *Pseudomonas sp.*;
 - una glucosidasa, en particular, beta-glucosidasa, alfa-glucosidasa, o beta-galactosidasa;
 - una sal, en particular, tiosulfato sódico.
17. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa c), además del disolvente, la entidad o molécula de impresión del polímero formado en b) se elimina aplicando un campo eléctrico.
18. Polímero de impresión(s) molecular(s) (PIM) susceptible de obtención con el método tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
19. Polímero de acuerdo con la reivindicación 18 que se presenta en forma de una película de un espesor comprendido entre 1 nm y 100 µm.
20. Polímero de acuerdo con la reivindicación 18 que se presenta en forma de partículas esféricas de diámetro comprendido entre 1 nm y 100 µm.
21. Polímero de acuerdo con la reivindicación 18 que tiene una estructura porosa en la que el diámetro de los poros está comprendido entre 0,1 nm y 10 µm.
22. Uso de un polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en la realización de biosensores biomiméticos, biochips biomiméticos, sensores químicos, dispositivos de separación por adsorción específica, así como revestimiento en particular para la liberación de productos activos.
23. Iniciadores de las fórmulas siguientes:

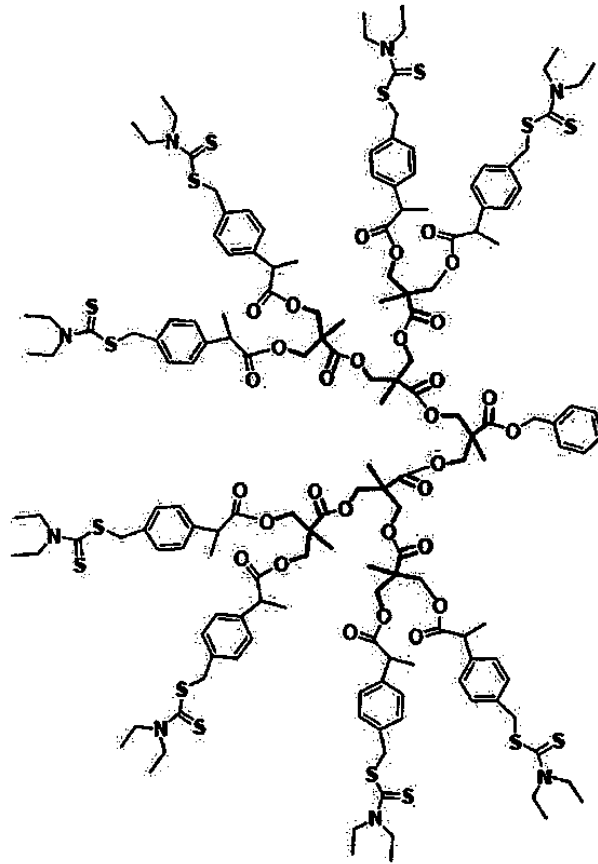


D1,



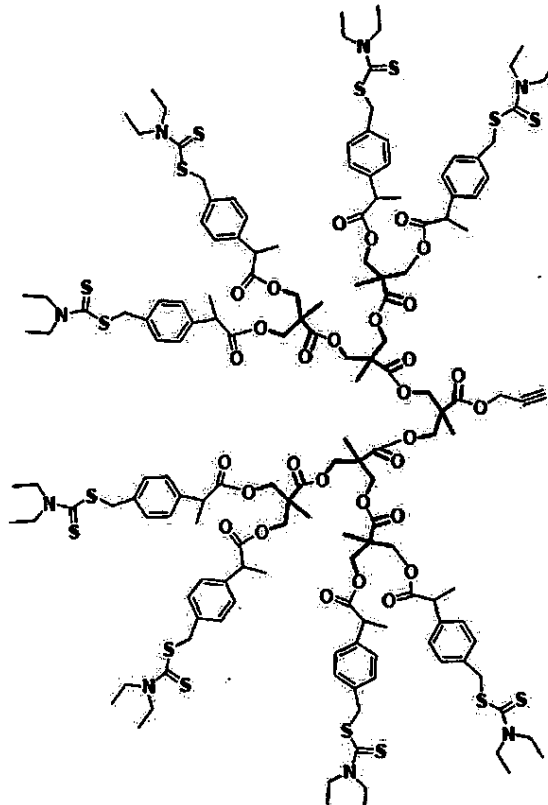


D4,



D5

y



D6

24. Uso de un iniciador de acuerdo con la reivindicación 23 para la preparación de un polímero de impresión(s) molecular(s) mediante polimerización por radicales.

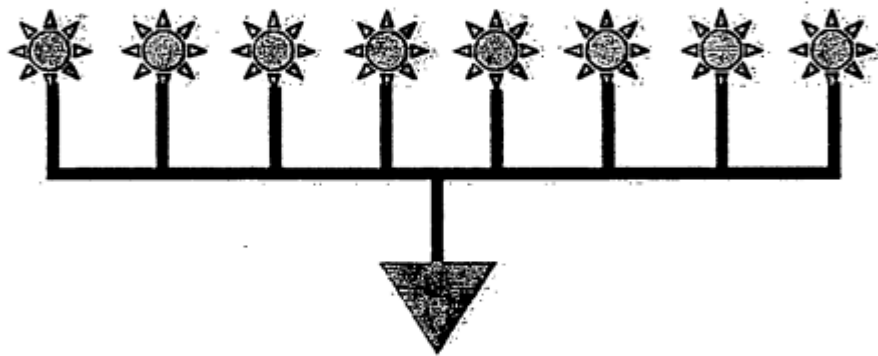


Figura 1

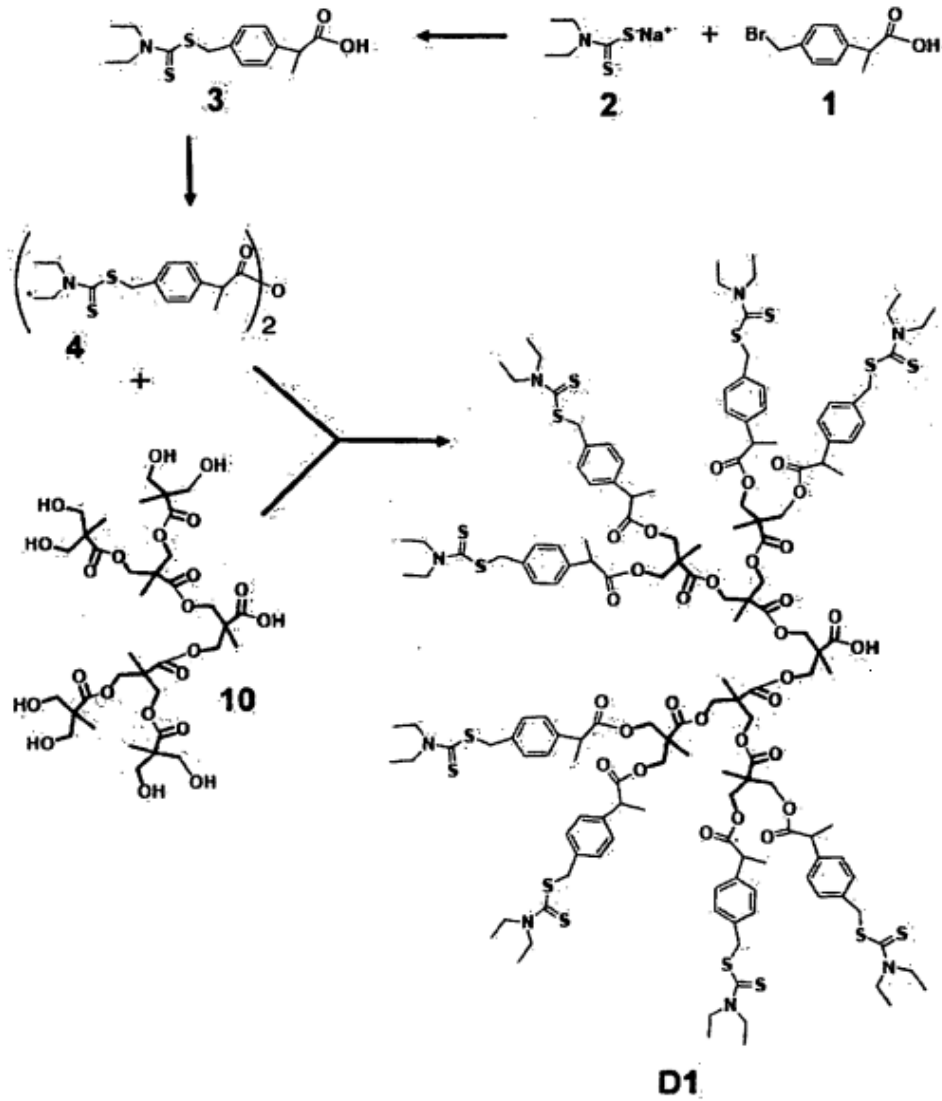


Figura 2

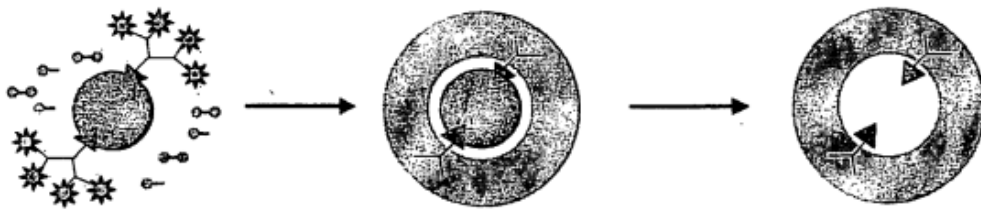


Figura 3

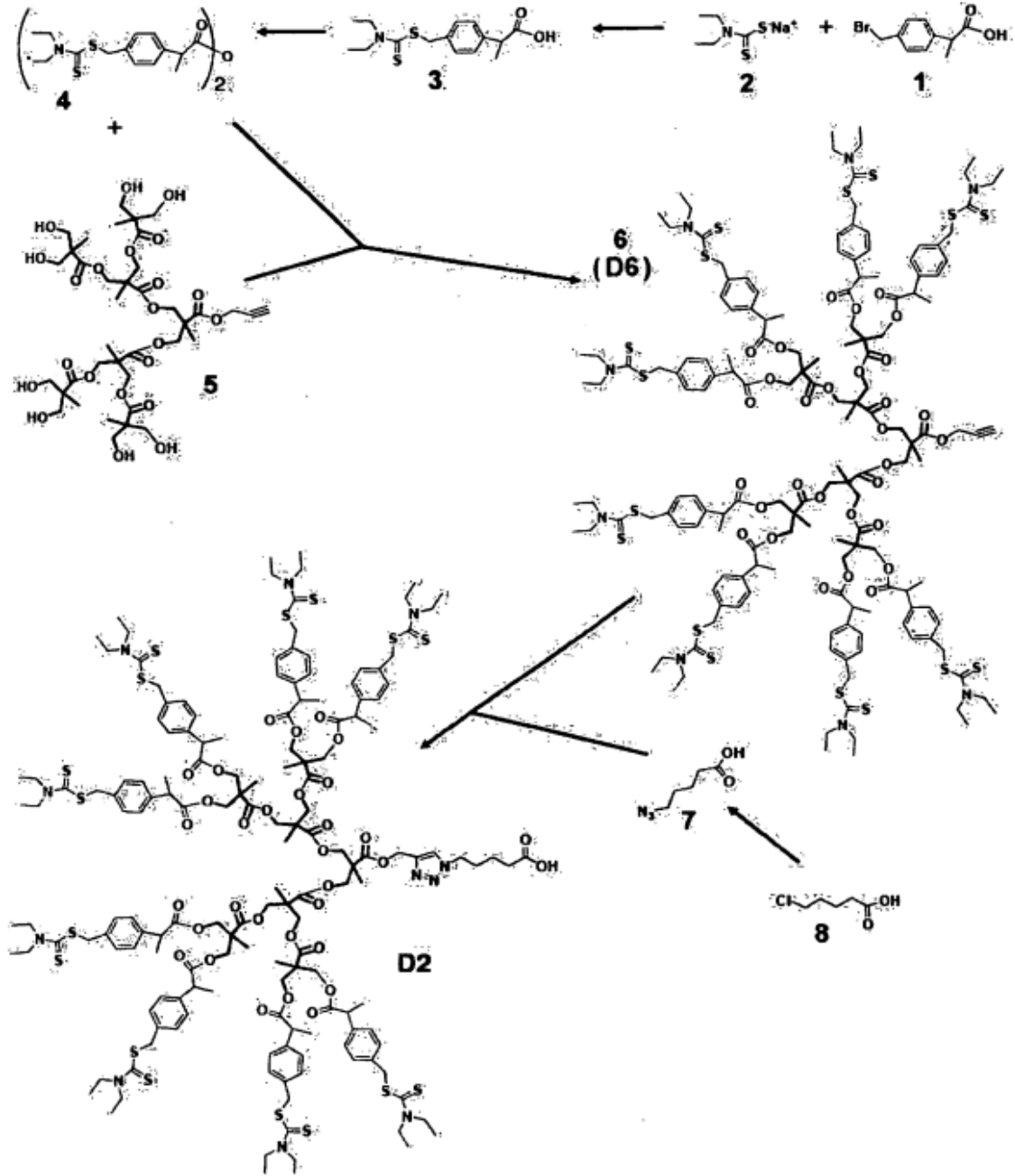


Figura 4

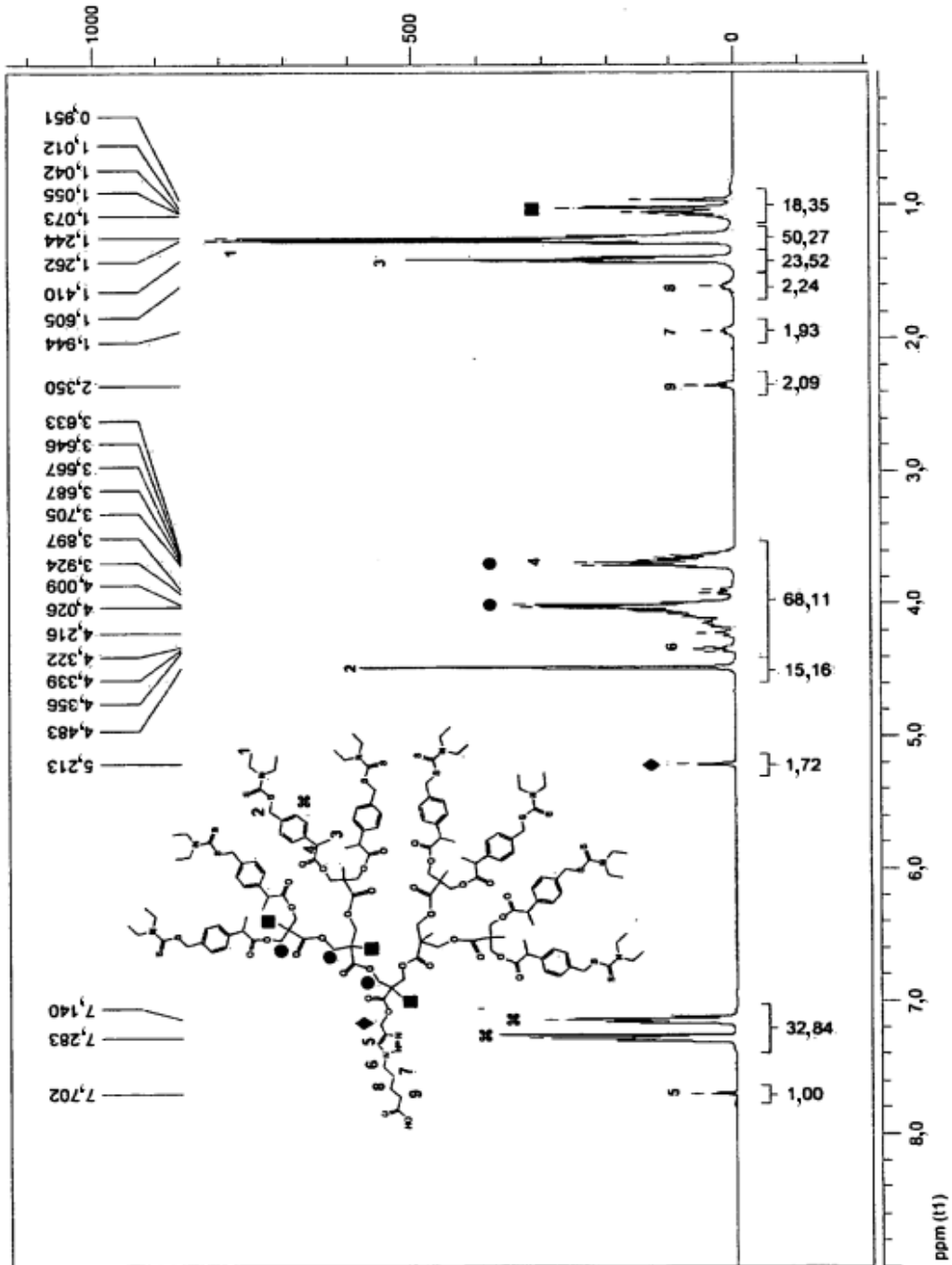


Figura 5A

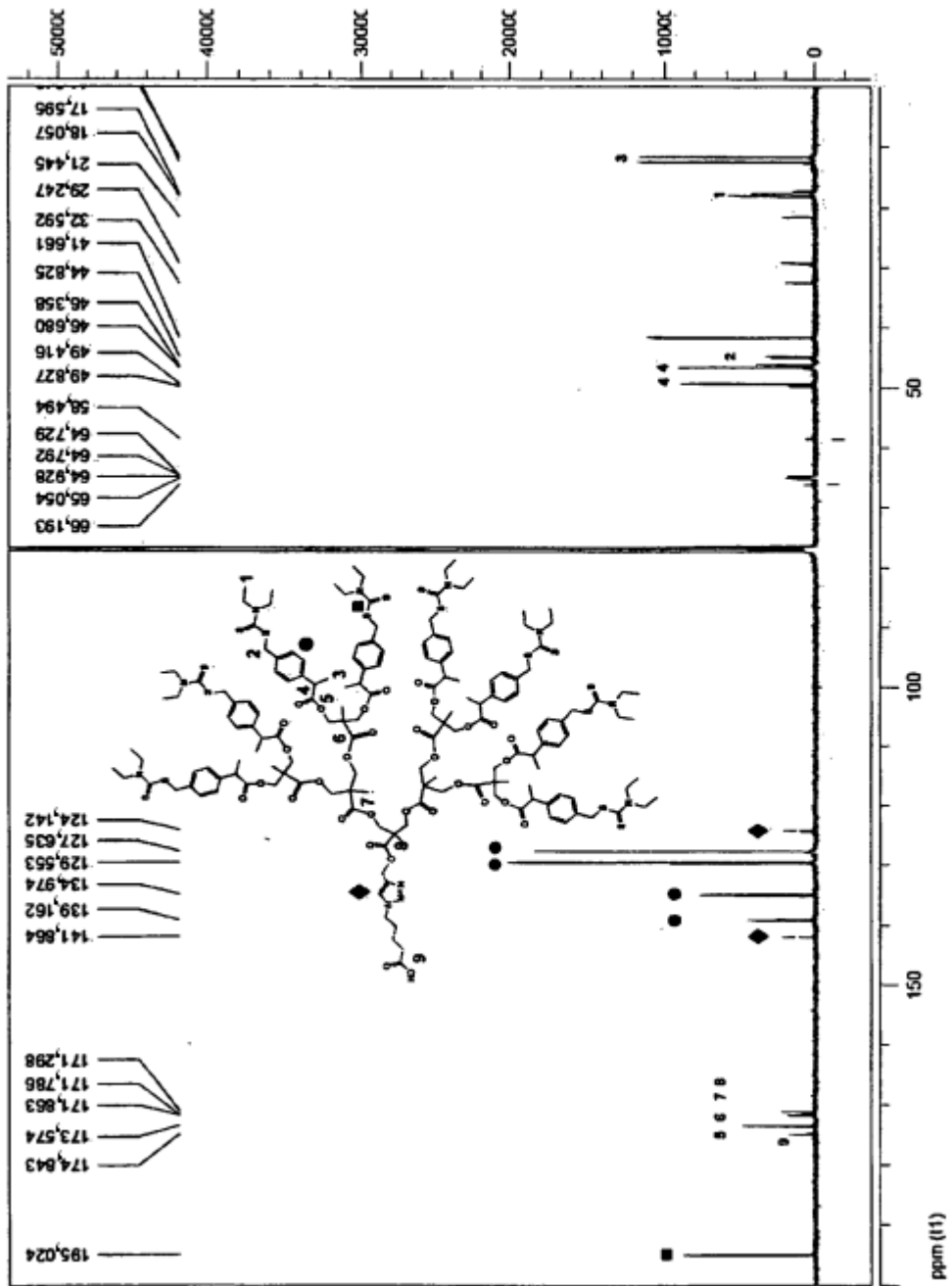


Figura 5B

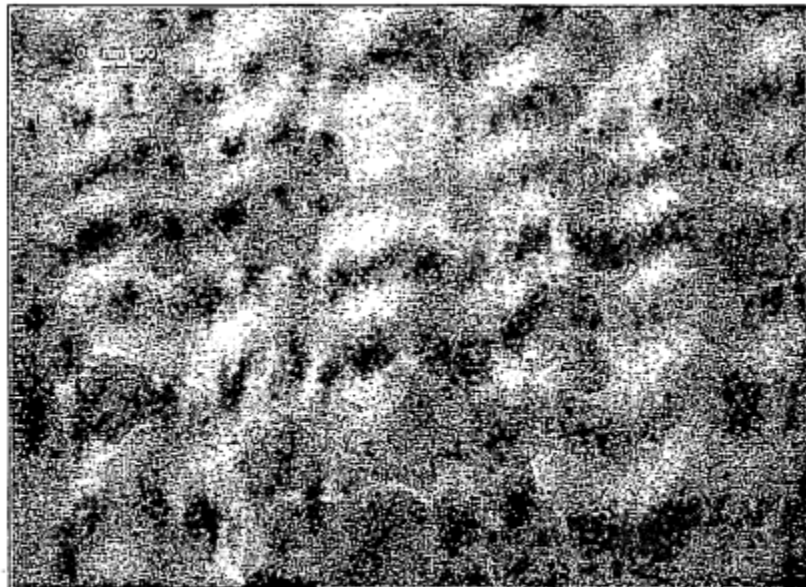


Figura 6

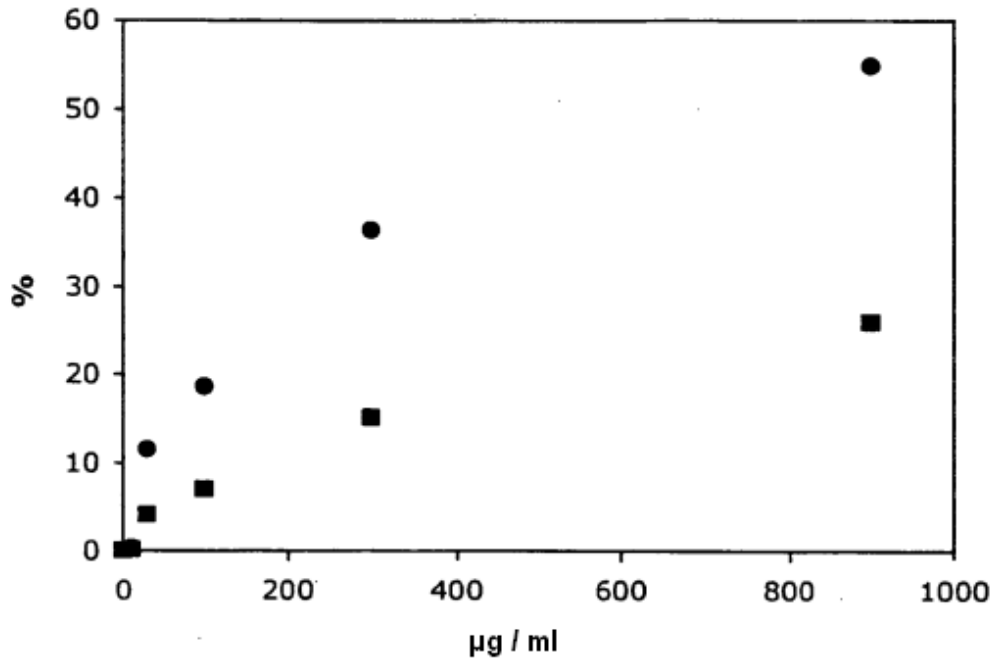


Figura 7

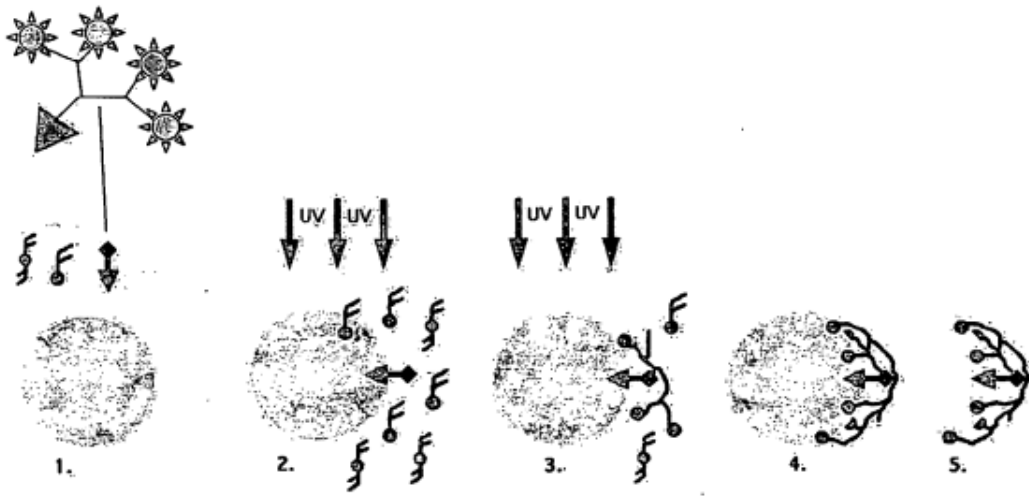


Figura 8

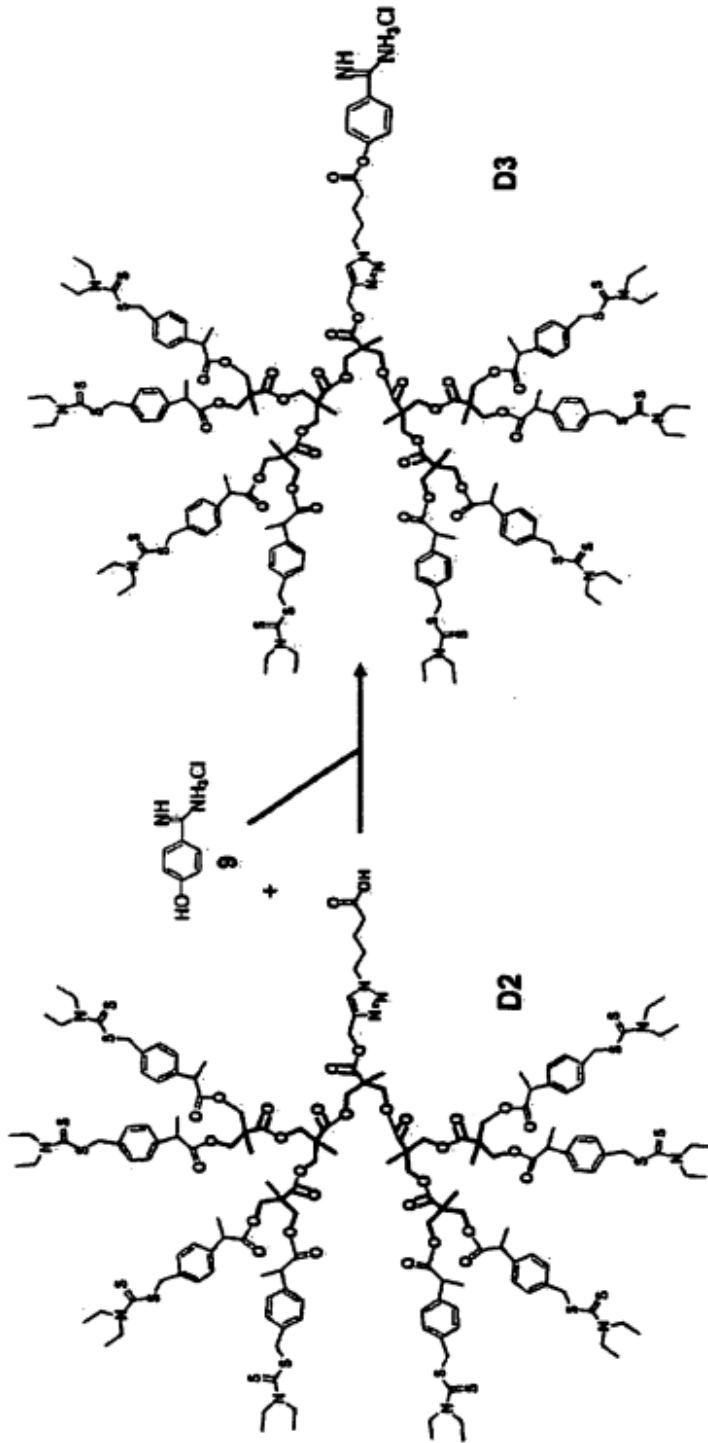


Figura 9

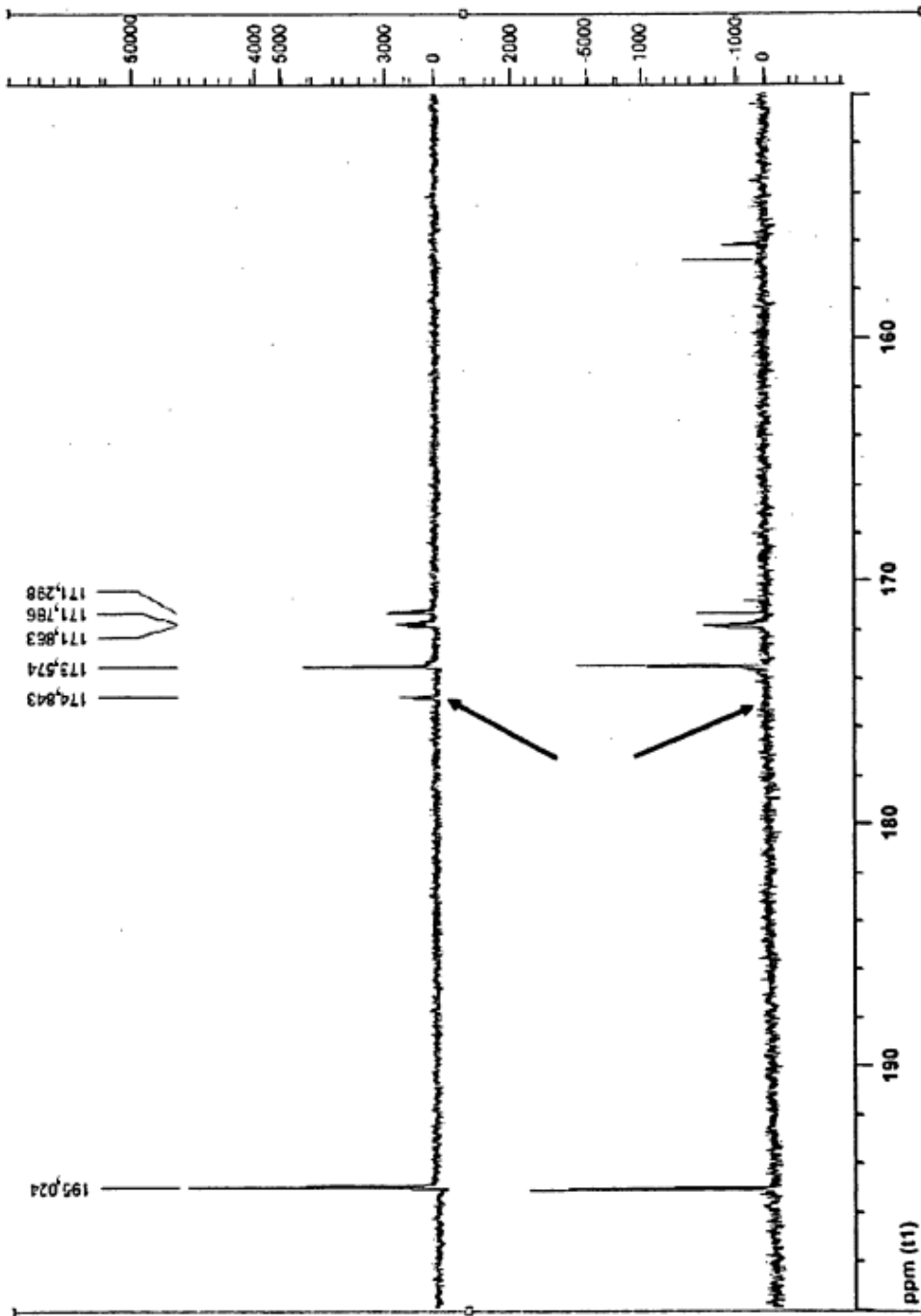


Figura 10

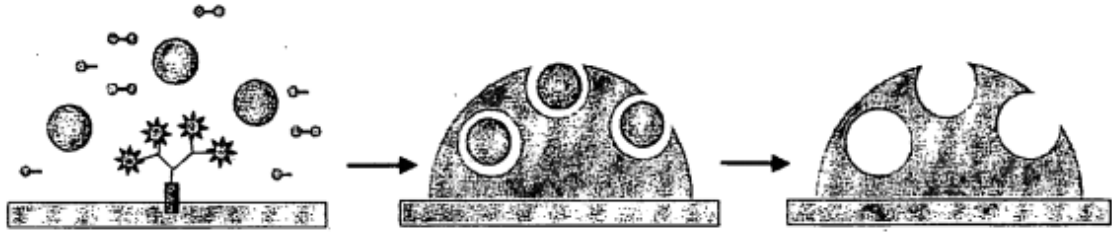


Figura 11

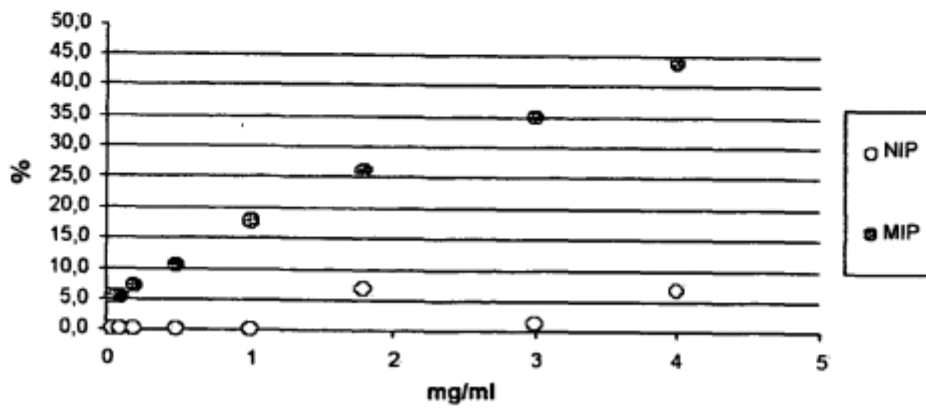
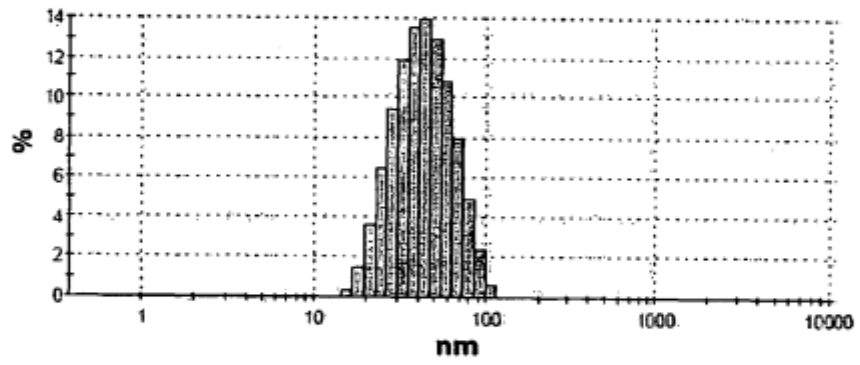
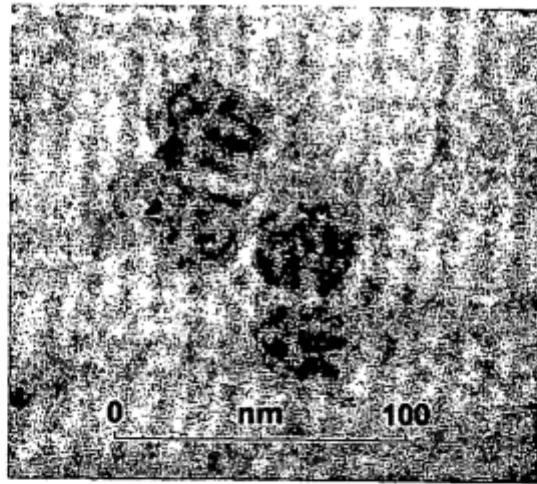


Figura 12

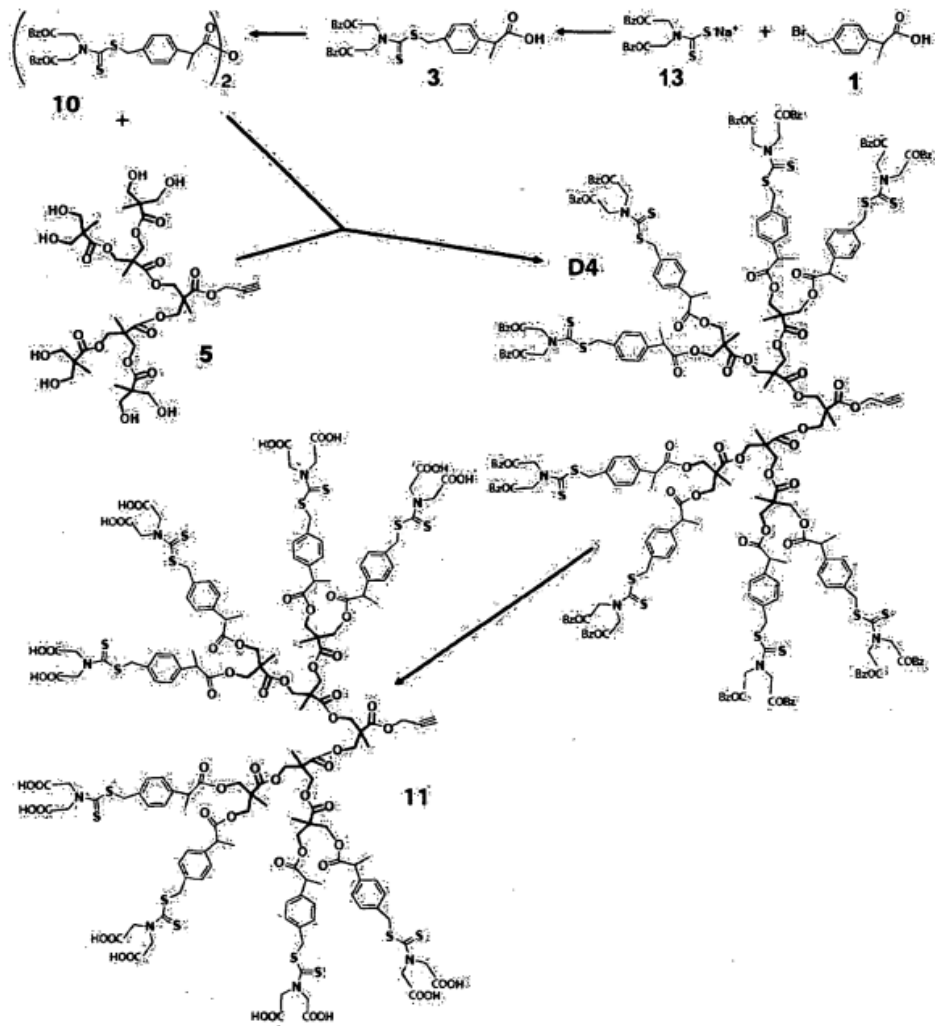


Figura 13

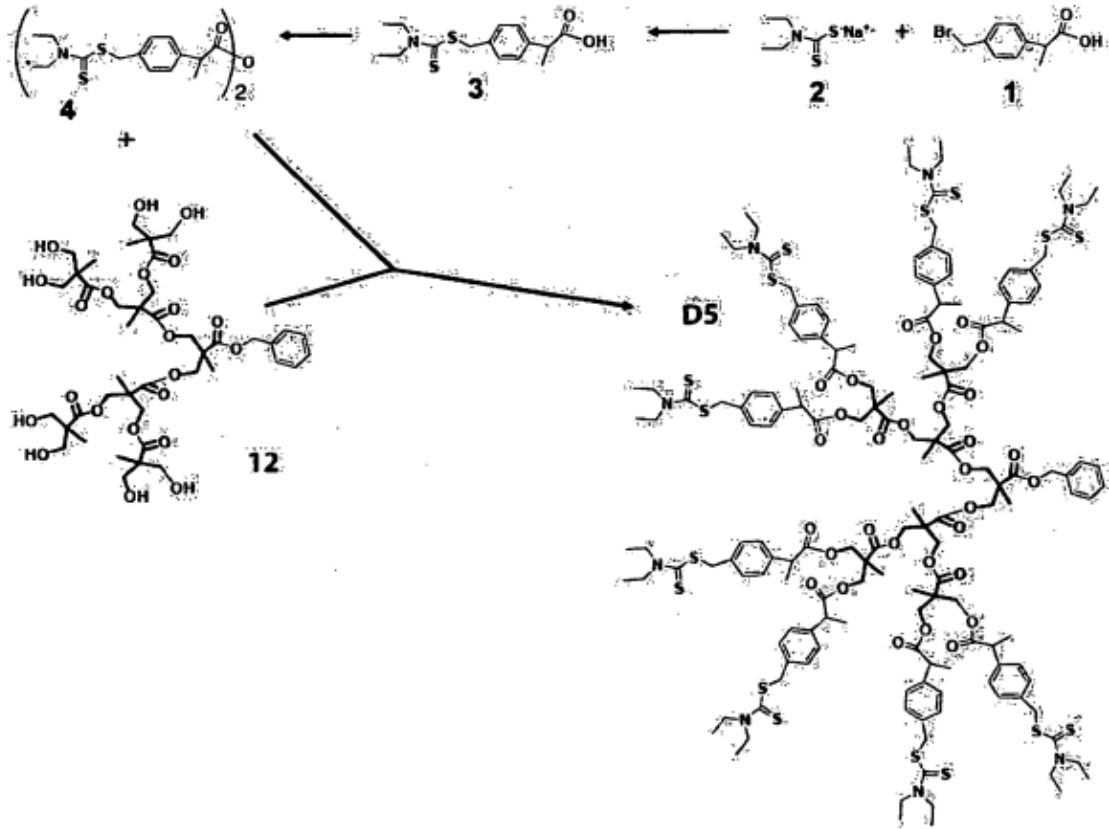


Figura 14

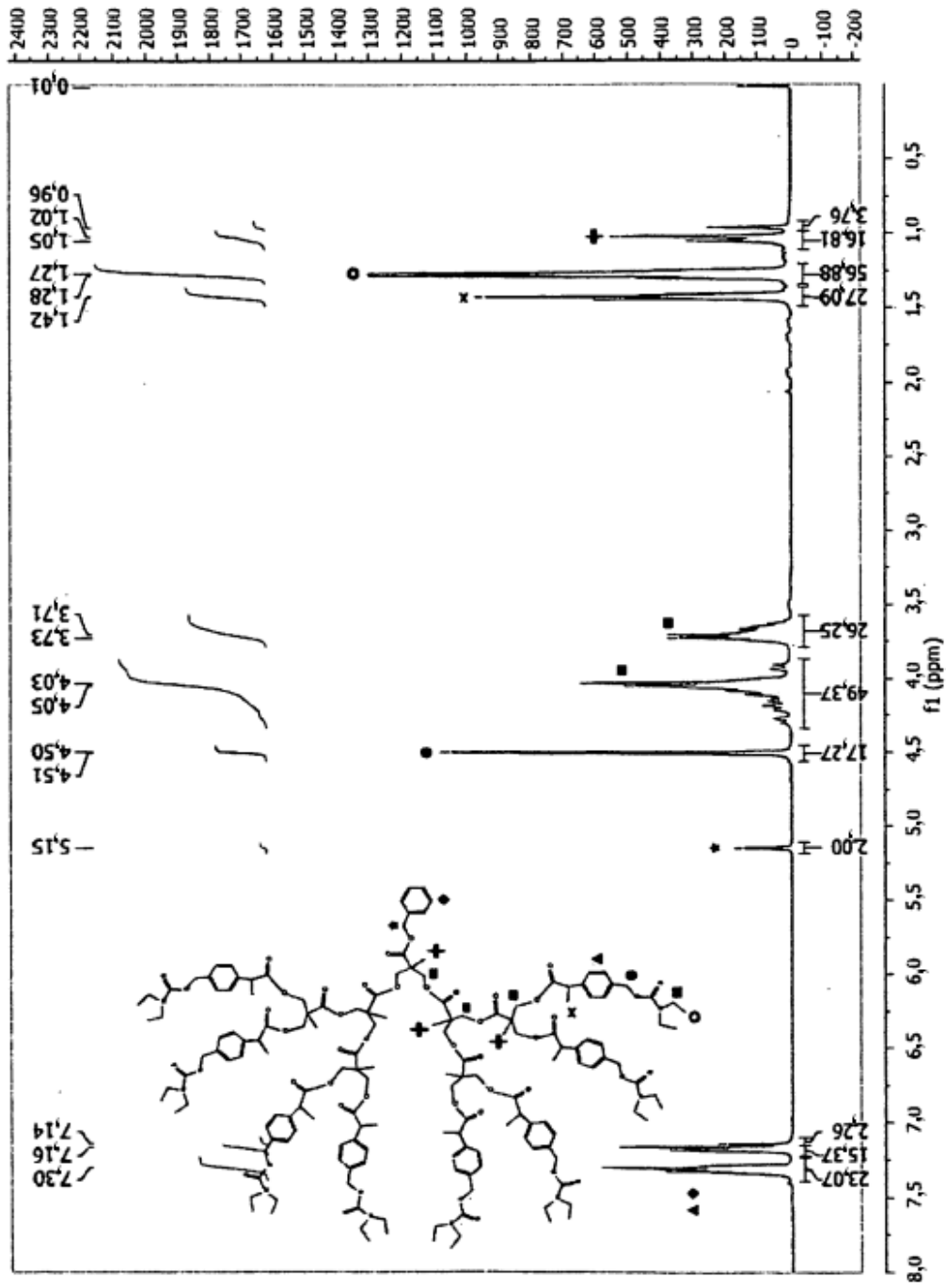


Figura 15A

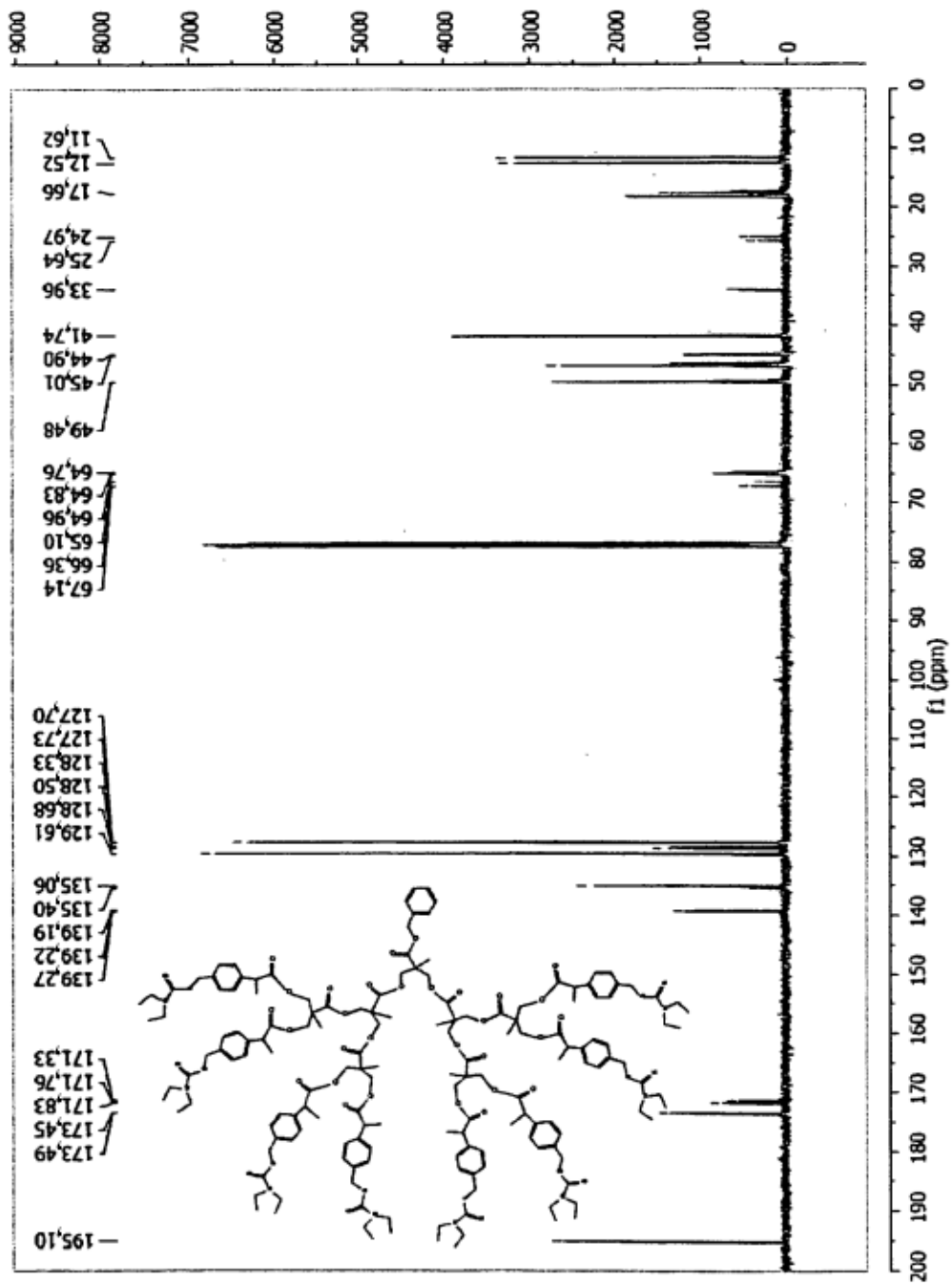


Figura 15B