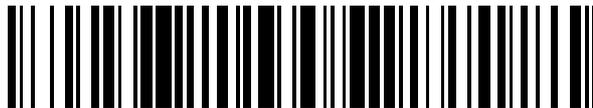


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 878**

21 Número de solicitud: 201531139

51 Int. Cl.:

C25D 7/04 (2006.01) **B82Y 15/00** (2011.01)
C25D 5/12 (2006.01)
F03H 99/00 (2009.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B82Y 30/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:
30.07.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:
30.01.2017

Fecha de concesión:
17.10.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:
24.10.2017

73 Titular/es:
**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN
CARLOS (50.0%)
C/ Profesor Martín Lagos, s/n
28040 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (50.0%)**

72 Inventor/es:
**MUÑOZ LEZCANO, Sergio;
ARMENGOL DE LA HOZ, Miguel Ángel;
ALEO LUJÁN, Esther;
ARRUZA GÓMEZ, Luis;
ARRIBI VILELA, Ana;
ESCARPA MIGUEL, Alberto;
GONZÁLEZ MARTÍN, Cristina;
LÓPEZ GIL, Miguel A.;
MARTÍN GALÁN, Aída y
JURADO SÁNCHEZ, Beatriz**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA ANÁLISIS DE MATERIAL BIOLÓGICO, MÉTODO DE
OBTENCIÓN Y USO DEL MISMO**

57 Resumen:
Método dispositivo para análisis de material biológico,
método de obtención y uso del mismo.

Se detalla en este documento un método de
fabricación de un dispositivo de detección de material
biológico, dispositivo que presenta una serie de
micromotores que pueden ser selectivamente
funcionalizados y guiados por el interior de un
dispositivo microfluídico en el cual se insertan de tal
manera que se puede llevar a cabo de detección de
aquellos analitos que se requieran de manera rápida
y eficaz. El dispositivo hace uso de nanomotores
autónomos que se fabrican mediante diversas
técnicas de deposición y/o pulverización catódica.

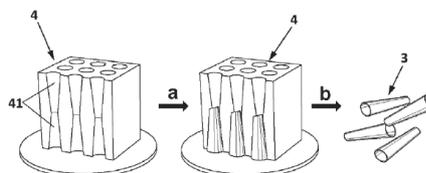


FIG. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 598 878 B1

**MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA ANÁLISIS DE MATERIAL BIOLÓGICO, MÉTODO
DE OBTENCIÓN Y USO DEL MISMO**

DESCRIPCIÓN

5

OBJETO DE LA INVENCION

En este documento se proponen un dispositivo y un método que hace uso de dicho dispositivo para poder llevar a cabo análisis de distintos analitos, preferentemente material biológico.

10

El objeto de la invención va dirigido al campo de la química analítica, más concretamente a la química analítica basada en microsistemas analíticos constituidos por una serie de microcanales.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

La microfluídica y tecnologías "lab-on-a-chip" (LOC) han generado microsistemas analíticos constituidos por una serie de microcanales y reservorios adecuadamente interconectados, que permiten la integración en un dispositivo miniaturizado de las distintas etapas necesarias para llevar a cabo un análisis. Los distintos fluidos pueden ser movidos en su interior mediante la utilización de microbombas y actuadores, o más simplificadaamente, mediante flujos electrocinéticos donde el movimiento es fácilmente controlado mediante la aplicación de campos eléctricos. Estos dispositivos LOC se caracterizan por mejorar las propiedades analíticas reduciendo los tiempos de análisis, disminuyendo el consumo de reactivos, muestras y el riesgo de contaminación, consumiendo menos energía, incrementando la fiabilidad, funcionalidad y sensibilidad a través de la automatización, integrando el análisis multiplexado (varios analitos), y especialmente, favoreciendo la portabilidad y por tanto posibilitando el análisis "in-situ".

25

30

Los micromotores son vehículos ultra pequeños, diseñados para realizar movimientos mecánicos determinados en respuesta a estímulos específicos. Estos micromotores son capaces de transformar energía química en movimiento. Dentro de ellos, los micromotres catalíticos (microcohetes) actúan como motores impulsados por burbujas. El mecanismo principal de funcionamiento de estos micromotores consiste en la generación de burbujas

de oxígeno a partir de la descomposición espontánea de peróxido de hidrógeno en la capa catalítica interna y su eyección a través de la apertura del microcono. Además se caracterizan por su elevada energía propulsora, su control direccional (mediante fuerzas magnéticas) y su capacidad de interacción con analitos diana (pick-up), lo que los hace muy atractivos para diversas aplicaciones tales como la detección "on-chip" en dispositivos LOC. Por tanto, una clara aplicación, se centra en el sensado de los biomarcadores característicos de sepsis neonatal. Para ello, tras su fabricación según se detalla a continuación, serán funcionalizados adecuadamente (anticuerpos específicos de cada analito) para la captura selectiva de las distintas moléculas diana.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto de la invención se detalla un método de fabricación de un dispositivo para análisis de material biológico, dispositivo que presenta unos micromotores poliméricos catalíticos que se insertan en el interior de un dispositivo microfluídico y cuya fabricación se lleva a cabo preferentemente mediante electrodeposición sobre moldes de membranas de policarbonato de distintos diámetros de poro por ejemplo (2 μm o 5 μm); dicho procedimiento consta de:

20 1. Deposición de una capa de oro conductora mediante sputtering (70-80 nm de espesor) en una mebrana de policarbonato dotada de poros, que actuará como electrodo de trabajo y como molde para que el material a depositar en dichas cavidades, polímero conductor, de lugar a las microestructuras como pueden ser los microtubos. A continuación, se ensamblará esta membrana en una celda de electrodeposición, utilizando papel de aluminio como contacto para el electrodo de trabajo. Un hilo de platino y un electrodo Ag/AgCl actuarán como electrodos auxiliar y de referencia, respectivamente. Los poros de la membrana tienen forma esencialmente cilíndrica de distintas secciones transversales o de doble cono unido por sus bases, cuando la membrana presenta 1 micra de diámetro de poro la forma es más cilíndrica.

30

2. Electrodeposición amperométrica del polímero conductor en el interior de los poros de la membrana, a partir de una disolución inicial conteniendo el monómero adecuado para cada aplicación (anilina, pirrol, EDOT) y los aditivos adecuados para favorecer la deposición y solubilización del monómero. Preferentemente se emplearán

mezclas de monómeros conteniendo grupos carboxílicos (polipirrol carboxílico) que dotarán a la superficie del micromotor resultante con numerosos grupos carboxílicos expuestos, simplificando su posterior funcionalización con anticuerpos específicos.

5 3. Deposición de diferentes capas catalíticas metálicas en el interior del microtubo resultante. En un primer lugar, se depositará una capa de Pt mediante un método galvanostático, con el objetivo de crear una superficie altamente conductora que favorecerá la posterior deposición de una capa magnética de Ni (mediante amperometría), esencial para el control magnético del micromotor y su orientación
10 adecuada para entre los distintos reservorios del chip propuesto. Por último, se deposita una tercera capa catalítica de Pt esencial para la descomposición del peróxido de hidrógeno y generación de las burbujas de oxígeno necesarias para el movimiento del micromotor.

15 4. Liberación de los microrockets de la membrana a través de la eliminación de la capa conductora de oro mediante pulido mecánico con una mezcla de alúmina y agua. A continuación se disolverá la membrana con diclorometano y los micromotores resultantes se lavarán secuencialmente con isopropanol, etanol y agua destilada; separando los mismos de cada disolución mediante centrifugación.

20 Una vez constituidos los micromotores, y en función de sus aplicaciones en el campo del análisis de material biológico se procede a una funcionalización de los micromotores que no contengan grupos carboxílicos en su superficie, por incorporación de una capa de oro mediante sputtering o el recubrimiento de la
25 superficie con nanopartículas de oro utilizando la técnica "layer-by-layer". Incorporación de los anticuerpos específicos para los distintos biomarcadores en la superficie de los micromotores parcialmente modificada. En esta etapa los micromotores, en buffer salino, se incubarán con los anticuerpos específicos, permitiendo que los grupos amino-éster mencionados anteriormente reaccionen con
30 los grupos amino primarios presentes en la superficie de los anticuerpos. Posteriormente, los grupos reactivos residuales se bloquearan con una disolución de etanolamina.

En otra posible realización de la invención se propone también el desarrollo de nanohilos

Au-Ni-Au, cuya superficie se puede modificar con bioreceptores específicos (lectinas, antiproteína A) para la interacción selectiva con las bacterias objeto de análisis (Staphylococcus epidermidis, S. haemolyticus, S. saprophyticus). El método de fabricación es el mismo empleado anteriormente, pero en este caso se emplean
5 membranas de alumina de 200 nm de diametro de poro y disoluciones comerciales del metal deseado. El movimiento de estos nanohilos se basa principalmente en el gradiente de presión generado por las ondas de ultrasonidos, que penetran en la parte cóncava final del motor y lo propulsan hacia adelante. Es posible también realizar su guiado dirigido mediante medios magnéticos como puede ser un imán.

10

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo
15 preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Muestra un esquema de la formación de los microtubos a partir de la membrana
20 porosa. Donde los poros de dicha matriz aparecen simétricos.

Figura 2. Muestra un esquema de la funcionalización de los micromotores.

Figura 3. Muestra un esquema del método de análisis de material biológico de un
25 aspecto de la invención.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

En un primer aspecto de la invención se tiene un método de fabricación de un
30 dispositivo para análisis de material biológico, dicho dispositivo presenta una serie de micromotores (5) que se fabrican mediante deposición una capa de material conductor, preferiblemente oro y de un espesor comprendido entre 70 nm y 80 nm, mediante pulverización catódica sobre una membrana (4) porosa que actúa como matriz y comprende una pluralidad de poros (41) tal y como la que se aprecia en la

figura 1, membrana (4) porosa que está destinada a actuar como molde o matriz para material depositado y como electrodo de trabajo.

5 El resultado del paso anterior se ensambla en una celda de electrodeposición, utilizando papel de aluminio como contacto para el electrodo de trabajo; donde un hilo de platino y un electrodo de Ag/AgCl actúan como electrodos auxiliar y de referencia, respectivamente, para proceder a una electrodeposición amperométrica de un polímero conductor en el interior de al menos uno de los poros (41) de la membrana (4) actuando como molde para generar al menos un microtubo (3), pudiendo tener los
10 poros (41) de la membrana (4) una forma esencialmente cilíndrica de distintas secciones transversales, forma bicónica o forma de doble cono unido por sus bases. Dicha electropolimerización amperométrica se lleva a cabo a partir de una disolución inicial comprendiendo: un monómero que se selecciona de entre anilina, pirrol y EDOT, y aditivos para favorecer la deposición y solubilización del monómero. El
15 monómero puede comprender grupos carboxílicos, expuestos en superficie del micromotor (5), simplificando una posterior funcionalización con anticuerpos específicos.

Una vez se tiene el microtubo (3) se procede a depositar diferentes capas (31,32,33) metálicas en el interior del microtubo (3), más concretamente se realiza una
20 deposición de una primera capa (31) mediante un método galvanostático en las paredes interiores del microtubo (3), que comprende Pt, con el objetivo de crear una superficie altamente conductora para posteriormente realizar una deposición sobre la primera capa (31) de una segunda capa (32), que se realiza mediante amperometría, segunda capa (32) que es magnética y comprende Ni, para a continuación llevar a
25 cabo una deposición sobre la segunda capa (32) de una tercera capa (33) que es catalítica y comprende Pt.

Los microtubos (3) se liberan de la membrana (4) mediante: la eliminación de la
30 capa de oro conductora, mediante pulido mecánico con una mezcla de alúmina y agua, y posteriormente mediante disolución de la membrana (4) en diclorometano se liberan los micromotores (5).

Una vez se tienen micromotores (5) fabricados, éstos se pueden lavar secuencialmente y favorecer su dispersión en medio acuoso mediante tratamiento con disoluciones de polaridad intermedia, en el siguiente orden: i) isopropanol, ii) etanol, iii) agua, para posteriormente proceder a separar los micromotores (5) de cada disolución mediante centrifugación. Los micromotores (5), para realizar su función en el dispositivo de análisis, pueden ser funcionalizados como se aprecia en la figura 2 mediante deposición sobre el micromotor (5) de una capa de oro para posteriormente incorporar anticuerpos específicos para los distintos biomarcadores en la superficie de los micromotores (5) parcialmente modificada, y producir un bloqueo de grupos reactivos residuales mediante una disolución de etanolamina.

Con los micromotores (5) fabricados se procede a insertarlos en un dispositivo microfluídico (2) que a su vez comprende canales (21) y pocillos (221,222,223) obteniendo así un dispositivo de análisis que comprende el citado dispositivo microfluídico (2) y los micromotores (5) en su interior.

En un segundo aspecto de la invención se tiene un dispositivo para análisis de material biológico obtenible según el método del primer aspecto de la invención, dicho dispositivo comprende el dispositivo microfluídico (2) y los micromotores (5) en su interior.

Un tercer aspecto de la invención es el uso del dispositivo para análisis de material biológico del dispositivo del segundo aspecto de la invención para reconocimiento específico de biomarcadores y bacterias características de sepsis neonatal.

Este tercer aspecto de la invención se detalla a continuación a modo de ejemplo de la misma. Se describe un ejemplo de realización de la presente invención en reconocimiento específico de biomarcadores y bacterias características de sepsis neonatal que se centra en la determinación de reactantes de fase aguda y bacteriológicas. Estos incluyen los niveles de proteína C reactiva (PCR), procalcitonina (PCT), citoquinas (IL-6), así como la determinación de bacterias del grupo estafilococo coagulasa negativo (*Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*), gérmenes más frecuentemente relacionados con esta infección.

Se proponen tres posibles realizaciones diferentes del tercer aspecto de la invención en función del tipo de detección utilizada, ya sea óptica (fluorimetría) o electroquímica (voltamperometría). Todas ellas están basadas en la utilización de micromotores (5) como soporte de inmovilización para una metodología ELISA, que gracias a su movimiento autónomo y autopropulsado permiten la determinación de compuestos diana en el interior de una plataforma microfluídica sin la necesidad de utilizar el movimiento de fluidos.

Una realización preferente del tercer aspecto de la invención viene dada por una detección fluorescente; la cual se basa en la utilización de distintas moléculas fluorescentes (Quantum dots –QDs-) como marcadores específicos de cada analito, que emiten radiación electromagnética a distintas longitudes de onda y con gran intensidad. Esto permite una detección simultánea y en un único sistema monocal de los distintos analitos objeto de análisis. Dicho método de análisis se detalla a continuación de manera esquematizada.

El análisis implica la utilización de distintas poblaciones de micromotores (5) funcionalizados con anticuerpos, en adelante Ab, específicos de cada una de las moléculas y bacterias que se van a analizar. La inmovilización de los Ab sobre la superficie de los micromotores (5) se llevará a cabo siguiendo alguna de las químicas de reacción publicadas en la bibliografía, ya comentadas en el epígrafe anterior. El análisis está basado en una metodología ELISA en formato sándwich.

1. Esta batería de distintos micromotores (5), donde cada uno de los tipos lleva inmovilizada una molécula de reconocimiento específico del analito diana, es añadida a un primer pocillo (221), denominado pocillo de reconocimiento, junto a un mínimo volumen de muestra (nL- μ L), además del “combustible” necesario para el movimiento del micromotor que pueden ser disoluciones acuosas comerciales de peróxido de hidrogeno (1-10%). Gracias a este movimiento autónomo y autopropulsado, dichos micromotores (5) navegarán por la disolución encontrando y uniendo las correspondientes moléculas diana específicas de cada población de micromotor (5).

2. Una vez se han producido los eventos de reconocimiento molecular, se lleva a cabo la orientación y guiado de los micromotores (5), gracias a la utilización de campos magnéticos u otro tipo de inducción como puede ser ultrasonidos, siendo

conducidos a través de los canales (21) y pocillos (221,222,223) de tal manera que se lleva del primer pocillo (221) al segundo pocillo (222).

3. Una disolución en este segundo pocillo (222), denominado pocillo de marcaje, contiene las distintas poblaciones de Ab secundarios específicos de los diferentes analitos. Cada tipo de Ab secundarios se inmovilizará sobre la superficie de partículas (mesoporosas (41) como sílica) que además co-inmovilizan varias moléculas de un compuesto marcador (QDs de una característica longitud de onda de emisión). De este modo se favorece la amplificación de la señal correspondiente al evento de reconocimiento. Al igual que en el apartado 1, este pocillo contiene el “combustible” necesario para que los micromotores (5) puedan navegar y se favorezca este segundo evento de reconocimiento molecular.

4. Del mismo modo que en el apartado 2, se produce el guiado de los micromotores (5) por el microcanal (21) hacia un tercer pocillo (223), denominado pocillo de detección.

5. En este tercer pocillo (223), tiene lugar la etapa de detección. Es importante remarcar que únicamente llegarán a este tercer pocillo (223) aquellas moléculas fluorescentes (QDs) inmovilizadas en la superficie de los micromotores (5) como consecuencia de la reacción de afinidad a través del analito. Este tercer pocillo (223) contendrá una disolución que producirá la liberación de las moléculas fluorescentes, mediante la ruptura de la unión de estas moléculas con las partículas que los contienen. De este modo, en este tercer pocillo (223) se encontrarán distintas concentraciones de cada uno de los QDs en función de la concentración de cada analito en la muestra.

La detección fluorescente puede realizarse fácilmente iluminando este tercer pocillo (223) con una única longitud de onda de absorción, a la que se excitan los distintos QDs, obteniéndose señales diferenciadas de cada uno de los distintos QDs por su emisión característica a distintas longitudes de onda. Para evitar la posible dispersión de radiación por la presencia de los micromotores (5) en disolución, este tercer pocillo (223) no contendrá combustible por lo que no se moverán y podrán ser fácilmente retenidos en el fondo del tercer pocillo (223) mediante la utilización de un campo

magnético.

Otra posible realización del tercer aspecto de la invención es la detección electroquímica, la cual se lleva a cabo de manera muy similar a la realización expuesta anteriormente del tercer aspecto de la invención en el que las moléculas utilizadas para su detección (QDs) son sustituidas por nanopartículas /nanobarras (“nanorods”) de distintos metales, tantos como analitos se determinan. En este sentido, los Ab secundarios específicos de cada analito son co-inmovilizados en las partículas (mesoporosas de sílica) junto a nanopartículas de un determinado metal.

10

La detección se producirá tras la liberación de las distintas nanopartículas metálicas (un metal diferente por cada analito) y cuya cantidad vendrá dada por la concentración de analito en la muestra. Esta detección se realiza mediante una técnica electroquímica de redisolución sobre la superficie de un electrodo incluido en el tercer pocillo (223) o pocillo de detección.

15

En una última posible realización del tercer aspecto de la invención se tiene una determinación enzimática, la cual se lleva a cabo de manera similar a las realizaciones anteriores del tercer aspecto de la invención, cuya diferencia fundamental estriba en la determinación independiente de los distintos biomarcadores. Esto se llevará a cabo en un único microchip que incorpora los canales (21) y sus correspondientes pocillos (221,222,223), como sistemas paralelos para la determinación independiente y multiplexada de los distintos analitos.

20

25

Por tanto, las etapas del procedimiento se repiten para cada uno de los sistemas dedicados a un determinado analito y todos ellos incluidos en el mismo dispositivo.

1. Ahora, en el primer pocillo (221) se añade una única población de micromotores (5) específicos para ese analito particular, junto al volumen de muestra y el combustible para su movimiento.

30

2. Los apartados 2 y 4 se mantiene igual que en los procedimientos anteriores.

3. Los Ab secundarios (específicos para cada analito y en su sistema correspondiente) son co-inmovilizados junto a numerosas moléculas de la enzima

peroxidasa (HRP) en las partículas (mesoporosas de sílica). En este caso la amplificación de la señal se ve aumentada por la utilización de la enzima (por cada molécula de enzima se obtienen un gran número de moléculas de producto) favoreciendo una mejora en la sensibilidad analítica.

5

5. El pocillo de detección (223) contendrá una disolución del sustrato enzimático y mediador electroquímico (HQ), que tras la correspondiente reacción enzimática dará lugar a la formación de un producto electroactivo que puede ser detectado sobre una superficie electródica y será directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra. En este caso no es necesaria la liberación de las moléculas de enzima de las partículas de inmovilización, ya que su catálisis no se verá afectada significativamente por dicha inmovilización. Este mismo procedimiento puede llevarse a cabo con detección fluorescente, sustituyendo el mediador electroquímico por un sustrato tal como el HPPA (3-p-hydroxyphenylpropionic acid)), cuyo producto de reacción con la enzima peroxidasa (HRP) da lugar a una molécula fluorescente

10

15

Finalmente, en un cuarto aspecto de la invención, tenemos un método de análisis de material biológico que hace uso del dispositivo del segundo aspecto de la invención, dicho método se encuentra representado en la figura 3 donde S es un sustrato (una molécula) que reacciona específicamente con una enzima E y P es un producto generado de esa reacción enzimática que es la molécula que realmente se mide al final basándose en alguna propiedad de la misma (óptica o electroquímica) como en el tercer aspecto de la invención; el método de análisis de material biológico que hace uso del dispositivo del cuarto aspecto de la invención comprende los siguientes pasos:

20

25

30

- insertar en el primer pocillo (221) denominado pocillo de reconocimiento un volumen de muestra a analizar,
- insertar en el primer pocillo (221) una serie de micromotores (5) que respectivamente comprenden inmovilizada una molécula de reconocimiento específico del analito diana para provocar uniones de las correspondientes moléculas diana específicas de molécula de reconocimiento específico del analito diana de micromotor (5),
- insertar en el primer pocillo además "combustible" necesario para el movimiento del micromotor (5).
- realizar una orientación y guiado del micromotor (5) desde el primer pocillo (221) hasta un segundo pocillo (222) del dispositivo, denominado pocillo de marcaje el cual

contiene moléculas secundarias específicas del analito, dicha orientación se puede hacer mediante inducción magnética y el guiado mediante propulsión por burbujas o ultrasonidos .

- 5 - realizar una orientación y guiado del micromotor (5) desde el segundo pocillo (222) hasta un tercer pocillo (223) del dispositivo, denominado pocillo de detección en el cual se produce una detección de concentración de analito presente en la muestra al igual que en el paso anterior, la orientación se puede hacer mediante inducción magnética y el guiado mediante propulsión por burbujas o ultrasonidos.

10

15

REIVINDICACIONES

1.- Método de fabricación de un dispositivo para análisis de material biológico, método
5 caracterizado porque comprende producir un micromotor (5) mediante las siguientes etapas:

- i. depositar una capa de material conductor mediante pulverización catódica sobre una membrana (4) porosa que comprende una pluralidad de poros (41) y destinada a actuar como molde para material depositado y como electrodo de
10 trabajo,
- ii. ensamblar el resultado del paso anterior en una celda de electrodeposición, utilizando papel de aluminio como contacto para el electrodo de trabajo; donde un hilo de platino y un electrodo actúan como electrodos auxiliar y de referencia, respectivamente,
- 15 iii. realizar una electrodeposición amperométrica de un polímero conductor en el interior de al menos uno de los poros (41) de la membrana actuando como molde para generar al menos un microtubo (3),
- iv. deposición de diferentes capas (31,32,33) metálicas en el interior del microtubo (3) resultante del paso anterior, donde dicha deposición comprende a su vez:
20
 - a. depositar una primera capa (31) en las paredes interiores del microtubo (3), que comprende Pt, con el objetivo de crear una superficie altamente conductora,
 - b. depositar sobre la primera capa (31) una segunda capa (32) que es magnética y comprende Ni y
 - 25 c. depositar, sobre la segunda capa (32), una tercera capa (33), que es catalítica y comprende Pt,
- v. eliminar la capa de material conductor para liberar los microtubos (3) de la membrana (4),
- 30 vi. disolver la membrana (4) en diclorometano para generar los micromotores (5), e
- vii. insertar los micromotores (5) en un dispositivo microfluídico (2) que a su vez comprende microcanales (21) conectando pocillos (221,222,223).

2.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que el material conductor de la capa

de material conductor depositada en el paso i es oro.

3.- Método según reivindicación 1 ó 2 caracterizado por que la capa de material conductor depositada en el paso i tiene un espesor comprendido entre 70 nm y 80 nm.

5

4.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que la electrodeposición amperométrica del paso iii se lleva a cabo a partir de una disolución inicial comprendiendo:

- un monómero que se selecciona de entre: anilina, pirrol y EDOT, y

10

-aditivos para favorecer la deposición y solubilización del monómero.

5.- Método según reivindicación 4 caracterizado por que el monómero comprende grupos carboxílicos para que dotar a la superficie del micromotor con grupos carboxílicos expuestos, simplificando una posterior funcionalización con anticuerpos específicos.

15

6.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que la deposición de la primera capa (31) en las paredes interiores del microtubo (3) se realiza mediante un método galvanostático.

20

7.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que la deposición de la segunda capa (32) se realiza mediante amperometría.

8.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que la eliminación de la capa de material conductor del paso v se lleva a cabo mediante pulido mecánico con una mezcla de alúmina y agua.

25

9.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que adicionalmente comprende:

- lavar los micromotores (5) resultantes secuencialmente y favorecer su dispersión en medio acuoso mediante tratamiento con disoluciones de polaridad intermedia, en el siguiente orden: 1) isopropanol, 2) etanol, 3) agua destilada, y
- separar los micromotores (5) de cada disolución mediante centrifugación.

30

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque adicionalmente comprende una funcionalización de al menos uno de

micromotores (5), mediante:

- deposición sobre el micromotor (5) de una capa de oro,
- incorporación de los anticuerpos específicos para los distintos biomarcadores en la superficie de los micromotores (5) parcialmente modificada, y
- bloqueo de grupos reactivos residuales mediante una disolución de etanolamina.

5

11.- Método según reivindicación 1 caracterizado por que los poros (41) de la membrana (4) tienen forma esencialmente cilíndrica de distintas secciones transversales.

10

12. Método según reivindicación 1 caracterizado por que los poros (41) de la membrana (4) tienen forma de doble cono unido por sus bases.

15

13. Dispositivo para análisis de material biológico obtenible según un cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

20

14. Uso del dispositivo para análisis de material biológico según reivindicación 13 para reconocimiento específico de biomarcadores y bacterias características de sepsis neonatal.

25

15. Método de análisis de material biológico que hace uso del dispositivo descrito en la reivindicación 13, método caracterizado porque comprende:

- insertar en un primer pocillo (221) denominado pocillo de reconocimiento un volumen de muestra a analizar,

- insertar en el primer pocillo (221) una serie de micromotores (5) que respectivamente comprenden inmovilizada una molécula de reconocimiento específico del analito diana para provocar uniones de las correspondientes moléculas diana específicas de molécula de reconocimiento específico del analito diana de micromotor (5),

30

- insertar en el primer pocillo una disolución acuosa de peróxido de hidrogeno necesaria para el movimiento del micromotor (5),

- realizar una orientación y guiado del micromotor (5) desde el primer pocillo (221) hasta un segundo pocillo (222) del dispositivo, denominado pocillo de marcaje el cual contiene moléculas secundarias específicas del analito, y

- realizar una orientación y guiado del micromotor (5) desde el segundo pocillo (222) hasta un tercer pocillo (223) del dispositivo, denominado pocillo de detección en el cual se produce una detección de concentración de analito presente en la muestra.

5

16. Método según reivindicación 15 caracterizado por que la orientación y guiado de los micromotores (5) desde los pocillos (221,222,223) a través de los canales (21) se lleva a cabo mediante orientación magnética y el guiado mediante propulsión por burbujas o ultrasonidos.

10

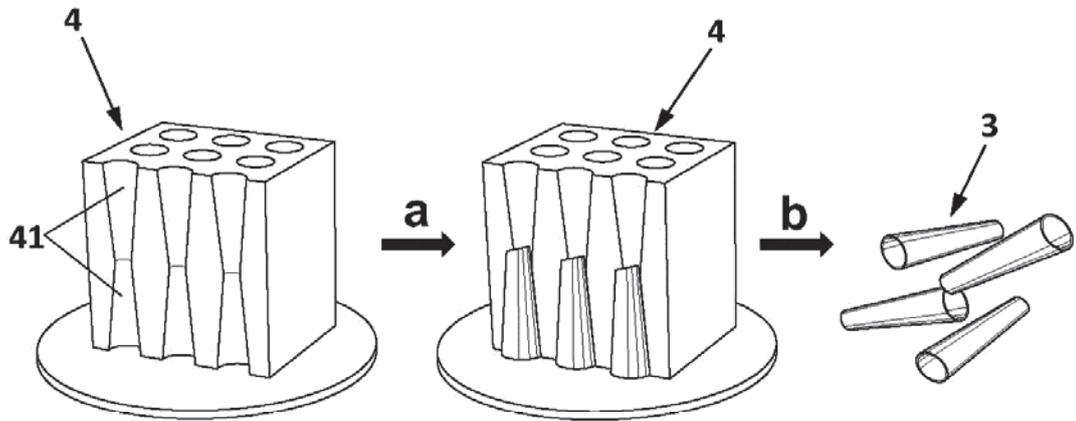


FIG. 1

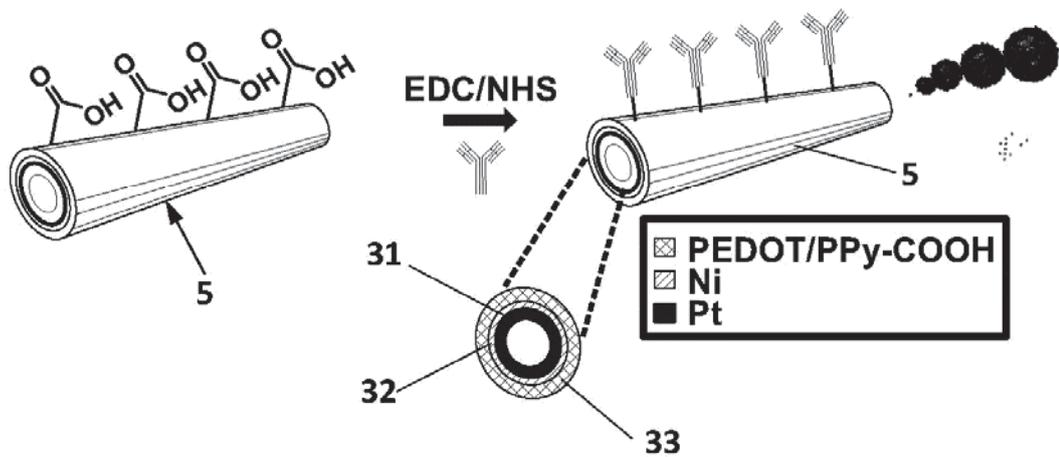


FIG. 2

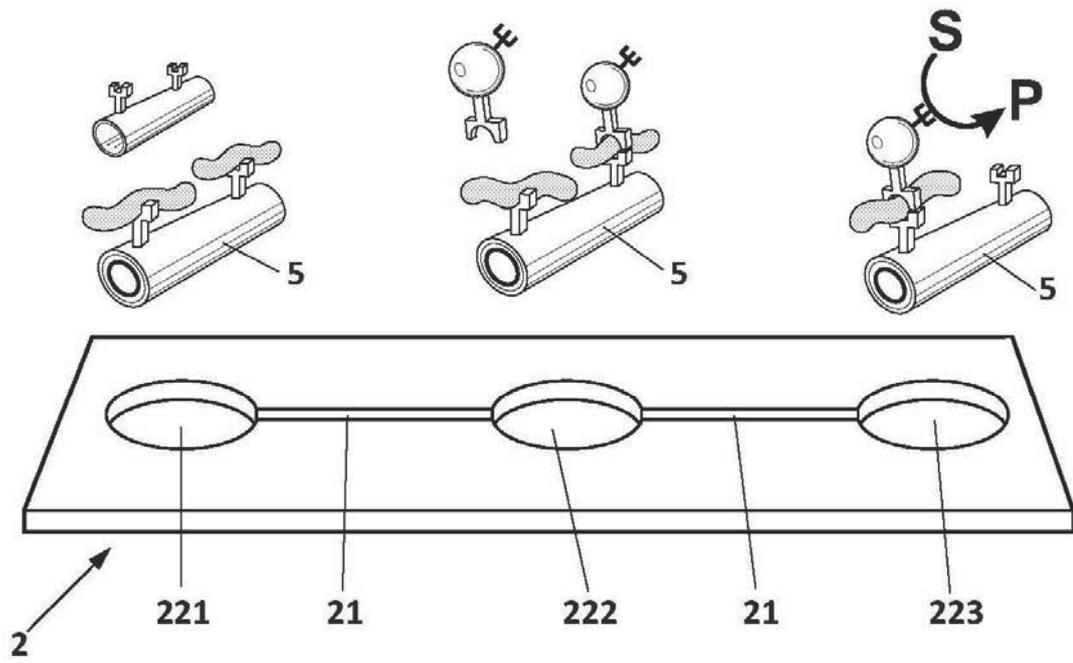


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201531139
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA GARCÍA, M., Synthesis and characterization of nanowires and micromotors for electrochemical sensing and biosensing in microfluidic analytical systems, Tesis Doctoral, [en línea], disponible el 22-05-2014, [Recuperado el 14-12-2016]. Recuperado de Internet: <URL: http://hdl.handle.net/10017/20308>. Capítulo III.	1-16
X	GARCÍA, M., et al., Micromotor-based lab-on-chip immunoassays, Nanoscale, 2013, Vol.5, páginas.1325-1331. Todo el documento.	1-16
A	GAO, W., et al., Polymer-based tubular microrobots: role of composition and preparation, Nanoscale, 2012, Vol. 4, páginas.2447-53. Resumen; figuras.; apartado: "Experimental section".	1-16
A	WANG, J., et al., Template electrodeposition of catalytic nanomotors, Faraday Discussions, 2013, Vol.164, páginas.9-18. Apartado 4.	1-16
A	GARCIA-GRADILLA, V., et al., Functionalized ultrasound-propelled magnetically guided nanomotors: toward practical biomedical applications, ACSNano, 2013, Vol.7, páginas.:9232-40. Apartado: "Experimental Section".	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 09.01.2017</p>	<p>Examinador M. d. García Poza</p>	<p>Página 1/6</p>
---	--	------------------------------



- ②① N.º solicitud: 201531139
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AGGARWAL, R., et al., Sepsis in the newborn, Indian J Pediatr., 2001, Vol.68, páginas: 1143-7. Resumen.	14
A	SIMONSEN, K.A., et al., Early-onset neonatal sepsis, Clin Microbiol Rev., 2014, Vol.27, páginas:21-47. Tabla 1.	14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.01.2017

Examinador
M. d. García Poza

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C25D7/04 (2006.01)
C25D5/12 (2006.01)
F03H99/00 (2009.01)
G01N33/48 (2006.01)
C12Q1/00 (2006.01)
B82Y40/00 (2011.01)
B82Y30/00 (2011.01)
B82Y15/00 (2011.01)

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

G01N, C25D, F03H, C12Q, B82Y

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

INVENES, EPODOC, WPI, INSPEC, NPL, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.12.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCÍA GARCÍA, M., Synthesis and characterization of nanowires and micromotors for electrochemical sensing and biosensing in microfluidic analytical systems, Tesis Doctoral, [en línea], disponible el 22-05-2014, [recuperado el 14-12-2016]. Recuperado de Internet: <URL: http://hdl.handle.net/10017/20308 >.	
D02	GARCÍA, M., et al., Micromotor-based lab-on-chip immunoassays, Nanoscale, 2013, Vol.5, págs.1325-1331.	

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

El documento D01 (o también el D02) divulga un método de fabricación de un dispositivo para análisis de material biológico (D01: fig. III.8; apartado III.2.4. Experimental Section; tabla III.S.1. D02: apartado: "Experimental section"), que comprende producir un micromotor e insertar los micromotores en los microcanales de un dispositivo microfluídico, donde el micromotor se produce mediante las siguientes etapas:

- i. depositar una capa de material conductor (lámina de oro de 75 nm) mediante pulverización catódica sobre una membrana porosa que comprende una pluralidad de poros (membrana de policarbonato, que contiene microporos de forma cónica de diámetro máximo 2 micrómetros, con forma de doble cono unido por sus bases, página 224) y destinada a actuar como molde para material depositado y como electrodo de trabajo;
- ii. ensamblar el resultado del paso anterior en una celda de electrodeposición, utilizando papel de aluminio como contacto para el electrodo de trabajo; donde un hilo de platino y un electrodo actúan como electrodos auxiliar y de referencia, respectivamente, a partir de una disolución inicial comprendiendo EDOT y EDOT-COOH y aditivos para favorecer la deposición y solubilización del monómero (dodecilsulfato sódico y KNO₃);
- iii. realizar una electrodeposición amperométrica de un polímero conductor en el interior de al menos uno de los poros de la membrana actuando como molde para generar al menos un microtubo;
- iv. deposición de diferentes capas metálicas en el interior del microtubo resultante del paso anterior, donde dicha deposición comprende a su vez: a. depositar una primera capa en las paredes interiores del microtubo, que comprende Pt, mediante un método galvanostático; b. depositar una segunda capa que comprende Ni, mediante amperometría; y c. depositar una tercera capa que comprende Pt;
- v. eliminar la capa de material conductor para liberar los microtubos de la membrana, mediante pulido mecánico con una mezcla de agua y alúmina;
- vi. disolver la membrana en diclorometano para generar los micromotores.

Los micromotores resultantes se lavan repetidamente con diclorometano, etanol y agua destilada, y se centrifugan para separarlos de cada disolución.

Los micromotores se pueden funcionalizar mediante la incorporación de anticuerpos específicos para los distintos biomarcadores y el posterior bloqueo de los grupos reactivos residuales, mediante disolución de etanolamina.

Por lo tanto, a la vista de la información divulgada en el documento D01 (y en el D02) se considera que el método de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1 a 12, carece de novedad y de actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).

También se encuentra divulgado el dispositivo recogido en la reivindicación 13, por lo que no es nuevo ni inventivo (Arts. 6.1 y 8.1 LP).

El documento D01 (y también el D02) divulga el uso del dispositivo de la invención para el análisis de material biológico para reconocimiento específico de biomarcadores y bacterias características de sepsis neonatal, recogido en la reivindicación 14 (Staphylococcus aureus, págs.209-210). Por lo tanto, dicha reivindicación carece de novedad y de actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).

Por último, el documento D01 (y el D02) también divulga el uso del dispositivo para análisis de material biológico que comprende insertar en un primer pocillo un volumen de muestra a analizar, insertar también unos micromotores con una molécula de reconocimiento específico del analito diana y, por último, una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno; llevar el micromotor al segundo pocillo, que contiene moléculas secundarias específicas del analito; y llevar el micromotor al tercer pocillo para la detección de la muestra. Donde la orientación y el guiado de los micromotores se lleva a cabo mediante orientación magnética y guiado mediante propulsión (págs. 197-211).

Por lo tanto, a la vista de la información divulgada en dichos documentos se considera que uso del dispositivo de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 15 y 16, carece de novedad y de actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).