

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 279**

21 Número de solicitud: 202030077

51 Int. Cl.:

C08F 212/32 (2006.01)
C08F 26/10 (2006.01)
C08F 22/38 (2006.01)
C08F 12/06 (2006.01)
C08F 12/22 (2006.01)
C08F 12/32 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

31.01.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.08.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

28.10.2021

Fecha de concesión:

25.04.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.05.2022

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE BURGOS (100.0%)
C/ Hospital del Rey s/n
09001 Burgos (Burgos) ES

72 Inventor/es:

GUEMBE GARCÍA, Marta;
VALLEJOS CALZADA, Saúl;
GARCÍA PÉREZ, Jose Miguel;
GARCÍA GARCÍA, Félix;
IBEAS CORTÉS, Saturnino y
YAGÜE FERNÁNDEZ, Patricia

54 Título: **Copolímeros de estructura derivada de la ninhidrina, películas o membranas obtenidas a partir de los mismos y su utilización**

57 Resumen:

La invención proporciona nuevos copolímeros reticulados, en forma de película, membrana o gel, así un procedimiento de obtención de dichos copolímeros reticulados. Estos copolímeros actúan como sensores cromogénicos, siendo materiales que cambian de color en presencia de aminoácidos, proteínas pequeñas o péptidos presentes en el medio, empleándose para la detección y/o cuantificación de aminoácidos, péptidos y proteínas pequeñas en muestras de heridas, exudados de heridas, muestras biológicas, muestras médicas o medios acuosos, sin ningún tratamiento previo.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
 Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 847 279 B2

DESCRIPCIÓN

COPOLÍMEROS DE ESTRUCTURA DERIVADA DE LA NINHIDRINA, PELÍCULAS O MEMBRANAS OBTENIDAS A PARTIR DE LOS MISMOS Y SU UTILIZACIÓN

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos copolímeros de estructura derivada de la ninhidrina y a su uso, en forma de películas o membranas, como sensores colorimétricos para aminoácidos, péptidos y proteínas pequeñas con el fin de detectar los citados componentes en muestras acuosas, heridas, exudados de heridas, muestras biológicas, muestras médicas y similares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Las dificultades de cicatrización de heridas cutáneas es un problema de primera magnitud que afecta aproximadamente al 1-2% de la población y genera gran sufrimiento a los pacientes, a la vez que supone un enorme coste económico (en España: 350 millones de euros/año). Así, por ejemplo, las úlceras venosas, heridas abiertas en la piel, son la primera causa de lesión crónica.

Actualmente no hay una solución a este problema, aunque existe el consenso médico (WUWHS) “de que la mayor actividad de las proteasas es actualmente el mejor marcador disponible para los trastornos de la cicatrización cuando se han excluido otras causas, y que el uso efectivo de un kit de análisis de proteasas tiene el potencial de cambiar el tratamiento de las heridas a nivel mundial”.

Las enzimas que degradan las proteínas en péptidos y aminoácidos se denominan proteasas. Éstas juegan un papel clave en los procesos de cicatrización, ya que degradan las proteínas dañadas de la matriz extracelular (ME) permitiendo la formación de tejidos nuevos y, por tanto, la cicatrización ordenada. El equilibrio degradación/regeneración de proteínas es delicado y, cuando se altera por un exceso de proteasas, ocasionando la degradación de la ME recién formada y de otras proteínas tales como los factores de crecimiento y sus receptores, se producen

dificultades en la cicatrización, con prolongación de la fase inflamatoria, impidiendo que la herida avance hacia la fase proliferativa.

En este sentido, el conocimiento de la existencia de un exceso de proteasas en una
5 herida permite evaluar el riesgo de ulceración y el pronóstico y la probabilidad de cicatrización y, con ello, establecer medidas paliativas para reducir la actividad de las proteasas, que en la actualidad son: limpieza regular de las heridas con eliminación sistemática del exudado; la eliminación de escaras en cada cambio de apósito o el desbridamiento quirúrgico; apósitos moduladores de las proteasas (por ejemplo
10 colágeno/celulosa oxidada regenerada, que se unen a las proteasas, inactivándolas); apósitos antisépticos, ya que una reducción de los niveles bacterianos también puede reducir la actividad de las proteasas; antiinflamatorios; y apósitos y dispositivos absorbentes de los exudados de las heridas.

15 Por tanto, es crítico poder anticiparse a los problemas de cicatrización con intervenciones avanzadas. Así, es previsible que las pruebas de detección de marcadores de la cicatrización, como la actividad de las proteasas, ayuden a los profesionales sanitarios tanto a predecir qué heridas van a presentar dificultades de cicatrización, como a proponer un tratamiento específico a las heridas que ya
20 presentan estos problemas.

Sin embargo, actualmente es muy difícil evaluar el nivel de proteasas en las heridas. Respecto a las pruebas analíticas, algunos estudios de investigación han evaluado a nivel de laboratorio los niveles actividad de proteasas en exudados utilizado diversas
25 técnicas, tales como zimografía en gelatina y ELISA, que utiliza anticuerpos para medir los niveles de proteasas.

En la práctica, la evaluación analítica de la actividad de las proteasas no es factible para la mayoría de los profesionales sanitarios. En relación con la evaluación clínica,
30 se puede sospechar de una actividad excesiva de las proteasas en heridas que no cicatrizan, aunque los signos clínicos de inflamación son difíciles de diferenciar de aquellos debidos a la infección.

La patente EP1576181B1, por ejemplo, describe un biosensor para detectar la

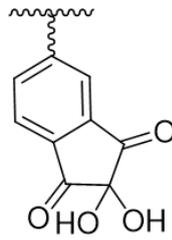
- presencia o ausencia en una muestra de la herida de un sujeto de una infección, comprendiendo biosensor un soporte sólido y un sustrato marcado de forma detectable para una proteasa producida y/o secretada por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*,
- 5 *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*, pero no producida y/o secretada por una bacteria no patógena o el sujeto, donde dicho sustrato está unido a dicho soporte sólido, y donde el sustrato es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 9 o 10.
- 10 Por su parte, la solicitud CN1773264A describe un método de detección colorimétrico para el análisis de cisteína que comprende preparar un complejo de transferencia de carga de color azul a partir de dipirometano y un compuesto de quinona, etanol anhidro o acetonitrilo como disolvente.
- 15 La solicitud Internacional WO2017/212345 describe un compuesto formado por un polisacárido, un sitio reactivo para una hidrolasa específica de herida y un indicador que comprende un colorante empleado para detectar infecciones en heridas basadas en la acción enzimática del sitio reactivo.
- 20 A la vista del estado de la técnica, sería ventajoso disponer de una forma de evaluar la presencia de aminoácidos, proteínas pequeñas o péptidos presentes en una muestra, sencilla de aplicar en el entorno clínico.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25

La presente invención queda establecida y caracterizada en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la misma.

- 30 Así, en un primer aspecto, la invención proporciona nuevos copolímeros reticulados, con estructuras de fórmula (I), derivada de ninhidrina,



(I)

en forma de recubrimiento, película, membrana o gel.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al procedimiento de obtención de los
5 copolímeros reticulados antes descritos.

Los copolímeros de fórmula I anteriormente descritos actúan como sensores
cromogénicos, es decir, son materiales que cambian de color en presencia de
determinadas sustancias. Dicho cambio de color ocurre cuando hay aminoácidos,
10 proteínas pequeñas o péptidos presentes en el medio.

Así, la invención describe el uso de los copolímeros reticulados descritos como
sensores cromogénicos para la detección y/o cuantificación de aminoácidos, péptidos
y proteínas pequeñas en muestras de heridas, exudados de heridas, muestras
15 biológicas, muestras médicas o medios acuosos, sin ningún tratamiento previo.

En el contexto de esta descripción, se entiende como “copolímero reticulado” un
copolímero que forma una red por la unión de diferentes cadenas poliméricas. La
formación de dicha red a partir de diferentes cadenas poliméricas se denomina
20 reticulación.

Igualmente, en el contexto de la presente descripción, el término “copolímero” se
refiere a un polímero que comprende al menos dos monómeros diferentes y el término
“polímero” se refiere a una molécula que comprende una o más unidades
25 estructurales que se repiten sucesivamente, denominadas “monómeros”. Los
polímeros se obtienen por la unión repetitiva de tales monómeros mediante reacción
de grupos reactivos (o grupos polimerizables) presentes en cada uno de los
monómeros, en un proceso denominado polimerización.

A efectos de la presente descripción, son ejemplos no limitantes de aminoácidos,

isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp), valina (Val), histidina (His), tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), la glicina (Gly), alanina (Ala), prolina (Pro), serina (Ser), asparagina (Asn) y arginina (Arg). En una realización
5 preferente dicho cambio de color ocurre cuando hay isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp), valina (Val), histidina (His), tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), la glicina (Gly), alanina (Ala), prolina (Pro), serina (Ser), asparagina (Asn) o arginina (Arg) en el medio.

10

Igualmente, a efectos de la presente descripción es ejemplo no limitante de proteínas pequeñas o péptidos el glutatión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Se complementa la presente memoria descriptiva, con un juego de figuras, ilustrativas y no limitativas de la invención.

20

Figura 1: Caracterización de la N-(3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-5-il)metacrilamida (a) estructura química; (b) espectro de infrarrojo; (c) resonancia magnética de protón (RMN 1H); (d) resonancia magnética de carbono (RMN 13C).

25

Figura 2: Membranas sensoras preparadas según el Ejemplo 3 después de ser sumergidas en disoluciones 1:1 tampón pH 4,66, disolución 0,1M, de diferentes aminoácidos (muestras B, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Ala, Tyr, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Hyp, Ser, Asn, Arg, BSA y Glut, en las que la escala de grises corresponde a una escala de color donde el gris más oscuro corresponde al color azul y los colores grises más claros corresponden con colores amarillos), y el cambio de color de dichas membranas se corresponde con la detección cualitativa de las
30 muestras, siendo positiva en al caso de azules (grises oscuros) y negativa en el caso de los amarillos (grises claros). Es positiva en el caso de: Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Ala, Tyr, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Ser, Asn, Arg y Glut, y negativa B, Hyp y BSA.

Figura 3: Membranas sensoras preparadas según el Ejemplo 3 después de ser

sumergidas en disoluciones 1:1 tampón pH 4,66, disolución de elastina sintética con diferentes concentraciones (muestras 1 a 7, en las que la escala de grises corresponde a una escala de color donde el gris más oscuro corresponde al color azul y los colores grises más claros corresponden con colores amarillos), y el cambio de color de dichas membranas traducido a las componentes principales (CP) de los parámetros R, G y B obtenidos mediante la cámara fotográfica digital de un teléfono móvil. En la gráfica se representa la relación entre $\log[M, \text{mol/L}]$ y CP, así como el ajuste a $y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(\text{LOGx0-x}) * p})$.

10 Figura 4: Membranas sensoras preparadas según el Ejemplo 3 después de ser sumergidas en disoluciones 1:1 tampón pH 4,66, disolución sintética de colágeno con diferentes concentraciones de (muestras 1 a 7, en las que la escala de grises corresponde a una escala de color donde el gris más oscuro corresponde al color azul y los colores grises más claros corresponden con colores amarillos), y el cambio de color de dichas membranas traducido a las componentes principales (CP) de los parámetros R, G y B obtenidos mediante la cámara fotográfica digital de un teléfono móvil. En la gráfica se representa la relación entre $\log[M, \text{mol/L}]$ y CP, así como el ajuste a $y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0-x}) * p)})$.

20 Figura 5: Membranas sensoras preparadas según el Ejemplo 3 después de ser sumergidas en disoluciones 1:1 tampón pH 4,66, disolución sintética de epidermis con diferentes concentraciones (muestras 1 a 10, en las que la escala de grises corresponde a una escala de color donde el gris más oscuro corresponde al color azul y los colores grises más claros corresponden con colores amarillos), y el cambio de color de dichas membranas traducido a las componentes principales (CP) de los parámetros R, G y B obtenidos mediante la cámara fotográfica digital de un teléfono móvil. En la gráfica (Figura 5A) se representa la relación entre $\log[M, \text{mol/L}]$ y CP, así como el ajuste a una regresión lineal. La gráfica de la Figura 5B muestra la relación entre $[M, \text{mol/L}]$ y CP, así como el ajuste a la ecuación $y = y0 + A1 * (1 - \exp(-x/t1)) + A2 * (1 - \exp(-x/t2))$.

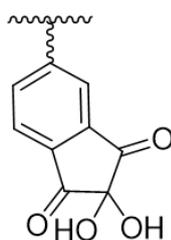
Figura 6: Membranas sensoras preparadas según el Ejemplo 3 después de ser sumergidas en disoluciones 1:1 tampón pH 4,66, disoluciones con diferentes grados de hidrolisis de matriz alimentaria (vacuno, corto lomo) (muestras 1 a 8, en las que la

escala de grises corresponde a una escala de color donde el gris más oscuro corresponde al color azul y los colores grises más claros corresponden con colores amarillos), y el cambio de color de dichas membranas traducido a las componentes principales (CP) de los parámetros R, G y B obtenidos mediante la cámara fotográfica digital de un teléfono móvil. En la gráfica se representa la relación entre %DH y CP, así como el ajuste a un polinomio de grado 2.

Figura 7: Membranas sensoras preparadas según el Ejemplo 3 después de ser sumergidas en disoluciones 1:1 tampón pH 4,66, extractos de diferentes muestras biológicas (muestras A-E, en las que la escala de grises corresponde a una escala de color donde el gris más oscuro corresponde al color azul y los colores grises más claros corresponden con colores amarillos), y el cambio de color de dichas membranas traducido a las componentes principales (CP) de los parámetros R, G y B obtenidos mediante la cámara fotográfica digital de un teléfono móvil. En la gráfica se representa la relación entre %DH y CP, así como el ajuste a una regresión lineal.

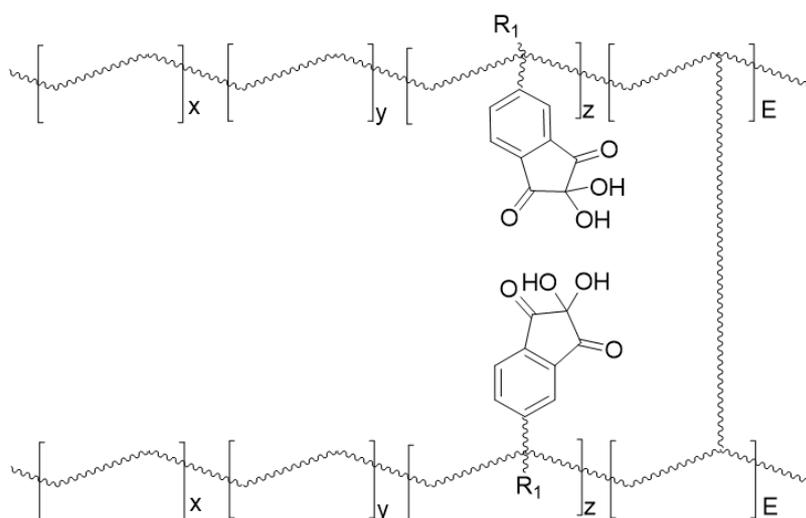
EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con el primer aspecto, la invención proporciona nuevos copolímeros reticulados, con estructuras de fórmula (I), derivada de ninhidrina,



(I)

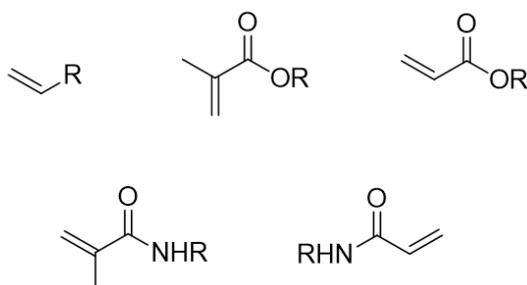
en forma de película, membrana o gel con la siguiente estructura (II)



(II)

donde R_1 es un grupo H o CH_3 , y donde x, y, z son los porcentajes de los monómeros utilizados y E representa el porcentaje en peso de reticulante, comprendiendo los monómeros grupos polimerizables, seleccionándose al menos uno de estos monómeros de vinil pirrolidona, siendo z del 0,1% al 10% del número total de monómeros, la proporción x:y 1:3 a 3:1 y siendo E entre el 10% y 0,1% del número total de monómeros.

Como ejemplos no limitativos de grupos polimerizables se pueden citar los grupos vinilo, metacrilato, acrilato, metacrilamida o acrilamida.



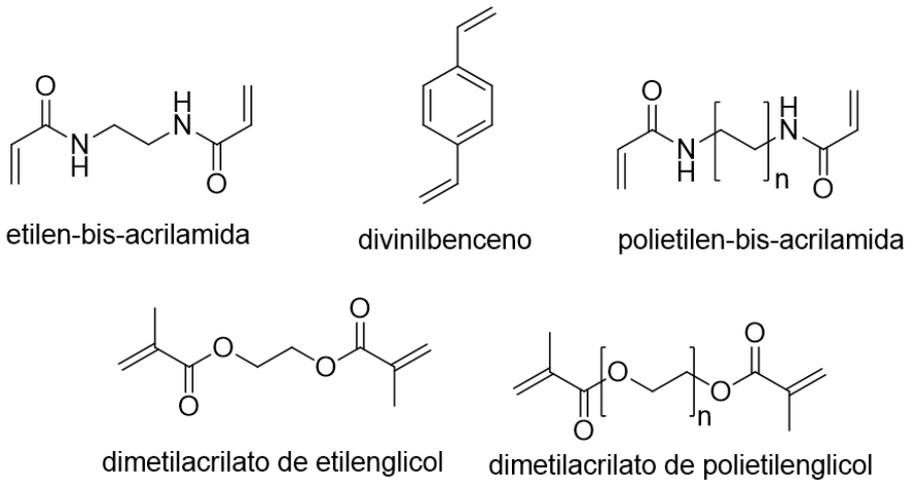
donde R es H o un grupo alquilo, alquénilo o arilo.

En una realización de la invención, al menos uno de los monómeros con grupos polimerizables se selecciona de entre el grupo consistente en metacrilato de metilo, acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de metilo, estireno, acrilato de 2-hidroxi-etilo, metacrilato de 2-hidroxi-etilo, metacrilato de 2-etoxietilo, acrilato de laurilo, metacrilato de laurilo, acetato de vinilo, ácido metacrílico, anhídrido metacrílico, ácido

acrílico, metacrilamida y metacrilato de 2-N,N-dimetilaminoetilo.

Al menos uno de los monómeros con grupos polimerizables es vinil pirrolidona.

- 5 Los reticulantes presentes en el copolímero reticulado se pueden seleccionar, independientemente entre sí, sin limitarse a, etilen-bis-acrilamida, divinilbenceno, polietilen-bis-acrilamida, dimetilacrilato de etilenglicol y dimetilacrilato de polietilenglicol.

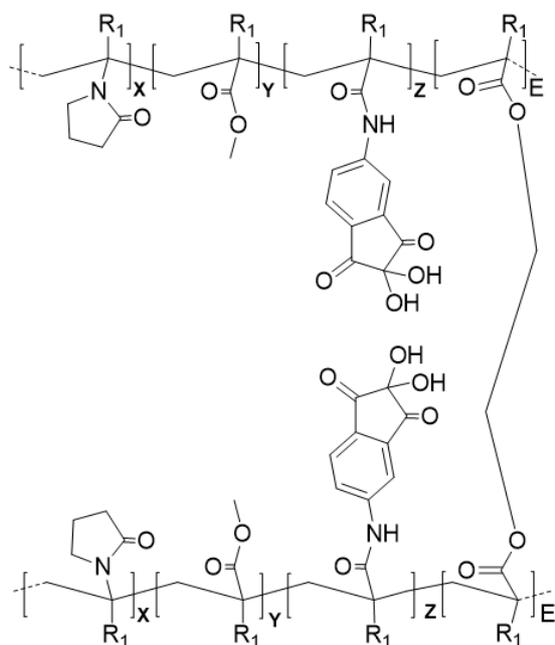


- 10 En una realización preferente de la invención, al menos un reticulante es dimetilacrilato de etilenglicol.

En una realización preferente, la proporción x:y es de 1:1.

- 15 En otra realización preferente z representa el 1% del número total de monómeros.

En una realización preferente, los copolímeros reticulados de la presente invención son los copolímeros de fórmula (IX):



(IX)

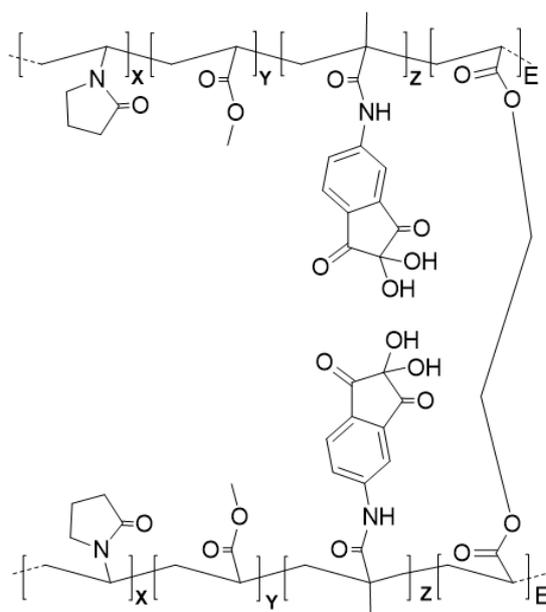
donde cada R₁ se selecciona independientemente entre H o CH₃; z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros; y donde la proporción x:y es de 1:3 a 3:1.

5

Preferentemente, en los copolímeros de fórmula (IX) la proporción x:y es 1:1 y z representa 1% del número total de monómeros.

En otra forma de realización de la invención, los copolímeros reticulados son los copolímeros de fórmula (X):

10



(X)

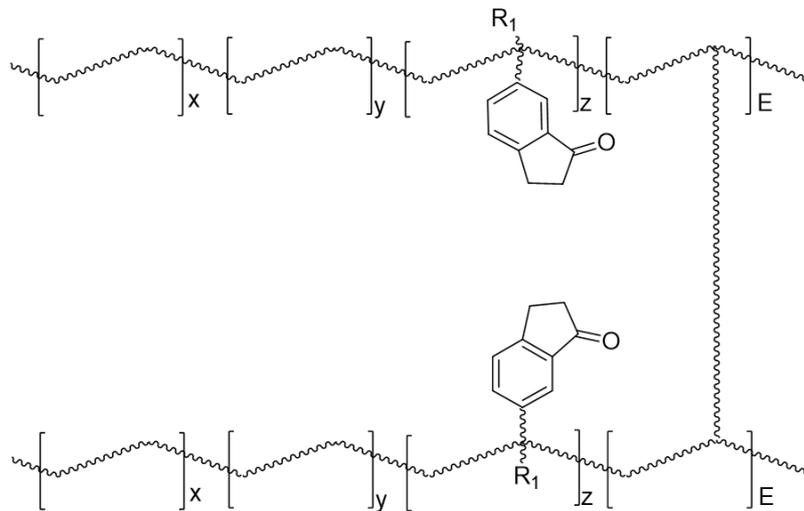
donde z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros, y la proporción x:y es de 1:3 a 3:1.

- 5 Preferentemente, en los copolímeros de fórmula (X) la proporción x:y es 1:1 y z representa 1% del número total de monómeros.

De acuerdo con el segundo aspecto, la invención se refiere al procedimiento de obtención de los copolímeros reticulados antes descritos, comprendiendo el

10 procedimiento los pasos de

- a) obtener un copolímero de fórmula (III)



(III)

donde R_1 es un grupo H o CH_3 , y donde x, y, z son los porcentajes de los monómeros utilizados y E representa el porcentaje en peso de reticulante, comprendiendo los monómeros grupos polimerizables, seleccionándose al menos uno de éstos de vinil pirrolidona, siendo z del 0,1% al 10% del número total de monómeros, la proporción x:y 1:3 a 3:1 y siendo E entre el 10% y 0,1% del número total de monómeros

mediante polimerización de al menos dos monómeros, donde al menos uno de los monómeros comprende un grupo 1-indanona, llevándose a cabo la polimerización por reacción directa de los grupos polimerizables presentes en cada uno de los monómeros;

b) sumergir por completo el copolímero obtenido en el paso (a) en una disolución de SeO_2 en dioxano para obtener el copolímero (II).

En una realización preferente de la invención, el al menos uno de los monómeros que comprende un grupo 1-indanona incluye además un grupo polimerizable vinilo.

En una realización preferente de la invención, al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) se seleccionan independiente entre un grupo que consiste metacrilato de metilo, acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de metilo, estireno, acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-etoxietilo, acrilato de laurilo, metacrilato de laurilo, acetato de vinilo, ácido metacrílico, anhídrido metacrílico, ácido acrílico, metacrilamida, metacrilato de 2-N,N-

dimetilaminoetilo.

Al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) es vinil pirrolidona.

- 5 En una realización preferente de la presente invención, al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) es metacrilato de metilo.

En una realización preferente de la invención, al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) se selecciona, independiente, de entre el grupo que consiste
10 en etilen-bis-acrilamida, divinilbenceno, polietilen-bis-acrilamida, dimetilacrilato de etilenglicol, dimetilacrilato de polietilenglicol.

En una realización preferente de la invención, al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) es dimetilacrilato de etilenglicol.

15

La polimerización del paso a) se lleva a cabo en disolución o en bloque. A efectos de la presente invención se denomina polimerización en bloque, o polimerización en masa, a la técnica de polimerización en la cual solamente los monómeros y el iniciador están presentes en el medio de reacción. En el caso de que la polimerización se
20 realice por iniciación térmica sin necesidad de iniciador, solamente están presentes los monómeros en el medio de reacción.

A efectos de la presente invención se denomina polimerización en disolución a la técnica de polimerización en la cual además de los monómeros e iniciador, se emplea
25 un disolvente.

En una realización preferente, el paso (b) del proceso anteriormente descrito comprende la inmersión en una disolución de SeO_2 en dioxano con una concentración de 1g/l.
30

30

En una realización especialmente preferente del paso (b), la disolución de SeO_2 en dioxano comprende 1 g de SeO_2 en 200mL de dioxano.

En una realización preferente del paso (b) del procedimiento descrito, la inmersión en

la disolución SeO_2 se realiza durante a 110°C , durante una noche.

Si bien es conocido un proceso convencional de síntesis de copolímeros reticulados que comprenden una estructura de fórmula I, por ejemplo(i) sintetizando un
5 monómero derivado de ninhidrina, y (ii) realizando una posterior copolimerización con los otros dos monómeros comerciales, tal y como se describe en la bibliografía (S. Vallejos, A. Muñoz, S. Ibeas, F. Serna, F. García, J. M. García, J. Mater. Chem. A. 2013, 1, 15435-15441), dicho proceso convencional resulta mucho más costoso, al añadir un paso más de reacción a la ruta sintética.

10

Así, llevando a cabo el procedimiento descrito en la presente invención la síntesis de la estructura (I) derivada de ninhidrina dentro del propio material polimérico, mediante modificación directamente en las cadenas poliméricas, se consigue obtener un material estable durante años sin ningún tipo de almacenaje ni tratamiento especial.

15

Para ello, se hace imprescindible realizar la polimerización mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

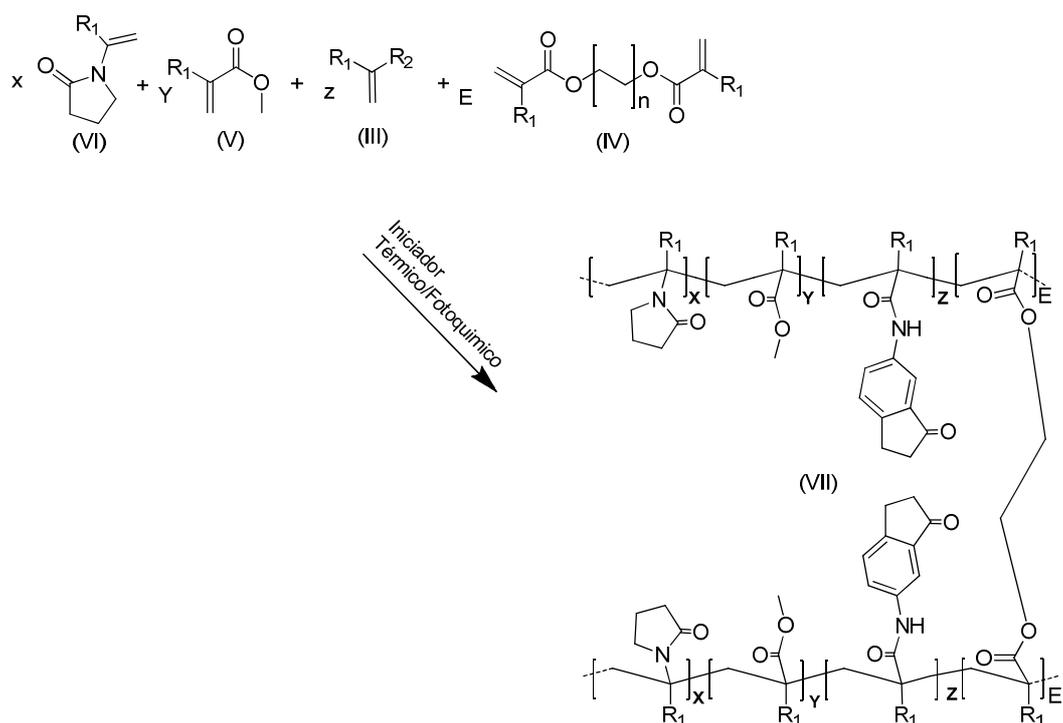
En una forma de realización, el procedimiento antes descrito se lleva a cabo con la adición de un iniciador térmico y/o fotoquímico.

20

En este caso, en el paso (a) del procedimiento descrito, los al menos dos monómeros utilizados son monómeros de fórmula (VI), monómeros de fórmula (V), monómero reticulante de fórmula (IV) y monómero anclaje de fórmula (III), y los grupos polimerizables presentes en cada uno de los monómeros son grupos vinilo, según el

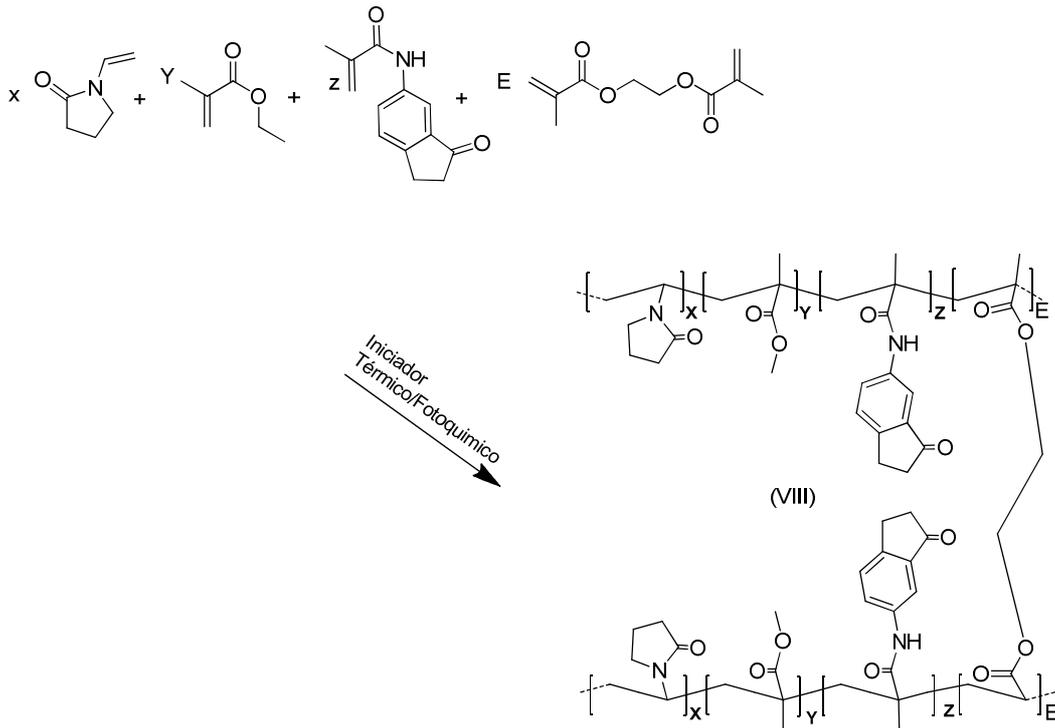
25

siguiente esquema:



5 donde cada R₁ se selecciona independientemente entre H o CH₃, R₂ comprende 1-indanona; z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros; y donde la proporción de x:y es de 1:3 a 3:1.

10 En una realización particular, el paso a) del procedimiento aquí descrito se lleva a cabo mediante la polimerización de N-(3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-5-il)metacrilamida, vinil pirrolidona y metacrilato de metilo, obteniéndose un copolímero de fórmula (VIII), según el siguiente esquema:



donde z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros y la proporción x:y es de 1:3 a 3:1.

5 También se describe aquí el uso de los copolímeros reticulados descritos, en forma de membranas o películas, como sensores cromogénicos para la detección y/o cuantificación de aminoácidos, péptidos y proteínas pequeñas en muestras de heridas, exudados de heridas, muestras biológicas, muestras médicas o medios acuosos, sin ningún tratamiento previo.

10

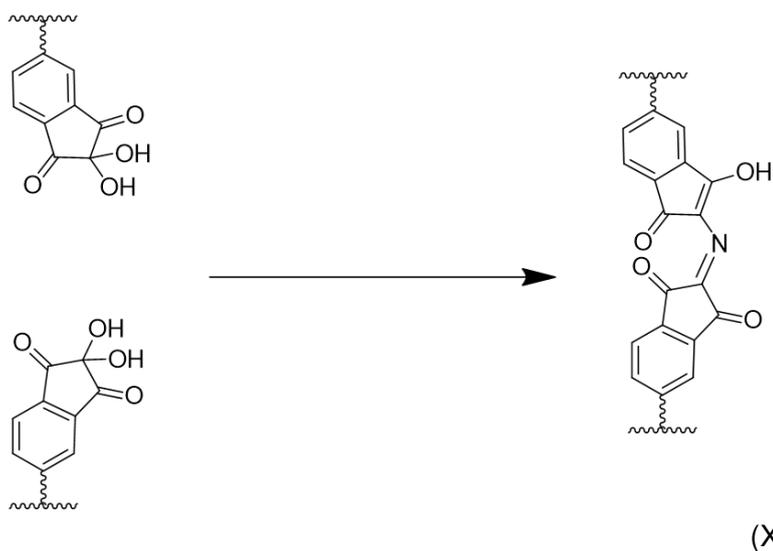
El cambio de color por la presencia de aminoácidos, péptidos y proteínas pequeñas se observa por la inmersión de los copolímeros reticulados, en forma de membranas o películas, que comprenden de la presente invención en los distintos medios sin ningún tipo de tratamiento previo de la muestra. Por tanto, los copolímeros aquí descritos se pueden utilizar como sensores para la detección cualitativa o cuantitativa de aminoácido, péptidos y proteínas pequeñas.

15

Por tanto, la invención describe el uso de los copolímeros reticulados aquí descritos en la detección y/o cuantificación de aminoácido, péptidos y proteínas pequeñas, en medios acuosos y biológicos, mediante la utilización de los parámetros RGB de una fotografía digital.

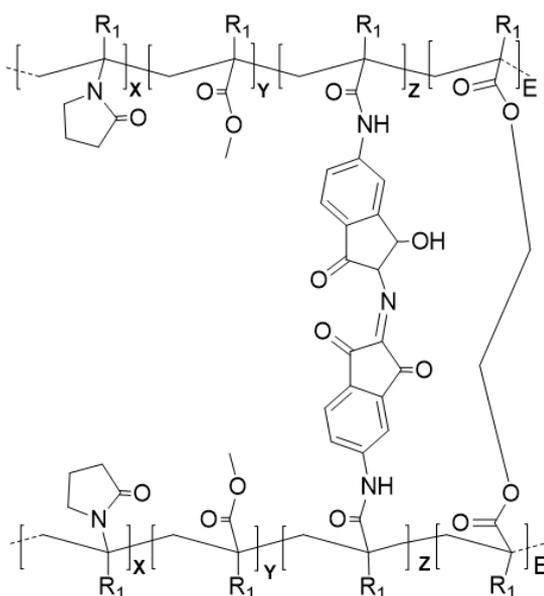
20

A este respecto, con los copolímeros de la presente invención, durante el proceso de detección/ cuantificación, en presencia de aminoácidos, péptidos y/o proteínas pequeñas, se produce una reticulación mediante estructuras de tipo (XI), de tipo ninhidrina, partir de copolímeros que comprenden grupos 1-indanona:



5

Así mismo, en una realización preferente, en el proceso de detección/cuantificación, en presencia de aminoácidos, péptidos y/o proteínas pequeñas, con los copolímeros de la presente invención se obtienen estructura con un mayor grado de reticulación de fórmula (XII):



10

(XII)

donde cada R_1 se selecciona independientemente entre H o CH_3 ; z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros; y la proporción x:y es de 1:3 a 3:1.

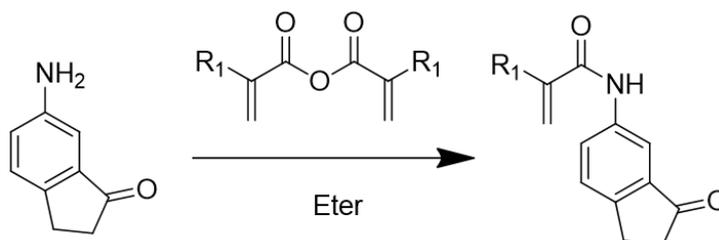
En una realización preferente, en los compuestos de fórmula (XII) la proporción x:y es de 1:1 y z representa el 1% del número total de monómeros.

5 **EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la invención, y no pretenden ser limitativos de la misma

10 Ejemplo 1: Síntesis de N-(3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-5-il)metacrilamida (Ejemplo 1)

En un matraz a presión se añadieron 2 g (13,6 mmol) de 6-aminoindanona, 300 ml de éter y 2,34g (15,2 mmol) de anhídrido metacrílico. La disolución se agitó durante toda la noche a 50 °C. Posteriormente la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró para eliminar las impurezas. A continuación, se eliminó la mezcla de disolventes por evaporación. Finalmente, el compuesto se lavó en un aparato de soxhlet utilizando hexano como disolvente. El rendimiento fue del 60%. La caracterización del compuesto obtenido se muestra en la Figura 1.



Ejemplo 2: Preparación de un copolímero según la invención

20

Mediante copolimerización en bloque se preparó una membrana con la composición que se indica a continuación: monómeros: vinil pirrolidona, metacrilato de metilo y N-(3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-5-il)metacrilamida, en una relación molar 49,5, 49,5 y 1, respectivamente. Iniciador térmico AIBN con un porcentaje en peso del 1%. La disolución resultante se inyectó en un molde de cristales silanizados, de 100 µm de espesor, en ausencia de oxígeno, y se colocó en una estufa a 60°C durante toda una noche

Ejemplo 3: Preparación de un copolímero reticulado mediante estructuras de fórmula I

Para la preparación se siguieron las siguientes etapas de forma sucesiva: a) inmersión durante toda la noche del copolímero obtenido en el ejemplo 1 en una disolución de SeO_2 en dioxano (1g de SeO_2 + 200 ml de dioxano, b) inmersión durante 1 hora en una disolución tamponada pH 4,6 de aminoácidos (1 ml disolución tamponada pH 4,66 + 1 ml de disolución acuosa de aminoácidos).

Ejemplo 4: Comportamiento como sensor cromogénico del copolímero obtenido en el ejemplo 3 frente a la presencia de aminoácidos, péptidos y proteínas (glutación y BSA) en medio acuoso en una disolución sintética de elastina

10

Este ejemplo ilustra el comportamiento como sensor cromogénico del material polimérico de estructura (II), cuya síntesis se ilustra en el Ejemplo 3, hacia la presencia de aminoácidos, péptidos y proteínas (glutación y BSA) en medio acuoso, mediante la introducción de la membrana preparada en el Ejemplo 3 en una disolución 1:1 disolución tamponada a pH=4,66 y disolución de aminoácidos, péptidos o proteínas (glutación y BSA) en medio acuoso durante 1h a 100°C. Se fotografiaron varias películas después de ser sumergidas en disoluciones de aminoácidos, péptidos y proteínas (glutación y BSA) en medio acuoso (muestras identificadas en la fotografía de la Figura 2 como muestras B, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Ala, Tyr, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Hyp, Ser, Asn, Arg, BSA y Glut). Una vez hecha la fotografía podemos distinguir la presencia cualitativa muestras Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Ala, Tyr, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Ser, Asn, Arg, y Glut).

Ejemplo 5: Comportamiento sensor frente a la presencia de aminoácidos en una disolución sintética de elastina en medio acuoso.

Este ejemplo ilustra el comportamiento como sensor cromogénico del material polimérico de estructura (II), cuya síntesis se ilustra en el Ejemplo 3, hacia la presencia de aminoácidos en una disolución sintética de e elastina en medio acuoso, mediante la introducción de la membrana preparada en el Ejemplo 3 en una disolución 1:1 disolución tamponada a pH=4,66 y disolución sintética de elastina en medio acuoso durante 1h a 100°C. Se fotografiaron varias películas después de ser sumergidas en disoluciones con diferentes cantidades de disolución sintética de elastina en medio acuoso (muestras identificadas en la fotografía de la Figura 3 como

muestras 1 a 7). Una vez obtenidos los parámetros RGB de cada muestra se agruparon las componentes R y G en una sola variable, realizando un análisis multivariante de componentes principales, tal como se muestra en la Tabla 1 para cada una de las muestras 1 a 7:

5

Tabla 1

ELASTINA						
	LOG M	M	R	G	B	PC (RGB)
1	-2.00	1.00E-02	0	0	70	-2.36
2	-2.30	5.00E-03	0	0	95	-1.94
3	-2.60	2.50E-03	29	55	135	-0.67
4	-3.00	1.00E-03	120	128	153	0.81
5	-3.12	7.50E-04	129	136	152	0.91
6	-5.00	1.00E-05	192	187	153	1.741
7	-6.00	1.00E-06	191	185	141	1.52

La inmersión de las películas en disoluciones con diferentes cantidades de mercurio produce una variación en sus componentes principales que se relaciona con el aumento de la cantidad de elastina, tal y como se observa gráficamente en la Figura

10 3. El límite de detección de la elastina alcanzado fue de $3,47 \cdot 10^{-4}$ mol/l, y el de cuantificación de $1,05 \cdot 10^{-3}$ mol/l. El ajuste a una ecuación $y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$ de la relación entre $\log_1[M, \text{mol/l}]$ y PC mostrada en la gráfica de la Figura 3 se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2

Tabla 2			
Modelo	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Ajuste R ²	0,99241		
		Valor	Error estándar
PC (RGB)	A1	-2,75	0,28
PC (RGB)	A2	1,61	0,10

PC (RGB)	LOGx0	-2,64	0,05
PC (RGB)	p	-1,69	0,24

Ejemplo 6: Comportamiento sensor frente a la presencia de aminoácidos en una disolución sintética de colágeno en medio acuoso.

- 5 Este ejemplo ilustra el comportamiento como sensor cromogénico del material polimérico de estructura (II), cuya síntesis se ilustra en el Ejemplo 3, hacia la presencia de aminoácidos en una disolución sintética de colágeno en medio acuoso, mediante la introducción de la membrana preparada en el ejemplo 3 en una disolución 1:1 disolución tamponada a pH=4,66 y disolución sintética de colágeno en medio
- 10 acuoso durante 1h a 100°C. Se fotografiaron varias películas después de ser sumergidas en disoluciones con diferentes cantidades de disolución sintética de colágeno en medio acuoso (muestras identificadas en la fotografía de la Figura 4 como muestras 1 a 7). Una vez obtenidos los parámetros RGB de cada muestra se agruparon las componentes R y G en una sola variable, realizando un análisis
- 15 multivariante de componentes principales, tal como se muestra en la Tabla 3 para cada una de las muestras 1 a 7:

Tabla 3

COLÁGENO						
	LOG M	M	R	G	B	PC (RGB)
1	-1,30	5,00E-02	0	1	62	-2,68
2	-2	1,00E-02	0	0	74	-2,53
3	-2,60	2,50E-03	82	94	139	-0,38
4	-3	1,00E-03	136	143	153	0,55
5	-3,30	5,00E-04	175	173	147	0,96
6	-4	1,00E-04	181	177	144	0,99
7	-5	1,00E-05	195	192	159	1,40

- La inmersión de las películas en disoluciones con diferentes cantidades de colágeno
- 20 produce una variación en sus componentes principales que se relaciona con el aumento de la cantidad de colágeno, tal y como se observa gráficamente en la Figura

4. El límite de detección alcanzado fue de $4,06 \cdot 10^{-4}$ mol/l, y el de cuantificación de $1,23 \cdot 10^{-3}$ mol/l. El ajuste a una ecuación $y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$ de la relación entre $\log[M, \text{mol/L}]$ y PC mostrada en la gráfica de la Figura 4 se muestra en la Tabla 4:

5

Tabla 4

Modelo	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$		
Ajuste R^2	0,98352		
		Valor	Error estándar
PC (RGB)	A1	-2,80	0,23
PC (RGB)	A2	1,15	0,14
PC (RGB)	LOGx0	-2,52	0,07
PC (RGB)	p	-1,80	0,45

Ejemplo 7: Comportamiento sensor frente a la presencia de aminoácidos en una disolución sintética de epidermis en medio acuoso

10 Este ejemplo ilustra el comportamiento como sensor cromogénico del material polimérico de estructura (II), cuya síntesis se ilustra en el Ejemplo 3, hacia la presencia de aminoácidos en una disolución sintética de epidermis en medio acuoso, mediante la introducción de la membrana preparada en el ejemplo 3 en una disolución 1:1 disolución tamponada a $\text{pH}=4,66$ y disolución sintética de epidermis en medio
 15 acuoso durante 1h a 100°C . Se fotografiaron varias películas después de ser sumergidas en disoluciones con diferentes cantidades de disolución sintética de epidermis en medio acuoso (muestras identificadas en la fotografía de la Figura 5 como muestras 1 a 10). Una vez obtenidos los parámetros RGB de cada muestra se agruparon las componentes R y G en una sola variable, realizando un análisis
 20 multivariante de componentes principales, tal como se muestra en la Tabla 5 para cada una de las muestras 1 a 10:

Tabla 5

EPIDERMIS						
	LOG(M)	M	R	G	B	PC(RGB)
1	-2,00	1,00E-02	1	16	103	-2,16
2	-2,08	8,30E-03	0	15	109	-1,98
3	-2,17	6,70E-03	0	18	114	-1,78
4	-2,44	3,60E-03	11	43	124	-1,06
5	-2,64	2,30E-03	30	63	140	-0,11
6	-2,82	1,50E-03	69	96	145	0,81
7	-3,00	1,00E-03	101	122	147	1,49
8	-3,08	8,30E-04	109	129	146	1,62
9	-3,17	6,70E-04	124	140	146	1,89
10	-3,30	5,00E-04	143	155	146	2,25

La inmersión de las películas en disoluciones con diferentes cantidades de colágeno en medio acuoso produce una variación de sus componentes principales que se relaciona con el aumento de la cantidad de epidermis, tal y como se observa gráficamente en la Figura 5A. El límite de detección de la epidermis alcanzado fue de $1,24 \cdot 10^{-4}$ mol/l, y el de cuantificación de $3,77 \cdot 10^{-3}$ mol/l. El ajuste a una ecuación lineal de la relación entre $\log[M, \text{mol/l}]$ y PC mostrada en la gráfica de la Figura 5B se muestra en la Tabla 6:

10

Tabla 6

Tabla 6			
Modelo	$y = a + b \cdot x$		
Ajuste R^2	0,98993		
		Valor	Error estándar
PC (RGB)	a	-9,55	0,33
PC (RGB)	b	-3,61	0,12

De la misma manera, La inmersión de las películas en disoluciones con diferentes

cantidades de epidermis produce una variación en sus componentes principales que se relaciona con el aumento de la cantidad de epidermis, tal y como se observa gráficamente en la Figura 5A. El límite de detección de epidermis alcanzado fue de $1,24 \cdot 10^{-4}$ mol/l, y el de cuantificación de $3,77 \cdot 10^{-3}$ mol/l. El ajuste a una ecuación $y = y_0 + A1 \cdot (1 - \exp(-x/t1)) + A2 \cdot (1 - \exp(-x/t2))$ de la relación entre M y PC mostrada en la gráfica de la Figura 5C se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7

Modelo	$y = y_0 + A1 \cdot (1 - \exp(-x/t1)) + A2 \cdot (1 - \exp(-x/t2))$		
Ajuste R ²	0,99753		
		Valor	Error estándar
PC(RGB)	y0	3,27	0,17
PC(RGB)	A1	-2,73	4,08E+06
PC(RGB)	t1	2,40E-03	2232,73
PC(RGB)	A2	-2,73	4,08E+06
PC(RGB)	t2	2,40E-03	2232,73

Ejemplo 8: Comportamiento sensor frente a la presencia de aminoácidos en una matriz alimentaria (vacuno, corte lomo) hidrolizada.

Este ejemplo ilustra el comportamiento como sensor cromogénico de material polimérico de estructura (II), cuya síntesis se ilustra en el Ejemplo 3, hacia la presencia de aminoácidos en una matriz alimentaria (vacuno, corte lomo) hidrolizada, mediante la introducción de la membrana preparada en el Ejemplo 3 en una disolución 1:1 disolución tamponada a pH=4,66 y matriz alimentaria (vacuno, corte lomo) durante 1h a 100°C. Se fotografiaron varias películas después de ser sumergidas en disoluciones con diferentes grados de hidrólisis de matriz alimentaria (vacuno, corte lomo) (muestras identificadas en la fotografía de la Figura 6 como muestras 1-8). Una vez obtenidos los parámetros RGB de cada muestra se agruparon las componentes R y G en una sola variable, realizando un análisis multivariante de componentes principales, tal como se muestra en la Tabla 8 para cada una de las muestras 1-8:

Tabla 8

	DH%	t	R	G	B	CP RGB
1	5,34	20	115,00	128,00	143,33	2,03
2	8,00	40	107,00	123,33	145,33	1,87
3	10,67	60	102,67	119,00	146,00	1,72
4	18,06	120	94,00	123,00	144,67	1,54
5	31,86	240	94,00	107,00	124,00	0,08
6	36,92	300	81,00	89,00	128,00	-0,37
7	45,61	420	48,50	63,00	131,00	-1,47
8	52,40	540	32,50	47,50	121,50	-2,67

La inmersión de las películas en disoluciones con diferentes grados de hidrólisis de matriz alimentaria (vacuno, corto lomo) produce una variación en sus componentes principales que se relaciona con el grado de hidrólisis de matriz alimentaria (vacuno, corto lomo), tal y como se observa gráficamente en la Figura 6. El límite de detección del grado de hidrólisis (DH%) alcanzado fue de 1,84DH%, y el de cuantificación de 5,57DH%. El ajuste a una ecuación polinómica de orden 2 de la relación entre %DH y PC mostrada en la gráfica de la Figura 6 se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9

Modelo	polinomio		
Ajuste R ²	0,99646		
		Valor	Error estándar
PC (RGB)	Intersección	2,09	0,11
PC (RGB)	B1	-0,01	0,01
PC (RGB)	B2	-1,5E-03	1,87E-04

Ejemplo 9: Comportamiento sensor frente a la presencia de aminoácidos en una muestra biológica hidrolizada

15

Este ejemplo ilustra el comportamiento como sensor cromogénico del material polimérico de estructura (II), cuya síntesis se ilustra en el Ejemplo 3, hacia la

presencia de aminoácidos en una muestra biológica hidrolizada, mediante la introducción de la membrana preparada en el Ejemplo 3 en una disolución 1:1 disolución tamponada a pH=4,66 y muestra biológica durante 1h a 100°C. Se fotografiaron varias películas después de ser sumergidas en disoluciones con diferentes muestras biológicas hidrolizadas (muestras identificadas en la fotografía de la Figura 7 como muestras A-E). Una vez obtenidos los parámetros RGB de cada muestra se agruparon las componentes R y G en una sola variable, realizando un análisis multivariante de componentes principales, tal como se muestra en la Tabla 10 para cada una de las muestras A-E:

10

Tabla 10

Muestra	DH%	R	G	B	CP (RGB)
A	0,05	135	145	148	-1,14
B	0,04	155	161	153	0,64
C	0,07	127	139	151	-1,86
D	0,03	160	164	145	1,08
E	0,03	163	166	152	1,29

15

La inmersión de las películas en disoluciones de diferentes muestras biológicas hidrolizadas produce una variación en sus componentes principales que se relaciona con el grado de hidrólisis de las muestras biológicas, tal y como se observa gráficamente en la Figura 7. El límite de detección del grado de hidrólisis en muestras biológicas alcanzado fue de 0,00848, y el de cuantificación de 0,0257. El ajuste a una regresión lineal de la relación entre %DH y CP mostrada en la gráfica de la Figura 7 se muestra en la Tabla 11:

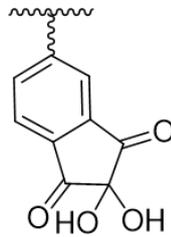
Tabla 11

Modelo	$y = a + b \cdot x$		
Ajuste R^2	0,96572		
		Valor	Error estándar
PC (RGB)	a	4,35	0,42
PC (RGB)	b	-94,68	8,88

20

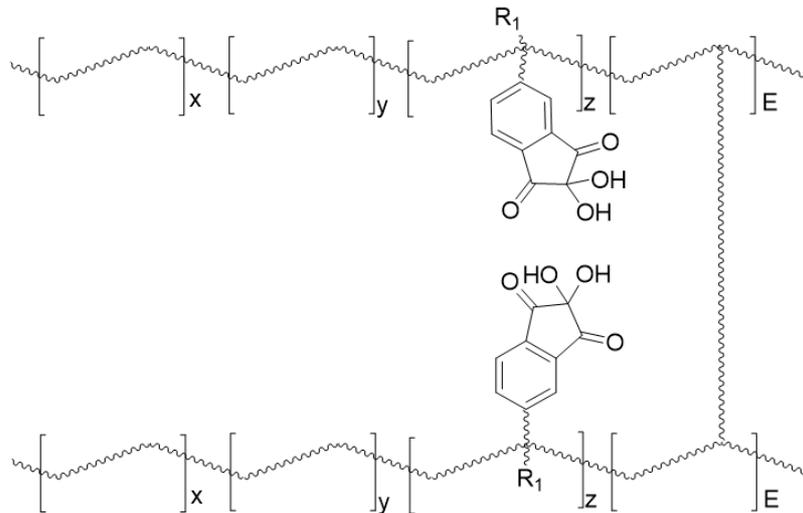
REIVINDICACIONES

1.- Copolímeros reticulados, con estructuras de fórmula (I), derivada de ninhidrina,



(I)

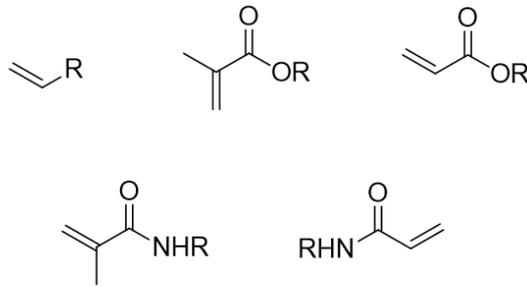
5 en forma de película, membrana o gel con la siguiente estructura (II)



(II)

donde R_1 es un grupo H o CH_3 , y donde x, y, z son los porcentajes de los monómeros utilizados y E representa el porcentaje en peso de reticulante, comprendiendo los monómeros grupos polimerizables, seleccionándose al menos uno de estos monómeros con grupos copolimerizables de vinil pirrolidona, siendo z del 0,1% al 10% del número total de monómeros, la proporción x:y 1:3 a 3:1 y siendo E entre el 10% y 0,1% del número total de monómeros.

2.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 1, caracterizados porque los de grupos polimerizables se seleccionan de entre grupos vinilo, metacrilato, acrilato, metacrilamida o acrilamida



donde R es H o un grupo alquilo, alqueniilo o arilo.

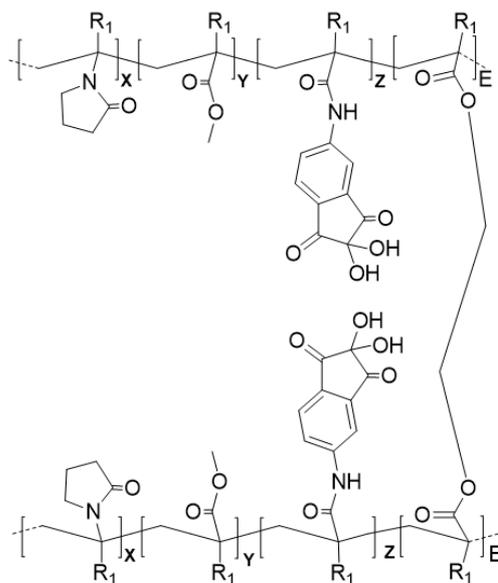
3.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 1, caracterizados porque al menos uno de los monómeros con grupos polimerizables se selecciona de entre el grupo consistente en metacrilato de metilo, acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de metilo, estireno, acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-etoxietilo, acrilato de laurilo, metacrilato de laurilo, acetato de vinilo, ácido metacrílico, anhídrido metacrílico, ácido acrílico, metacrilamida y metacrilato de 2-N,N-dimetilaminoetilo.

10

4.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 1, caracterizados porque al menos un reticulante es dimetilacrilato de etilenglicol.

5.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 1, caracterizados porque tienen la fórmula (IX):

15



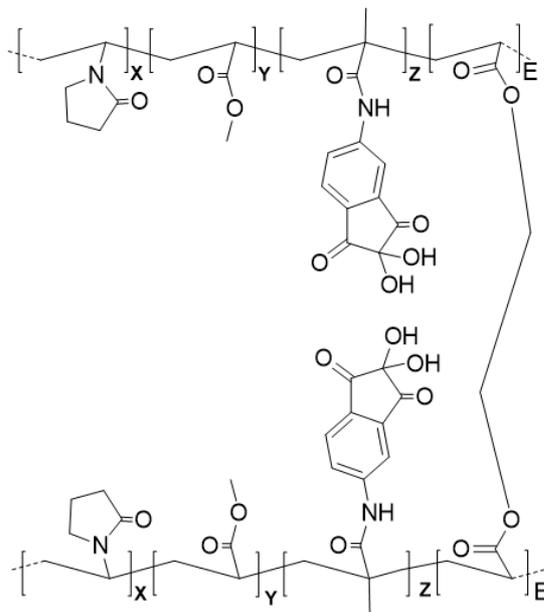
(IX)

donde cada R_1 se selecciona independientemente entre H o CH_3 ; z representa entre

0,1% a 10% del número total de monómeros; y donde la proporción x:y es de 1:3 a 3:1.

6.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 5, caracterizados porque la proporción x:y es 1:1 y z representa 1% del número total de monómeros.

7.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 1, caracterizados porque tienen la fórmula (X):



(X)

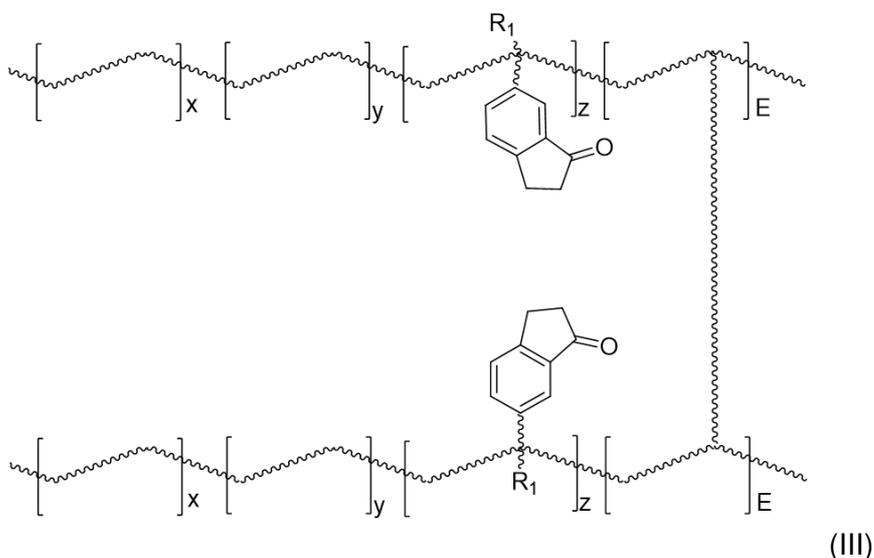
10 donde z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros, y la proporción x:y es de 1:3 a 3:1.

8.- Copolímeros reticulados según la reivindicación 7, caracterizados porque la proporción x:y es 1:1 y z representa 1% del número total de monómeros.

15

9.- Procedimiento de obtención de los copolímeros reticulados según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el procedimiento los pasos de

a) obtener un copolímero de fórmula (III)



donde R_1 es un grupo H o CH_3 , y donde x, y, z son los porcentajes de los monómeros utilizados y E representa el porcentaje en peso de reticulante, comprendiendo los monómeros grupos polimerizables, seleccionándose al menos un monómero de vinil pirrolidona, siendo z del 0,1% al 10% del número total de monómeros, la proporción x:y 1:3 a 3:1 y siendo E entre el 10% y 0,1% del número total de monómeros

mediante polimerización de al menos dos monómeros, donde al menos uno de los monómeros comprende un grupo 1-indanona, llevándose a cabo la polimerización por reacción directa de los grupos polimerizables presentes en cada uno de los monómeros;

b) sumergir por completo el copolímero obtenido en el paso (a) en una disolución de SeO_2 en dioxano para obtener el copolímero (II).

10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el al menos uno de los monómeros que comprende un grupo 1-indanona incluye además un grupo polimerizable vinilo.

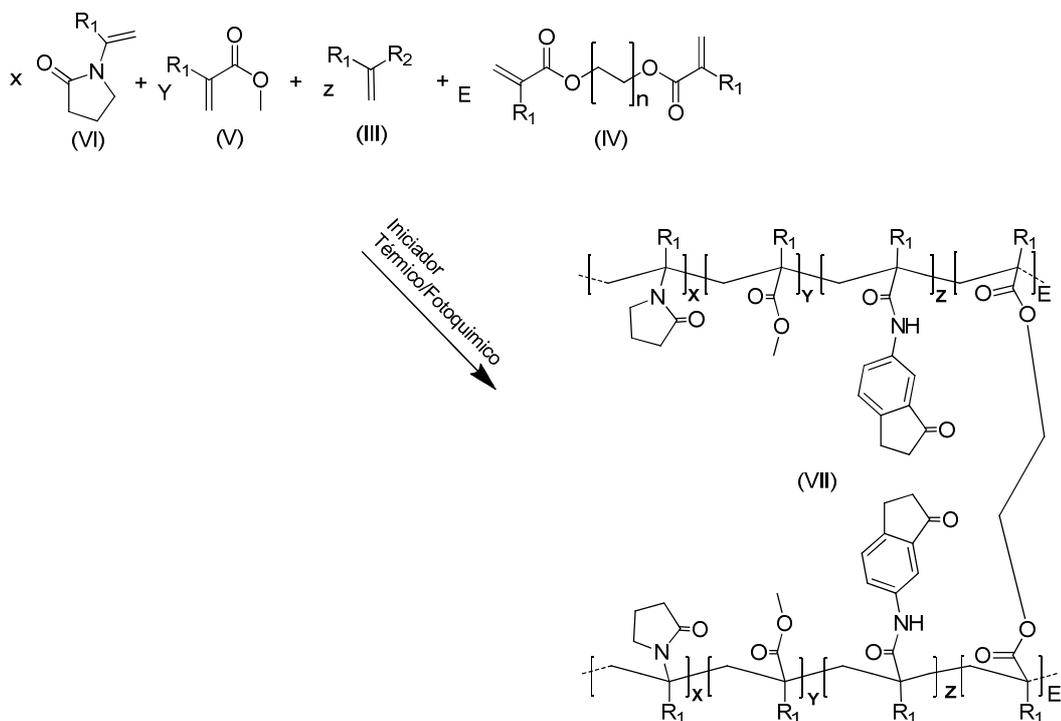
20

11.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) se selecciona independientemente de entre el grupo consistente en metacrilato de metilo, acrilato de butilo, metacrilato de butilo, acrilato de metilo, estireno, acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo,

metacrilato de 2-etoxietilo, acrilato de laurilo, metacrilato de laurilo, acetato de vinilo, ácido metacrílico, anhídrido metacrílico, ácido acrílico, metacrilamida, metacrilato de 2-N,N-dimetilaminoetilo.

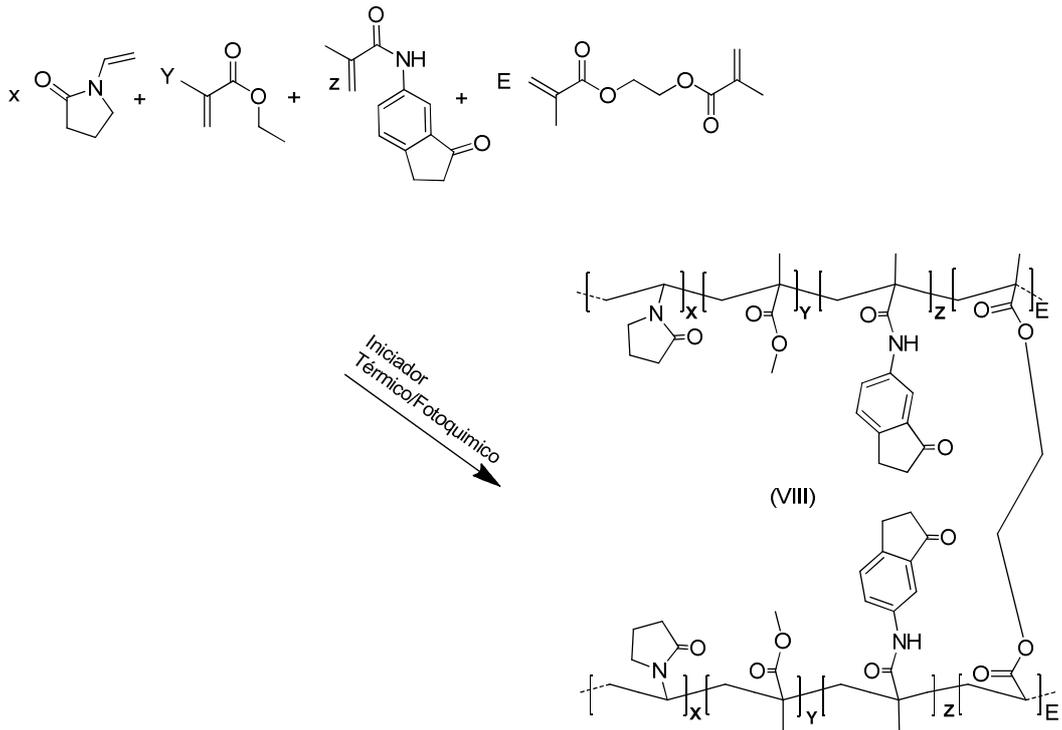
5 12.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque al menos uno de los monómeros utilizados en el paso (a) es dimetilacrilato de etilenglicol.

13.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque en el paso (a) los al menos dos monómeros utilizados son monómeros de fórmula (VI), monómeros de
10 fórmula (V), monómero reticulante de fórmula (IV) y monómero anclaje de fórmula (III), y los grupos polimerizables presentes en cada uno de los monómeros son grupos vinilo, según el siguiente esquema:



15 donde cada R₁ se selecciona independientemente entre H o CH₃, R₂ comprende 1-indanona; z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros; y donde la proporción de x:y es de 1:3 a 3:1.

14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque el paso a) se lleva a cabo mediante la polimerización de N-(3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-5-il)metacrilamida, vinil pirrolidona y metacrilato de metilo, obteniéndose un copolímero de fórmula (VIII), según el siguiente esquema:
20



donde z representa entre 0,1% a 10% del número total de monómeros y la proporción $x:y$ es de 1:3 a 3:1.

Figura 1

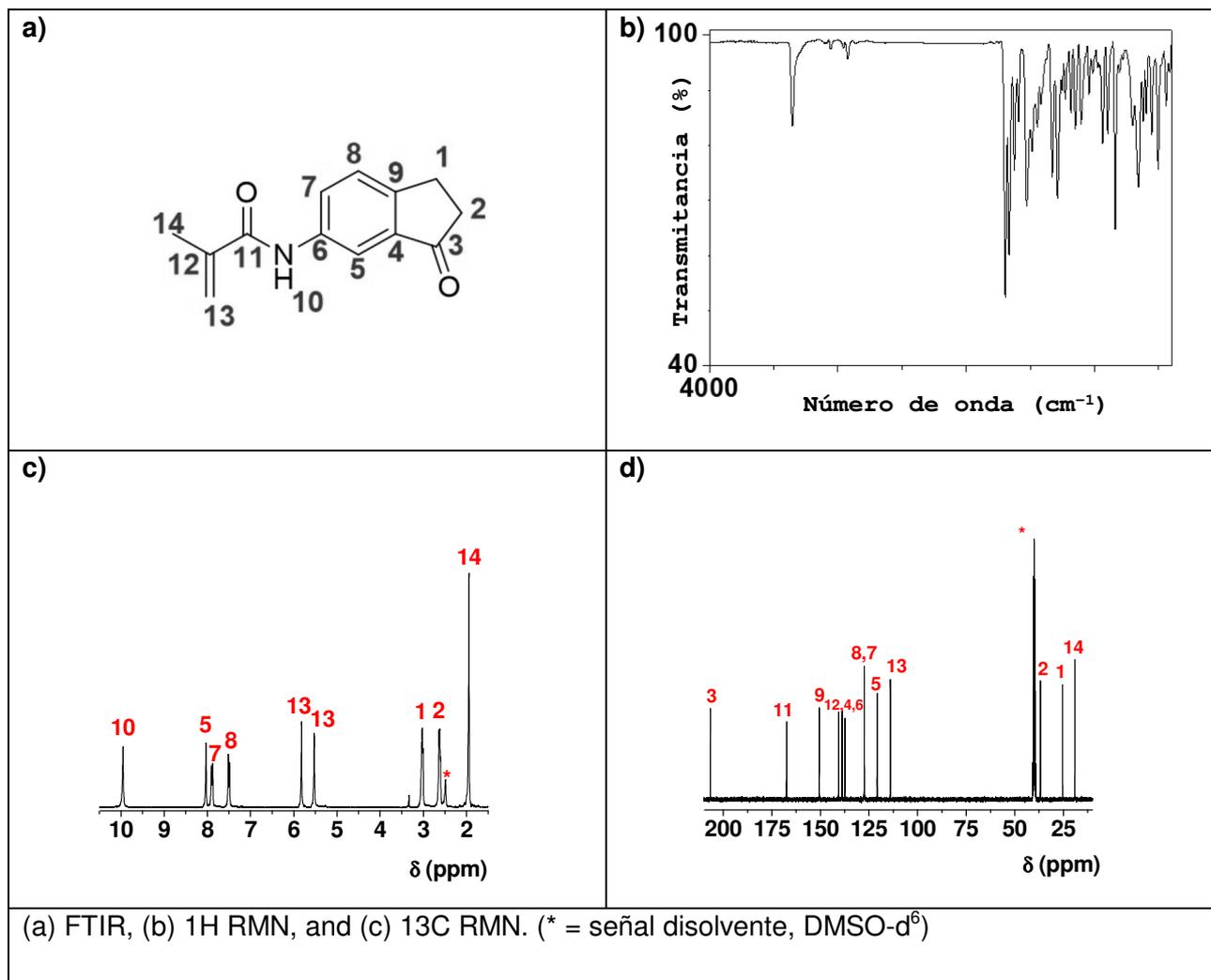


Figura 2

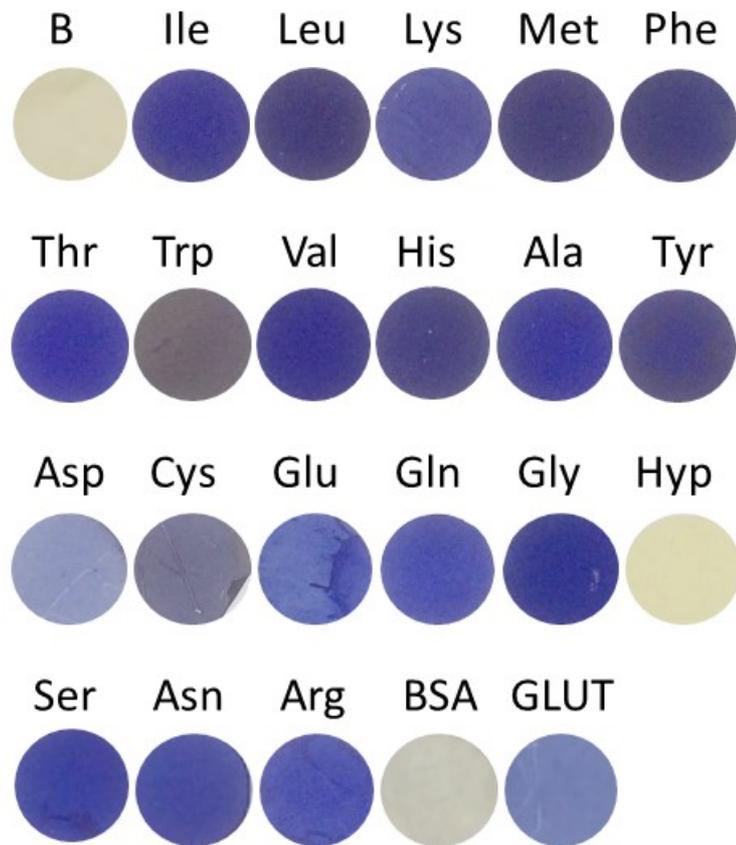


Figura 3

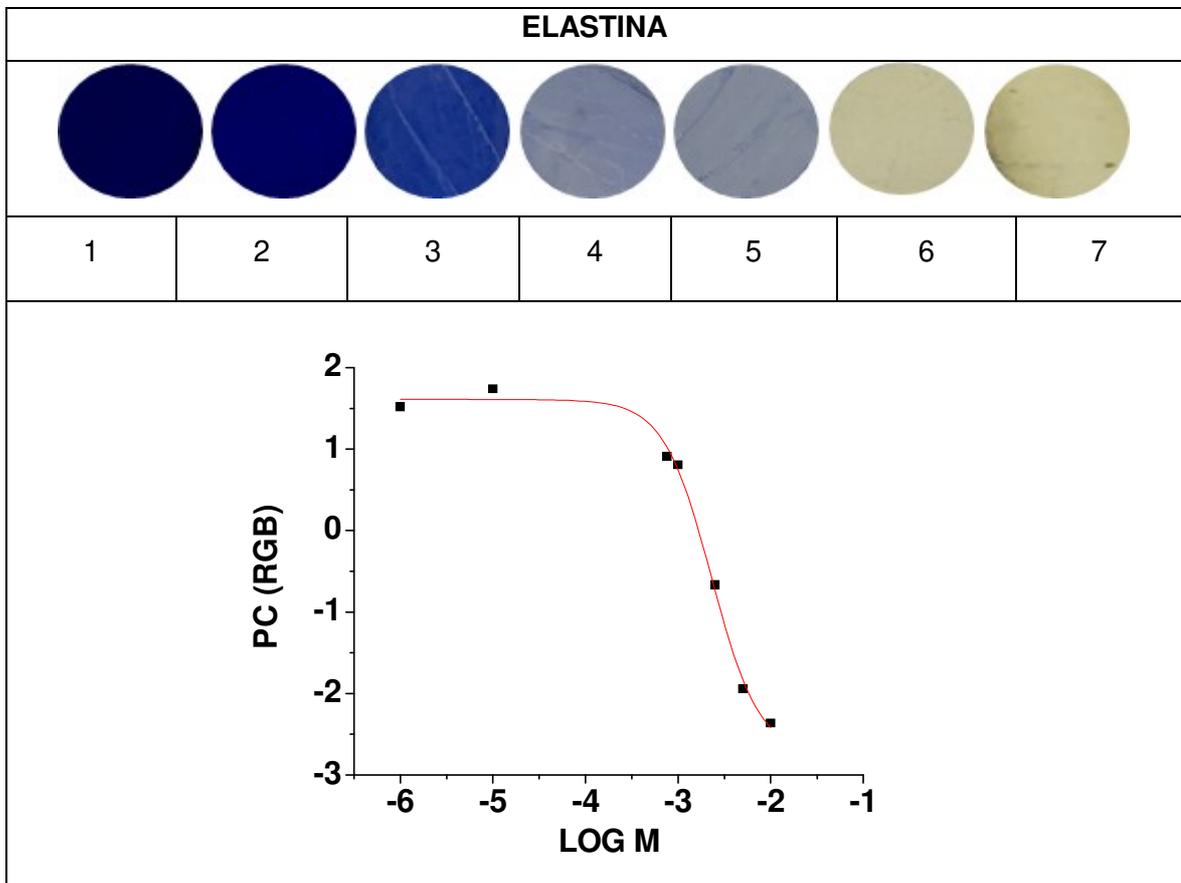


Figura 4

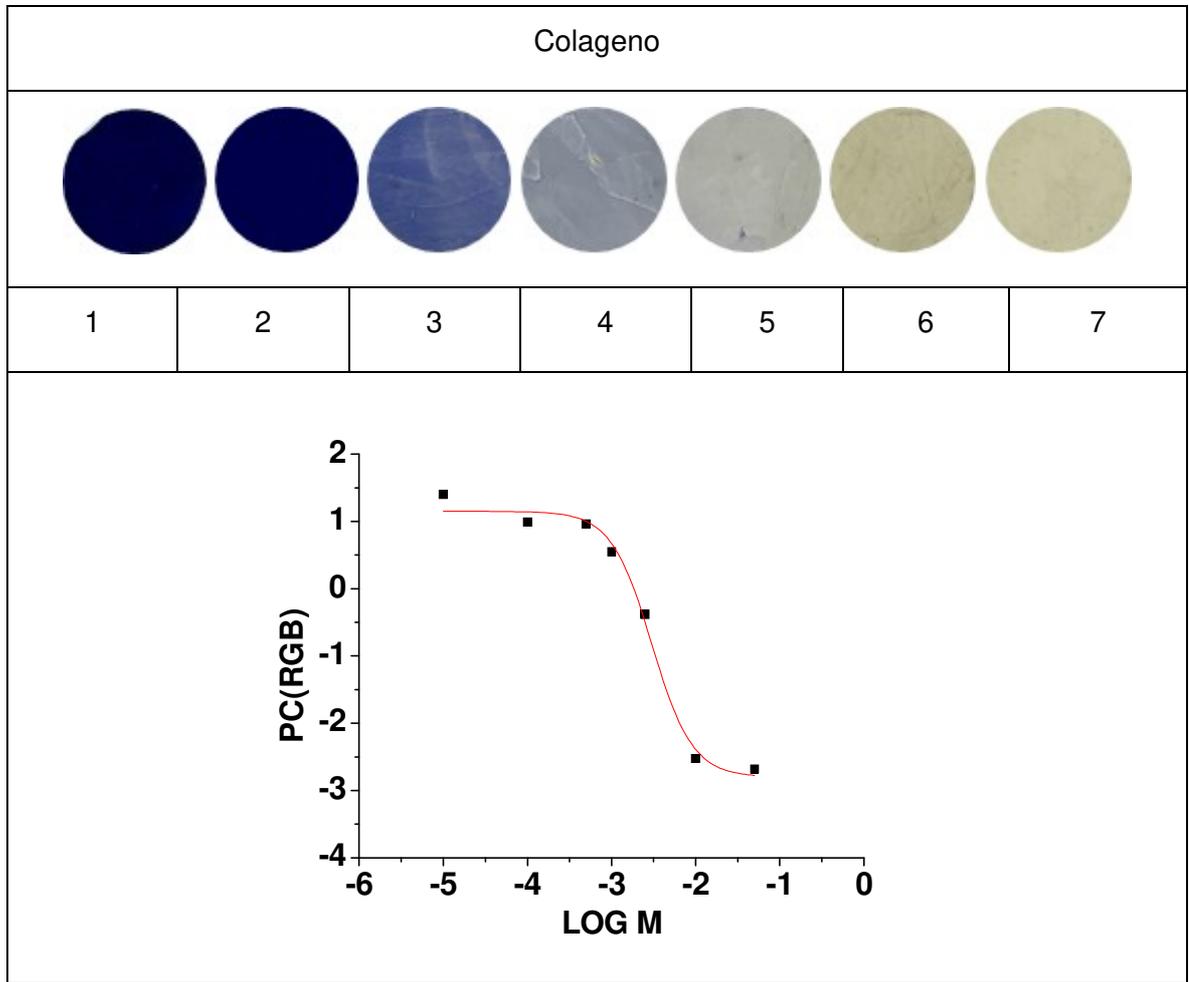


Figura 5

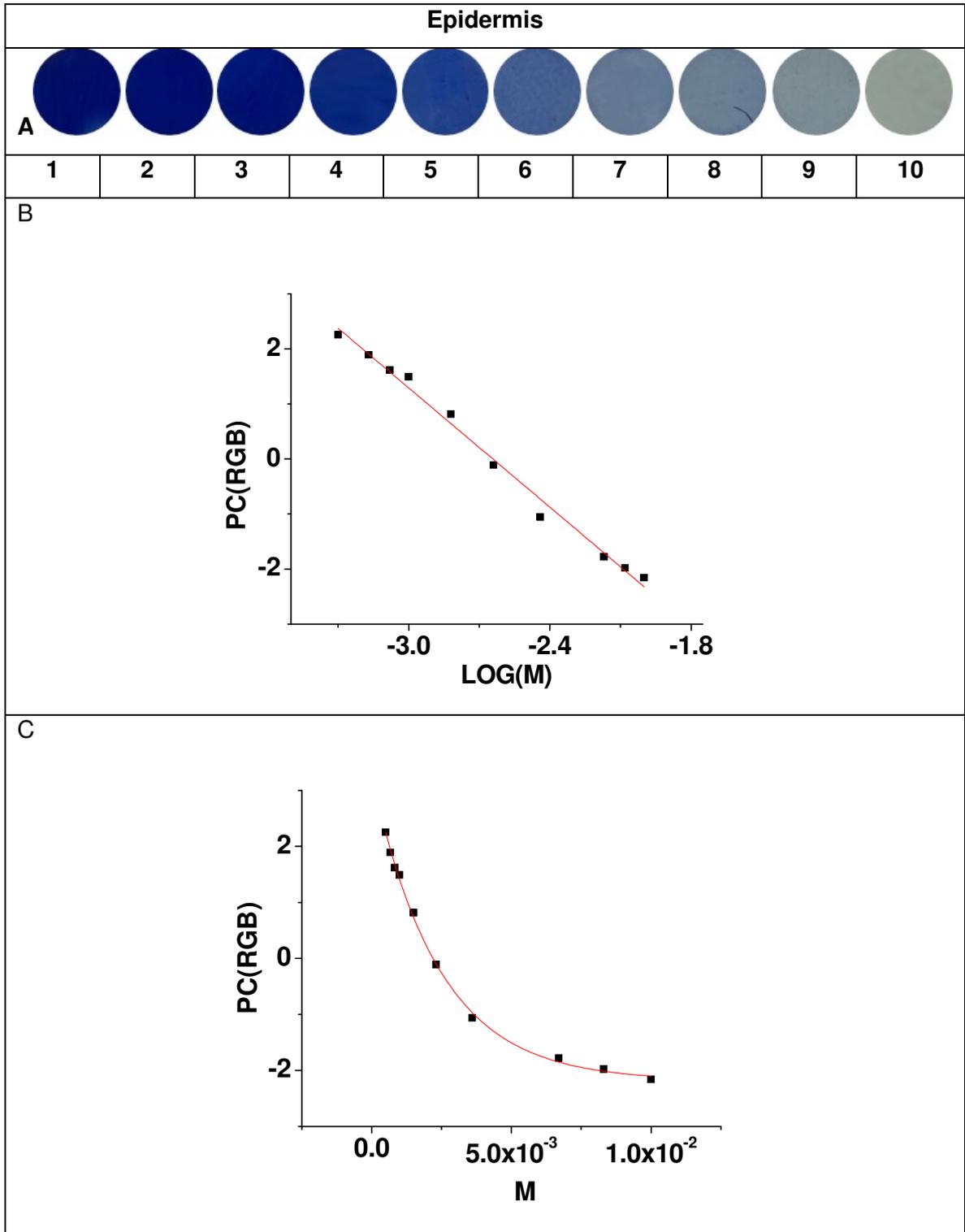


Figura 6

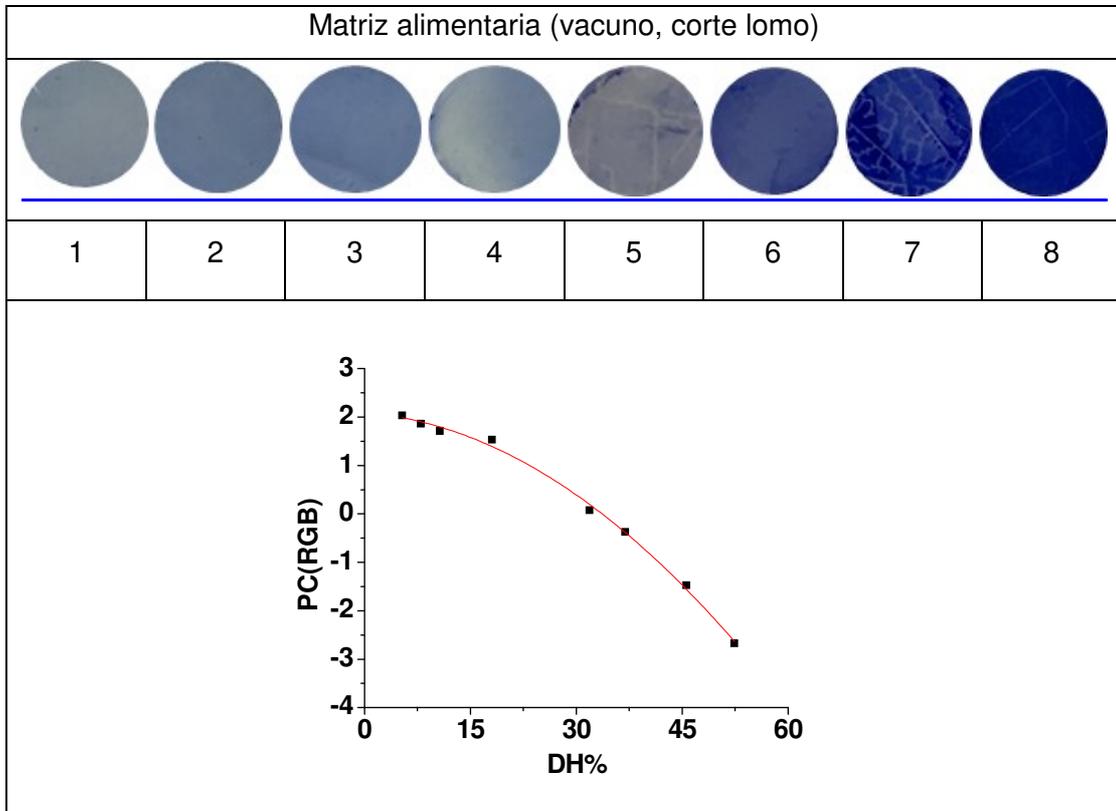


Figura 7

