

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 577**

51 Int. Cl.:

C08F 293/00 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2010 E 10795037 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2507278**

54 Título: **Preparación de polímeros con impronta molecular**

30 Prioridad:

01.12.2009 GB 0921025

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

27.01.2016

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LEICESTER (100.0%)
University Road
Leicester LE1 7RH, GB**

72 Inventor/es:

**PILETSKY. SERGEY, ANATOLIYOVICH;
GUERREIRO. ANTONIO, RICARDO, LEONARDO y
WHITCOMBE. MICHAEL, JAMES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 557 577 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de polímeros con impronta molecular

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la síntesis orgánica y de la química de polímeros, y en particular al área relacionada con la metodología para la preparación de moléculas orgánicas mediante síntesis dirigida por molde y polimerización por molde.

10

Antecedentes en la técnica

El término "síntesis dirigida por molde" incluye la formación de una nueva sustancia mediante modificación química de un sustrato, o mediante el acoplamiento de dos o más moléculas en presencia de un molde que sirve como patrón para la formación de una nueva estructura. El ejemplo más conocido de este proceso es la transcripción génica. Un ejemplo particular de síntesis dirigida por molde es la polimerización por molde, en la que se produce la formación de un receptor polimérico (réplica) en presencia de otro polímero o sustancia orgánica de bajo peso molecular (molde). Antes de iniciar la polimerización, y durante la polimerización, los monómeros se distribuyen espacialmente (proceso de auto-ensamblaje) en torno a las moléculas del molde según el tamaño, la polaridad y funcionalidad del molde. Los monómeros se polimerizan en cadenas lineales o redes tridimensionales rígidas. Un ejemplo específico de polimerización por molde es la impronta molecular, basada en la polimerización de monómeros vinílicos o acrílicos en presencia de un molde (véase referencia 1, 2). El enfoque tradicional supone la producción de polímeros con impronta muy reticulados, que son insolubles en disolventes acuosos y orgánicos. Debido a su insolubilidad inherente, se restringe la posibilidad de usar polímeros con impronta molecular (MIP) en farmacología y medicina.

Recientemente, se han acometido varios intentos para desarrollar protocolos para la preparación de polímeros con impronta con pesos moleculares relativamente bajos que pudieran existir en formas solubles o al menos coloidales. Este formato permitirá el uso de polímeros como moléculas biológicamente activas (fármacos, efectores, moduladores, inhibidores) en farmacología y medicina, en forma de "anticuerpos plásticos", sustituyendo moléculas biológicas en sensores y en la separación por afinidad y como catalizadores con propiedades de tipo enzimática.

En uno de esos ejemplos, se sintetizaron moléculas de MIP mediante policondensación de aminoácidos y nucleótidos en torno a un receptor biológico, enzima, ácido nucleico, célula, virus, microorganismo, muestra de tejido o fármaco (véase patente de Estados Unidos 6.852.818). En otro ejemplo, se usaron diferentes métodos para producir MIP poliméricos y oligoméricos (véase patente de Estados Unidos 6.127.154). La mayoría de los ejemplos de la técnica anterior describen la preparación de polímeros reticulados de alto peso molecular que requieren su hidrólisis para proporcionar partículas solubles o coloidales estables en solución. En uno de esos ejemplos (véase patente de Estados Unidos 6.127.154) los investigadores usaron compuestos diseñados específicamente que contienen grupos fotoactivos de perfluorofenilazido capaces de acoplarse después de iluminarlos. En este caso se podrían sintetizar ligandos de afinidad en forma de partículas solubles. En todos estos casos, los compuestos sintetizados comprenden una serie de fracciones con tamaños y propiedades mal controlados. Otros enfoques para la síntesis de moléculas con actividad biológica se describen en los documentos WO 96/40822 y en la patente de Estados Unidos 5.630.978, en los que se prepararon compuestos químicos en presencia de un polímero con impronta por molde, que a su vez se preparó en presencia de otro molde, normalmente un fármaco tal como heparina. La réplica resultante es una molécula ligando que no tiene afinidad por el molde y en lugar de eso se asemeja a la estructura de la propia molécula del fármaco original.

Una de las formas de producir nanopartículas es mediante el uso de condensación controlada o polimerización "viva" de radicales aditivos. Las técnicas de polimerización viva de radicales libres, tales como la polimerización con *iniferter*, polimerización radicalaria mediada por nitróxido, polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP) y polimerización por transferencia de cadena mediante adición-fragmentación reversible (RAFT), abren nuevas vías para la síntesis de polímeros con pesos moleculares bajos relativamente controlados (véanse referencias 3-9). Las técnicas de polimerización controlada/viva se basan en un equilibrio delicado entre las especies durmientes y activas que reduce eficazmente la concentración de unidades de propagación en el sistema y minimiza el grado de terminación. La polimerización viva podría estar libre de reacciones secundarias tales como terminación y transferencia de cadena, y así puede generar polímeros con distribuciones de pesos moleculares y estructuras bien definidas. Se puede aplicar el mismo enfoque a la formación de copolímeros, posibilitando así la producción de copolímeros en bloque mediante polimerización con radicales libres mediante la secuenciación correcta de las adiciones monoméricas. La polimerización viva se ha usado anteriormente en la producción de MIP injertados en bruto (véanse referencias 10, 11). También se produjeron polímeros solubles mediante polimerización viva y se usaron posteriormente en la producción de MIP (véase referencia 12). Recientemente se ha usado la polimerización viva controlada para la preparación de nanopartículas de MIP (13).

Una de las complicaciones en la síntesis de MIP es la necesidad frecuente de usar moldes que son caros y/o difíciles de obtener, tales como proteínas, ciertas toxinas, etc., que son difíciles de recuperar después de la

polimerización y limitan la cantidad de MIP que se pueden obtener. Idealmente, el molde se debe poder reciclar para superar estas limitaciones. La forma óptima de conseguir esto es mediante el uso del molde en forma inmovilizada. El molde inmovilizado se ha usado con anterioridad (véase patente de Estados Unidos 7.393.909). En este caso, el molde se inmovilizó sobre una superficie de sílice y se formó polímero en los poros en torno a él. Al disolver el soporte de sílice y retirar el molde, se obtienen MIP de diversas morfologías. En todos los ejemplos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.393.909, durante el proceso de disolución, se pierde la superficie que lleva el molde inmovilizado y no se puede reciclar. En otros ejemplos, se usaron moldes inmovilizados para la producción de superficies con impronta (patentes de Estados Unidos 6.127.154; Estados Unidos 6.458.599; Estados Unidos 7.288.415). Potencialmente, las superficies que llevan los moldes desveladas en estos documentos se pueden regenerar y usar varias veces más. Estos enfoques se pueden usar para la producción de sensores o matrices, pero sería difícil adaptarlos para la producción de nanopartículas o moléculas solubles pequeñas.

Otro problema importante adicional asociado a los MIP es la heterogeneidad de los sitios de unión producidos, que en general es responsable de los altos niveles de uniones no específicas. Este problema se ha rectificado mediante la separación por afinidad de nanopartículas de MIP producidas por separado en una columna con un molde inmovilizado (13). Es evidente que para que la separación por afinidad sea posible, los MIP deben estar en una forma adecuada, preferentemente en forma de nanopartículas.

La presente invención aborda todos estos problemas relativos al desarrollo de nanopartículas de MIP reticuladas de alto rendimiento al proponer la combinación de dos técnicas: (i) realizar una polimerización controlada, opcionalmente una polimerización radicalaria controlada, en presencia de una superficie o superficies que llevan un molde inmovilizado para formar nanopartículas con impronta y (ii) retener las nanopartículas mediante interacción por afinidad con el molde inmovilizado para su selección y purificación.

El material de los antecedentes se puede encontrar en las siguientes referencias.

1. Wulff, G. Makromol. Chem. Macromol. Symp., 1993, 70/71, 285.
2. Vlatakis, G.; et al. Nature, 1993, 361, 645.
3. Moad, G.; Rizzardo E.; Solomon, D.H. Macromolecules 1982, 15, 909;
4. Matyjaszewski, K.; Xia, J. Chem. Rev. 2001, 101, 2921.
5. Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. Chem. Rev. 2001, 101, 3689.
6. Hawker, C. J.; Bosman, A. W.; Harth, E. Chem. Rev. 2001, 101, 3661.
7. Fischer, H. Chem. Rev. 2001, 101, 3581.
8. Otsu, T.; Matsumoto, A. Adv. Polym. Sci. 1998, 136, 75-137.
9. Moad, G.; et al. Polym. Int. 2000, 49, 993-1001.
10. Ruckert, B.; Hall, A. J.; Sellergren B. J. Mater. Sci. 2002, 12, 2275.
11. Hattori, K.; et al. J. Membr. Sci. 2004, 233, 169.
12. Li, Z.; Day, M.; Ding, J. F.; Faid, K. Macromolecules. 2005, 38, 2620.
13. Guerreiro A. R., Chianella I., Piletska E., Whitcombe M. J., Piletsky S. A. (2009). Biosens. Bioelectron., 24, 2740-2743.
14. Jagur-Grodzinski, J. Reactive & Functional Polymers. 2001, 1, 1.
15. Shim, S.E. et al. Macromolecules. 2003, 36, 7994-8000.
16. Yu, Q.; Zeng, F.; Zhu S. Macromolecules. 2005, 34, 1612.
17. Patente de Estados Unidos 7.019.072 - Method of preparing latex for coating paper, 2006.

Patentes citadas

N.º de patente	Territorio	Fecha de expedición	Título
US6.852.818	US	08-Feb-2005	MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS PRODUCED BY TEMPLATE POLYMERIZATION
US6.127.154	US	03-Oct-2000	METHODS FOR DIRECT SYNTHESIS OF COMPOUNDS HAVING COMPLEMENTARY STRUCTURE TO A DESIRED MOLECULAR ENTITY AND USE THEREOF
WO96/40822	PCT	19-Dic-1996	PREPARATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES BY MOLECULAR IMPRINTING
US5.630.978	US	20-May-1997	PREPARATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES BY MOLECULAR IMPRINTING
US7.393.909	US	01-Jul-2008	POROUS, MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AND A PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF
US6.458.599	US	01-Oct-2002	COMPOSITIONS AND METHODS FOR CAPTURING ISOLATING DETECTING ANALYZING AND QUANTIFYING MACROMOLECULES

US7.288.415	US	30-Oct-2007	COMPOSITIONS AND METHODS FOR CAPTURING ISOLATING DETECTING ANALYZING AND QUANTIFYING MACROMOLECULES
-------------	----	-------------	---

Divulgación de la invención

5 De acuerdo con la presente invención se proporciona un proceso para la preparación de un polímero con impronta molecular ("MIP") en forma de solución o suspensión coloidal de partículas de MIP, que comprende las etapas de: (a) suministro de una sustancia de soporte que tiene un material molde inmovilizado sobre la misma para que quede expuesto a una superficie; (b) suministro de una composición polimerizable en contacto con dicha superficie; (c) realización de una polimerización controlada de dicha composición polimerizable en contacto con dicha superficie, dicha polimerización que se termina cuando se hayan conformado partículas de MIP capaces de formar una solución o suspensión coloidal; y (d) separación de dichas partículas de MIP de dicha superficie. La suspensión coloidal de forma deseable es estable. De forma deseable consta de partículas finas, por debajo de 1 µm.

15 La presente invención supone la aplicación de una polimerización controlada, opcionalmente una polimerización radicalaria controlada, realizada en presencia de un molde inmovilizado (convexo) para la producción de partículas de MIP reticuladas solubles o coloidales.

Las realizaciones preferidas de la invención pueden proporcionar uno o más de los siguientes beneficios:

- 20 1. Las nanopartículas de MIP se pueden sintetizar usando un protocolo automático (a máquina).
2. Los MIP sintetizados no contienen molde, que permanece unido a la superficie sólida.
3. Es posible usar cualquier disolvente durante la preparación de MIP.
4. El proceso de síntesis, separación y purificación de MIP es muy rápido (de minutos a unas pocas horas).
5. El molde no se desperdicia y el proceso de síntesis de MIP se puede repetir varias veces (lo que reduce el coste de preparación de MIP para moldes caros).
- 25 6. Existe la posibilidad de añadir etapas adicionales cuando las partículas sintetizadas que aún se encuentran sobre el molde inmovilizado se deban funcionalizar adicionalmente, por ejemplo, con la adición de un marcador fluorescente, o un revestimiento no adhesivo.
7. Existe la posibilidad de controlar el tamaño de las partículas sintetizadas.
8. Existe la posibilidad de fraccionar las nanopartículas sintetizadas y recoger las fracciones con diferentes afinidades.
- 30

35 En el método descrito en el presente documento, los MIP se producen en presencia de un molde inmovilizado usando técnicas de polimerización controlada, opcionalmente polimerización radicalaria controlada. Los especialistas familiarizados con la materia conocen diversas técnicas útiles para la producción de nanopartículas mediante polimerización controlada. La reacción de polimerización se termina cuando se alcanza la fase en la que el tamaño de las moléculas es relativamente pequeño. El producto de dicho proceso puede existir en forma soluble o coloidal estable en solución o en suspensión. Las suspensiones o soluciones coloidales de MIP de acuerdo con esta invención pueden ser en líquidos acuosos u orgánicos.

40 Las moléculas sintetizadas tienen una estructura complementaria a la del molde original y tienen la capacidad de unirse con una afinidad razonablemente elevada. Con el fin de clarificar, en la presente invención MIP de "alta afinidad" y "alto rendimiento" se definen como aquellos polímeros con una afinidad que supera la afinidad de los polímeros blancos correspondientes habituales en al menos tres, preferentemente al menos cinco veces, la designación de polímero "blanco" que se refiere al producto del proceso de polimerización usado para formar el MIP, realizado en ausencia del molde. Estas moléculas de síntesis (polímeros y oligómeros) tienen afinidades y especificidades predeterminadas, una actividad superior a polímeros sintetizados aleatoriamente y se pueden preparar mucho más fácilmente que las estructuras orgánicas discretas diseñadas específicamente. El proceso de polimerización para formar MIP, como se describe en el presente documento, puede ser imperfecto y dar lugar a la formación tanto de partículas de alta afinidad como de baja afinidad (formadas, por ejemplo, en solución en la que el molde no está presente). Las partículas de alta afinidad se pueden unir selectivamente (y recuperarse posteriormente) a superficies con el molde inmovilizado, permitiendo que se separen de las partículas de baja afinidad. Las superficies con el molde inmovilizado pueden ser las mismas superficies que las que se usan en la formación de los MIP o pueden ser superficies distintas (por ejemplo, contenidas dentro de una columna aparte) con molde inmovilizado. Las superficies mencionadas en el presente documento pueden ser superficies de columnas de afinidad, dispositivos sensores, dispositivos microfluidos, microchips, reactores, cuentas, fibras, pocillos, microplacas, membranas, filtros, colectores, nanoestructuras, vesículas, cápsulas, etc. La superficie puede ser sólida, semi-sólida o líquida o fluida (como en el caso de micelas o interfases). Opcionalmente, las partículas se pueden seleccionar adicionalmente usando una columna o columnas adicionales, para seleccionar una subfracción de las partículas que no posean afinidad por un posible compuesto interferente. Se puede emplear un enfoque similar para seleccionar (una) subfracción(es) de partículas que además tengan afinidad por uno o más análogos del molde para producir aglutinantes "selectivos de clase".

60

Las moléculas sintetizadas como se describe en esta invención (dímeros, oligómeros, polímeros, y sus mezclas) se pueden usar como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptor en química analítica (sensores, ensayos), para su separación en las industrias de biotecnología, farmacéuticas y alimentarias y como catalizadores en síntesis o como sustitutos para enzimas en ensayos, sensores y otras aplicaciones tales como polvos de lavado. Los esfuerzos previos en el diseño de fármacos normalmente se han basado en la investigación tediosa de relaciones de estructuración-actividad de un gran número de estructuras químicas. La presente invención describe un método más simple y más directo –polimerización controlada, opcionalmente polimerización radicalaria controlada, para la formación de nanopartículas de MIP reticuladas en presencia de un molde inmovilizado para diseñar una sustancia biológicamente activa, que debe tener un gran beneficio (en comparación con los métodos de diseño y descubrimiento de fármacos tradicionales) así como ligandos útiles para la separación por afinidad, sensores y catálisis.

Aspectos importantes de la invención incluyen:

- (1). Síntesis de nanopartículas de MIP reticuladas mediante polimerización controlada, opcionalmente polimerización radicalaria controlada, en presencia de un molde inmovilizado que puede ser un receptor biológico, un ácido nucleico, una célula, espora, virus, microorganismo, muestra de tejido, carbohidrato, oligosacárido, polisacárido, péptido, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, proteína sintética, glicoproteína, glucosaminoglicano, esteroide, inmunosupresor, hormona, heparina, antibiótico, vitamina, biomarcador de un estado patológico o una enfermedad, toxina, pesticida, herbicida, explosivo, agente nervioso, contaminante, compuesto de alteración endocrina, nucleótido, nucleósido, oligonucleótido, metabolito, metabolito secundario, metabolito farmacológico, fármaco o intermedio de fármaco. No se pretende que esta lista sea limitante sino más bien representativa de ciertas posibles clases de molde, cuya extensión completa entenderán los expertos en la materia.
- (2). Optimización de las condiciones de reacción para generar partículas con un tamaño relativamente pequeño.
- (3). Síntesis de moléculas, incluyendo moléculas biológicamente activas, a partir de monómeros funcionales, que pueden incluir uno o más de: monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, cloroacrilatos, itaconatos, trifluorometilacrilatos, derivados de aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, y carbohidratos.
- (4). Retención de las partículas de alta afinidad sintetizadas mediante interacciones de afinidad que tienen lugar sobre la misma superficie con el molde inmovilizado usado para la preparación de MIP o sobre superficies diferentes, que también contienen el molde inmovilizado o un análogo del molde.
- (5). Polimerización secuencial cuando las partículas poliméricas con impronta retenidas sobre la superficie con el molde inmovilizado se modifican con otros tipos de moléculas para variar las propiedades o funciones de las moléculas sintetizadas.
- (6). La aplicación de las moléculas sintetizadas como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptor en química analítica (sensores, ensayos), para la separación en las industrias de biotecnología, farmacéuticas y alimentarias o como catalizadores.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un cromatograma de partículas blancas (control) inyectadas sobre una columna de HPLC empacitada con partículas revestidas con molde inmovilizado.

La Figura 2 representa un cromatograma de partículas de MIP inyectadas sobre una columna de HPLC empacitada con partículas revestidas con molde inmovilizado.

La Figura 3 representa la distribución de tamaños de nanopartículas de MIP por impronta con melamina.

Descripción detallada

Los polímeros preparados como se describe en la presente invención se asemejan a efectores (activador, inhibidor o sustrato) del molde, y como tales pueden tener actividad biológica si el molde está involucrado en un proceso fisiológico o un análogo efectivo de dicha molécula o estructura. Dichos polímeros se pueden usar, por ejemplo, como fármacos en farmacología y medicina. Los beneficios derivados de este enfoque son numerosos, e incluyen la posibilidad de reutilizar el molde inmovilizado para la síntesis de MIP, la posibilidad de fraccionar los MIP con partículas de alta afinidad a partir de partículas de baja afinidad y monómeros sin reaccionar, la extracción sencilla de los MIP sintetizados a partir del molde, la capacidad de funcionalizar posteriormente los MIP unidos al molde inmovilizado, la capacidad de automatizar completa o parcialmente el proceso de fabricación, etc. Otros beneficios de la invención serán evidentes para los expertos en la materia.

Específicamente, en un aspecto la presente invención se refiere a la síntesis de MIP reticulados mediante polimerización controlada, opcionalmente polimerización radicalaria viva controlada (LRP); o polimerización aniónica viva; polimerización catiónica viva; y policondensación controlada en presencia de un molde inmovilizado que puede ser un receptor biológico, un ácido nucleico, una célula, espora, virus, microorganismo, muestra de tejido, carbohidrato, oligosacárido, polisacárido, péptido, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, proteína sintética, glicoproteína, glucosaminoglicano, esteroide, hormona, inmunosupresor, heparina, antibiótico, vitamina, biomarcador de un estado patológico o una enfermedad, toxina, pesticida, herbicida, explosivo, agente nervioso, contaminante,

compuesto de alteración endocrina, nucleótido, nucleósido, oligonucleótido, metabolito, metabolito secundario, metabolito farmacológico, fármaco o intermedio de fármaco u otra clase de molde conocido por los expertos en la materia. El molde se puede inmovilizar sobre superficies poliméricas, de polisacárido o de vidrio, por ejemplo en forma de cuentas, guía de onda, fibras, membranas, o capilares o cualquier otra superficie adecuada para una aplicación prevista, como saben los expertos en la materia.

La polimerización se puede iniciar, por ejemplo, mediante calentamiento, aplicación de corriente (electropolimerización) mediante la adición de catalizador(es) redox, persulfato o peróxidos, mediante irradiación, que incluye radiación gamma y radiación de microondas o preferentemente mediante irradiación con luz UV o visible y que normalmente requiere minutos u horas dependiendo de la reactividad de las especies.

La presente invención cubre varias formas diferentes de polimerización controlada. Todas ellas se basan en la capacidad para controlar la reacción de adición o de condensación a un nivel tal que predominantemente se formen nanopartículas solubles en lugar de capas o redes poliméricas continuas. En el ejemplo de iniciadores de la polimerización por radicales libres, las moléculas se someten a transformaciones reversibles mediante estímulos térmicos, químicos, o fotoquímicos, transformando reversiblemente las especies durmientes en radicales libres o iones reactivos que pueden actuar como propagadores de la cadena. Para que se aplique esta condición, las constantes de equilibrio de las reacciones deben favorecer la formación de las especies durmientes y deben permitir un intercambio rápido entre las especies durmientes y de propagación. Así, las concentraciones de las especies de propagación serán muy bajas y su tiempo de residencia será muy corto, lo que reduce la probabilidad de reacciones secundarias que den lugar a la terminación de la cadena polimérica en crecimiento. Algunos ejemplos de polimerización viva incluyen, pero en ningún modo están limitados a: polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATPR) y polimerización por transferencia de cadena mediante adición-fragmentación reversible (RAFT). La polimerización RAFT se basa en un equilibrio de transferencia de cadena mediante adición-fragmentación reversible en el que existe un intercambio entre las especies activas y durmientes. Los radicales generados en la etapa de iniciación se propagarán mediante la adición de monómeros hasta que se encuentre una molécula, capaz de actuar como agente de transferencia de cadena, y a la cual se pueden añadir de forma reversible. En general, el proceso de polimerización viva permite el uso de *iniferter* (iniciador, agente de transferencia, terminador), que opcionalmente se pueden preparar junto con iniciadores convencionales para conferir una naturaleza viva a la polimerización. Los *iniferter* pueden ser foto-*iniferter* que llevan un grupo ditiocarbamilo o grupos carbono-carbono o azo que llevan *iniferter* térmicos (véase, por ejemplo, referencia 14) u otros tipos de compuestos conocidos por los expertos en la materia. El tipo de *iniferter* preferidos son aquellos que proporcionan diferentes radicales, un radical carbonado que es reactivo y otro radical menos reactivo, por ejemplo, un radical de ditiocarbamilo. El radical carbonado, que normalmente es un radical bencílico, puede reaccionar con un monómero insaturado para iniciar la polimerización. El radical menos reactivo, por ejemplo, radical ditiocarbamilo, puede terminar la polimerización al recombinarse con una cadena polimérica en crecimiento, aunque el producto de terminación se puede disociar adicionalmente en un nuevo radical de propagación y un terminador en respuesta a la aplicación continuada del estímulo, por ejemplo, irradiación UV (véase, por ejemplo, referencia 15).

Otros compuestos que se pueden usar como iniciadores para diferentes tipos de polimerización viva (transferencia atómica, aniónica, catiónica, etc.), cubiertos por el ámbito de la presente invención incluyen, pero no están limitados a: 2-bromopropionitrilo con Cu(I)Br complejoado con N,N,N',N'',N''-pentametildietilentriamina, macroiniciador de bromo poliestireno con Cu(I)Cl/PMDETA; 2-bromoisobutirato de etilo con CuCl/bipiridina; dibromuro de 1,4-bis(2,6-diisopropilfenil)acenaftendiimino níquel (II); 2,2-dimetoxi-2-fenilacefenona en combinación con disulfuro de tetraetiltiouram; tetrafenil bifosfina; peróxidos terciarios tales como peróxido de di-ter-butilo; SmMe(C₅Me₅)₂(THF); epóxidos a base de estireno junto con TiCl₄; tetramero disódico de metilostireno; MoOCl₄-n-BuSn-EtOH; HCl/ZnCl₂; p-toluensulfonato de metilo; 2,10,15,20-tetrafenilporfinato de metilaluminio; 3-metil-1,1-difenilpentil litio; butil litio en THF; compuestos de alquilidino molibdeno; organolantánidos (III) bifuncionales; Mo(CH-t-Bu)(NAr)(OCMe₃)₂ y Mo(CHCPhMe₂)(NAr)(OCMe(CF₃)₂)₂; Hf/I₂; complejos de Zr, Ti y Hf combinados con metilaluminóxano o boratos de fenilo; complejos de diimida de Pd, Ni, Fe o Co; complejos homogéneos de carbeno de Ta, Ti, Mo, W; complejos metálicos de las tierras raras compuestos de complejos de tipo metaloceno o de tipo no metaloceno; complejos de acetamidato catiónico de monociclopentadienil circonio; telómeros fluorados esterificados con uno o dos grupos hidroxilo como iniciadores para la polimerización viva mediada por cobre; Yb[C(SiMe₃)₃]₂.

Una ventaja de la polimerización viva en contraste con la polimerización radicalaria tradicional es que la primera se produce a una baja velocidad y sin autoaceleración observable, mientras que esta última con frecuencia se produce con una fuerte autoaceleración (véase, por ejemplo, referencia 16). La presente invención se aprovecha de esto realizando una polimerización viva en condiciones que favorecen la formación de polímeros con un peso molecular relativamente bajo. Normalmente, la reacción se detiene en una fase temprana para producir polímeros con pesos moleculares de entre 500 y 1.000.000 Da.

Se pueden optimizar las condiciones de la reacción para generar partículas con un tamaño relativamente pequeño. Una parte importante del proceso es la selección de un iniciador vivo apropiado y la optimización de las condiciones de la reacción de polimerización. Como alternativa, la velocidad de formación y propagación de los radicales se puede controlar mediante la adición de inhibidores de la reacción o de agentes de transferencia de cadena tales como derivados mercapto (17).

Los iniciadores de la polimerización radicalaria viva se pueden preparar a partir de moléculas orgánicas discretas o a partir de macromoléculas. La mayoría de compuestos que contienen un grupo hidroxilo, carboxílico o amino se pueden convertir en iniciador, y así se pueden incorporar fácilmente al polímero. Esto se puede realizar en el extremo terminal del polímero en el caso de un iniciador monofuncional, o en el medio del polímero en el caso de un iniciador multifuncional.

Las condiciones de reacción que favorecen la formación de polímeros de peso molecular relativamente bajo incluyen, pero no están limitadas a: (i) el uso de una relación estequiométrica entre el iniciador y los monómeros; (ii) el enfriamiento de la reacción o la extracción de la fuente de luz UV u otra fuente de radiación, que detendrá la formación de nuevas especies de propagación en una fase temprana de la reacción; (iii) la extracción de los monómeros en contacto con la cadena polimérica en crecimiento, por ejemplo, mediante filtración o cromatografía; (iv) la adición de inhibidores a la reacción; (v) la realización de la polimerización en una solución muy diluida; (vi) la adición de agentes de transferencia de cadena. La opción preferible sería la eliminación de la fuente de radiación o su interrupción. Como alternativa, los monómeros y otros reactivos se pueden extraer de los MIP en crecimiento unidos al molde inmovilizado mediante elución. Como consecuencia de la polimerización viva controlada, se pueden formar partículas de MIP dentro de un intervalo de tamaños de 500-1.000.000 Da, que pueden existir en forma soluble o como partículas más grandes (pero por debajo de 1 μm) que pueden existir en forma de coloides finos que son estables en solución y compatibles con las condiciones de la cromatografía de afinidad.

Los monómeros que se pueden usar para la preparación de MIP, incluyen: monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, cloroacrilatos, itaconatos, trifluorometilacrilatos, derivados de aminoácidos (por ejemplo, ésteres o amidas), nucleósidos, nucleótidos, y carbohidratos. En otro aspecto de la invención propuesta, la polimerización se realiza en presencia de o sobre la superficie de partículas que contienen dobles enlaces. Se usan monómeros de reticulación para fijar o estabilizar la estructura de la molécula réplica resultante, de manera que permanezca complementaria a la del molde. Ejemplos típicos de agentes de reticulación adecuados para los MIP incluyen, pero no está limitado a, dimetacrilato de etilenglicol, trimetacrilato de trimetilolpropano, divinilbenceno, metilénbisacrilamida, etilénbisacrilamida y N,N'-bisacriloilpiperazina. La función de los agentes de reticulación se puede realizar mediante partículas o polímeros precursores que contengan dobles enlaces, o partículas o polímeros con varias funciones unidas que se pueden unir a monómeros funcionales. Los expertos en la materia pueden seleccionar monómeros y agentes de reticulación adecuados para un sistema particular. Como alternativa, para ayudar en esta selección se pueden usar diferentes métodos combinatorios y computacionales.

Las nanopartículas sintetizadas tienen una mayor afinidad por el molde inmovilizado que los monómeros, oligómeros no específicos y polímeros de baja afinidad (por ejemplo, los formados en el volumen en bruto en ausencia de molde). Así, en un aspecto de la invención propuesta el material unido débilmente se extrae de las nanopartículas unidas al molde inmovilizado mediante lavado. La separación de nanopartículas de alta afinidad del molde inmovilizado se consigue mediante calentamiento, que interrumpe la formación de complejo, mediante la modificación del pH de la solución, mediante la modificación de la concentración iónica, y mediante la adición de urea, guanidina, o una sustancia que interactúe con el molde con más fuerza de lo que lo hacen los MIP.

Las nanopartículas de MIP sintetizadas por afinidad se pueden purificar adicionalmente mediante cromatografía, filtración y/o electroforesis. La separación del polímero sintetizado se puede conseguir mediante cromatografía de afinidad, o elución selectiva, cuando se usa el mismo molde inmovilizado o uno similar para la purificación de la fracción polimérica con la afinidad más alta por el molde, y/o mediante cromatografía de permeación de gel que separa las fracciones poliméricas con diferentes tamaños. El fraccionamiento, separación y purificación se pueden conseguir usando tampones con diferentes pH, concentraciones iónicas, o mediante la adición de urea, guanidina, o sustancias que interaccionen con el molde con más fuerza de lo que lo hace el polímero. Como alternativa, el fraccionamiento de las partículas con una alta afinidad se puede conseguir mediante filtración, electroforesis, separación cromatográfica, lavado, centrifugación o diálisis. La cromatografía de afinidad es una herramienta particularmente útil, y se prefiere en especial, debido a que permite la preparación de MIP con una distribución estrecha de afinidades por el molde.

Las cadenas poliméricas en crecimiento se pueden modificar con otro polímero o grupo funcional con la intención de introducir una propiedad específica a los MIP, lo que facilitaría su extracción u otra forma de separación. Un ejemplo de esto de nuevo puede ser un polímero con una cola hidrófila que permitiría, por ejemplo, la extracción del polímero en solución acuosa mediante un disolvente orgánico. Sería posible introducir un grupo de unión específico, por ejemplo, biotina, lo que permitiría la extracción selectiva del polímero mediante un adsorbente de afinidad. Los expertos en la materia estarán familiarizados con la riqueza de protocolos experimentales que permiten llevar a cabo esta modificación y su separación correspondiente. La modificación se puede conseguir directamente sobre la superficie mientras el polímero se encuentra unido al molde inmovilizado o por separado.

Así, la presente invención puede emplear polimerización secuencial, cuando el polímero con impronta se modifica con otros tipos de moléculas para modificar las propiedades o funciones de las moléculas sintetizadas. Ya se ha mencionado que la cadena polimérica en crecimiento se puede modificar con otro polímero o grupo funcional para facilitar su separación. Una propiedad importante de la polimerización viva es la capacidad de detener una reacción

y proseguir con ella posteriormente simplemente deteniendo, por ejemplo, la irradiación con luz UV de la mezcla de reacción. El extremo de la cadena polimérica en crecimiento contiene un iniciador que se puede volver a activar para iniciar una nueva ronda de polimerización. Así, la cadena polimérica en crecimiento se podría exponer a otro monómero y se podría proseguir con la polimerización, dando lugar a la formación de copolímeros en bloque. El nuevo monómero podría introducir una nueva función en el polímero. Así, además de afinidad por el primer molde, suministrado por el primer MIP, se podría producir un polímero extendido con afinidad por un segundo molde introducido en el sistema. El polímero en bloque extendido podría tener marcadores fluorescentes unidos a los grupos terminales que serían útiles en el diagnóstico. También son posibles otros tipos de modificación, para introducir otras funciones tales como la capacidad de generar especies activas con propiedades biocidas, grupos catalíticos, marcadores isotópicos, grupos útiles para inmovilización, para sensores y para obtención de imágenes (por ejemplo, agentes de contraste), etc. Estas funciones también se podrían introducir en el polímero mediante el uso del iniciador funcionalizado correspondiente. La modificación se puede conseguir directamente sobre la superficie mientras la partícula se encuentra unida al molde inmovilizado o por separado.

En un aspecto, la presente invención se refiere a aplicaciones de las moléculas sintetizadas como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptores en química analítica (sensores, ensayos), para separaciones en las industrias de biotecnología, farmacéuticas y alimentarias y como catalizadores. La naturaleza soluble de los polímeros sintetizados los convierte en candidatos ideales para su uso como fármacos. La unión selectiva a una enzima, receptor u otra molécula biológica se podría usar para modificar las funciones biológicas de estas moléculas. Así, los MIP sintetizados mediante polimerización viva se podrían usar *in vivo* para la formulación de procesos biológicos. Cuando se encuentran unidos a isótopos o marcadores fluorescentes, los MIP se pueden usar como agentes de contraste selectivos o en otras formas de diagnóstico. Los MIP integrados con ligandos que se pueden producir en ciertas condiciones, por ejemplo, oxígeno molecular singlete, se podrían usar como agentes biocidas selectivos. Los expertos en la materia pueden proponer varias modificaciones diferentes para introducir propiedades antibióticas en los MIP preparados mediante polimerización viva.

Los MIP sintetizados se podrían usar como sustitutos de anticuerpos o receptores naturales en diferentes formas de ensayos y sensores. Diversas características de los MIP preparados mediante polimerización viva los hacen objetos particularmente atractivos para su aplicación en sensores. Así, las moléculas de MIP sintetizadas aún contienen iniciador que se puede usar para unir covalentemente polímeros a las superficies sólidas. Por tanto, la simple irradiación de luz UV podría ser suficiente para unir MIP a superficies cubiertas con dobles enlaces.

La capacidad de usar cromatografía de afinidad para separar los ligandos de MIP en diversas fracciones con afinidades diferentes podría ser ventajosa para la preparación de sensores/ensayos con intervalos de detección variables. Para ciertas aplicaciones, también se podrían usar polímeros blancos preparados mediante polimerización viva en ausencia de molde. No obstante, sería necesario preparar dichos polímeros usando monómeros que posean cierta afinidad u otras propiedades necesarias para esta aplicación particular. Los expertos en la materia saben cómo seleccionar esos monómeros usando, por ejemplo, estrategias computacionales o combinatorias. Es necesario aclarar que el uso tanto de MIP como de polímeros blancos preparados de la forma descrita en las realizaciones correspondientes está cubierto por el ámbito de la presente invención.

Ahora se describirá en detalle la presente invención en particular con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de partículas de MIP con afinidad por la melamina

Una mezcla de 1,17 g de acetonitrilo, 0,32 g de ácido metacrílico, 0,36 g de trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM), 0,36 g de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), 0,087 g de éster bencílico del ácido dietilditiocarbámico (iniciador vivo) y 0,02 g de tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol (agente de transferencia de cadena) se purgó con nitrógeno y se polimerizó bajo radiación de luz UV (fuente de luz UV UVAPRINT 100 CVI con una intensidad de 0,163 W/cm², Dr. Hönle) durante 3 min en el interior de una columna de vidrio (70 × 4 mm) empaquetada con cuentas de vidrio (9-13 μm de diámetro) derivatizadas con melamina. Las partículas de blanco (control) se sintetizaron de la misma manera pero la columna estaba empaquetada con cuentas de vidrio desnudas del mismo tamaño. Después de la polimerización la columna se lavó con 1 ml de acetonitrilo para eluir las nanopartículas y los monómeros sin reaccionar. Las nanopartículas con impronta solubles resultantes tenían un diámetro medio de 60 nm, calculado mediante dispersión de luz dinámica en un Nanosizer (Malvern Instruments). Las distribuciones de tamaño de 3 experimentos diferentes se muestran en la Fig. 3.

Ejemplo 2. Separación por afinidad de polímero sintetizado.

a) Preparación de adsorbente de afinidad - inmovilización del molde

Se activaron cuentas de vidrio por ebullición en NaOH 4 M durante 10 min, se lavó con agua desionizada y acetona y a continuación se secó a 80 °C durante 2 horas. Las cuentas se incubaron en tolueno con el 2 % en v/v de (3-

aminopropil) trimetoxisilano durante 3 horas, se lavaron con acetona y se colocaron en PBS, pH 7.2 con el 7 % en v/v de glutaraldehído durante 30 min y después se lavó con agua. A continuación, el molde (melamina) se inmovilizó sobre la superficie de las cuentas mediante incubación en una solución de PBS a pH 7,2 con N-metil-2-pirrolidona (10 % en v/v) y 0,1 g/ml de melamina durante 4 horas.

5 Las partículas de melamina recubiertas se usaron para la síntesis de nanopartículas con impronta y para la cromatografía de afinidad.

b) Cromatografía de afinidad

10 La muestra eluida de la columna de vidrio en el Ejemplo 1 se filtró con un filtro de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0,22 μm a fin de eliminar cualquier agregado de polímero grande. Para eliminar los monómeros sin reaccionar el filtrado se colocó en un cartucho de filtro de centrífuga con un punto de corte de 10.000 Da y se centrifugó a 3000 g durante 4 horas. Las partículas se resuspendieron en acetonitrilo y se sometieron a ensayo en HPLC con una columna (100 \times 4,6 mm) empaquetada con el adsorbente de afinidad preparado como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2a) utilizando un aparato de HPLC de la serie Agilent 1100. El volumen de inyección fue de 40 μl , la fase móvil usada fue acetonitrilo a 1 ml/min y la detección se realizó a 210 nm. Para evitar el uso de ácidos y ayudar a la elución, se realizó un análisis a 80 °C. Tanto los polímeros MIP como de control se prepararon de la misma manera. Los cromatogramas tanto de las partículas de blanco como con impronta sobre la fase de afinidad se representan a continuación en Figura 1 y 2.

Ejemplo 3 - Preparación de nanopartículas para la melamina

25 Cuentas de vidrio (75 μm de diámetro) se activaron por ebullición en NaOH 4 M durante 10 minutos, se lavaron a fondo con agua destilada dos veces y acetona y se secaron a 80 °C durante 2 horas. Las cuentas se incubaron en solución al 2 % en v/v de 3-aminopropiltrimetiloxisilano (APTMS) en tolueno durante toda la noche, se lavaron con acetona y se incubaron en 25 ml de una solución al 5 % en v/v de glutaraldehído (GA) en tampón PBS a pH 7,2 durante 1 hora, y se enjuagaron con agua destilada dos veces. El molde se inmovilizó incubando las cuentas en 0,01 g/ml de solución de melamina en PBS a pH 7,2 con N-metil-2-pirrolidona (NMP) (10 % en v/v) durante 4 horas.

30 El exceso de melamina adsorbida físicamente se eliminó lavando con agua destilada dos veces y metanol. Las cuentas de vidrio derivatizadas se secaron al vacío y se empaquetaron en una columna de cuarzo (6,4 mm de diámetro exterior con 1,5 mm de pared, 150 mm de longitud). Se mezclaron 0,32 g de ácido metacrílico (MAA), 0,36 g de trimetacrilato de trimetilopropano (TRIM), 0,36 g de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), 0,087 g de éster bencílico del ácido N,N'-dietilditiocarbámico y 0,02 g de tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol (CTA) en 1,17 g de acetonitrilo (ACN) y se purgó con N_2 durante 2 minutos. A continuación se inyectaron 500 μl en la columna empaquetada con los medios de afinidad, y se polimerizó con radiación UV a 366 nm (lámpara HB 171/A con 4 \times 15 W de potencia, PHILIPS) durante 2 minutos. Después de la polimerización la columna se conecta al sistema de HPLC (HPLC Serie Agilent 1100). La elución se realizó a un caudal de 1 ml/min, con detección UV a 220 nm.

40 Durante los primeros 90 minutos se usó ACN como fase móvil, mientras que la columna se mantenía en un baño de hielo a 0 °C. A continuación durante 45 minutos se cambió la fase móvil a ACN con ácido fórmico (10 mM) y la temperatura se elevó a 25 °C. Por último, durante 35 minutos se realizó la elución de las fracciones de alta afinidad de las nanopartículas a 60 °C. Las nanopartículas de blanco se prepararon como se ha descrito anteriormente pero se fabricaron usando cuentas de vidrio no derivatizadas. El tamaño de las nanopartículas sintetizadas en diferentes fracciones variaba entre 120 y 460 nm, calculado mediante dispersión de luz dinámica en un Nanosizer (Malvern Instruments).

Ejemplo 4 - Preparación de nanopartículas para péptido

50 Cuentas de vidrio (75 μm de diámetro) se sometieron a ebullición en NaOH 4 M durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada dos veces y acetona y se secaron a 80 °C durante 2 horas. Las cuentas se incubaron en solución al 2 % en v/v de 3-aminopropiltrimetiloxisilano (APTMS) en tolueno durante toda la noche, a continuación se lavaron con acetona y se incubaron en 25 ml de una solución del 7 % en v/v de glutaraldehído (GA) en PBS a pH 7,2 durante 1 hora, se enjuagaron con agua destilada dos veces y se incubaron en 0,05 mg/ml de solución de péptido (TATTSVLG-NH₂) en PBS a pH 7,2 durante 4 horas. Las cuentas derivatizadas se lavaron con agua destilada dos veces y se usaron para la preparación de nanopartículas de MIP. Se disolvieron 19,5 mg de N-isopropilacrilamida (NIPAm), 1 mg de N,N'-metilbisacrilamida (BIS), 16,5 mg de N-terc-butilacrilamida (TBAm) y 1,11 μl de ácido acrílico (AAc) en 50 ml de H₂O, que contiene 10 mg de dodecilsulfato sódico (SDS). La solución se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos y se purgó con N_2 durante 30 minutos. Se pusieron 10 ml de esta solución en un vial de 20 ml de tapón de rosca que contiene 4 g de cuentas de vidrio derivatizadas. La polimerización se inició mediante la adición de 100 μl de 60 mg/ml de persulfato de amonio (APS) y 3 μl de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) y se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 22 horas. La botella que contiene el producto de MIP y los medios de afinidad se mantuvo en hielo a 0 °C durante 10 minutos, y a continuación se vertió en los cartuchos de SPE para separar las cuentas de vidrio con nanopartículas unidas de los otros componentes. Se llevaron a cabo cinco etapas de lavado, cada una con 10 ml de agua fría destilada dos veces, para eliminar el material con baja o ninguna afinidad. La elución de las fracciones de nanopartículas de alta afinidad se realizó con PBS a pH 7,2 a 60 °C. Las nanopartículas en blanco se prepararon como se ha descrito anteriormente pero se fabricaron usando cuentas de

vidrio no derivatizadas. El tamaño de las nanopartículas sintetizadas en diferentes fracciones variaba entre 30 y 130 nm, calculado mediante dispersión de luz dinámica en un Nanosizer (Malvern Instruments).

Análisis de la afinidad de las nanopartículas sintetizadas

5 Chips recubiertos con Au (SIA Kit Au) se limpiaron por inmersión en una solución Piranha (H_2SO_4/H_2O_2 , 3:1 en v/v) durante 5 minutos. A continuación se aclararon bien con agua destilada dos veces y etanol. Se realizó la inmovilización del derivado tiolado del molde de péptido con un espaciador de glicina (CGGGGTATTSVLG-NH₂) y el péptido de referencia α -tiolado (CQLPELKQKSS-NH₂) y se registró en línea usando Biacore 3000 SPR mediante la inyección de 100 μ l de una solución de péptido de 0,1 mg/ml en PBS a pH 7,4 sobre un chip de oro limpio con un caudal de 15 μ l/min a 25 °C. Se inyectaron 100 μ l de nanopartículas diluidas a 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:100 en PBS a pH 7,4 (caudal: 15 μ l/min), y la respuesta del sensor se analizó durante 2 minutos usando el *software* Biacore. Se obtuvo una constante de disociación aparente $K_D = 2,5$ pM para la interacción entre las nanopartículas de MIP y el péptido molde (CGGGGTATTSVLG-NH₂). La constante de disociación aparente registrada para el péptido de referencia (CQLPELKQKSS-NH₂) fue de $K_D = 3,3$ nM lo que demuestra que las nanopartículas de MIP son aproximadamente 1000 veces más específicas para el péptido molde.

Ejemplo 5 - Preparación de nanopartículas para la vancomicina

20 Cuentas de vidrio (75 μ m de diámetro) se sometieron a ebullición en NaOH 4 M durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada dos veces y acetona y se secaron a 80 °C durante 2 horas. Las cuentas se incubaron en una solución al 2 % en v/v de (3-aminopropil)trimetoxisilano durante toda la noche, se lavaron con acetona y se pusieron en tampón PBS a pH 7,2 con el 7 % en v/v de glutaraldehído durante 1 hora, se enjuagaron con agua destilada dos veces y se incubaron con 0,5 mg/ml de HCl de vancomicina en PBS a pH 7,2 durante 4 horas. Las cuentas derivatizadas se lavaron con agua destilada dos veces y se usaron para la preparación de nanopartículas de MIP. Se disolvieron 19,5 mg de N-isopropilacrilamida (NIPAM), 1 mg de N,N'-metilbisacrilamida (BIS), 16,5 mg de N-ter-butilacrilamida (TBAM) y 1,11 μ l de ácido acrílico (AAc) en 50 ml de H₂O, que contiene 10 mg de dodecilsulfato sódico (SDS). La solución se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos y se purgó con N₂ durante 30 minutos. Se pusieron 50 ml de esta solución en un vial de 100 ml de tapón de rosca que contiene 20 g de cuentas de vidrio derivatizadas. La polimerización se inició mediante la adición de 500 μ l de 60 mg/ml de persulfato de amonio (APS) y 3 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) y se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 22 horas. La botella que contiene el producto de MIP y los medios de afinidad se mantuvo en hielo a 0 °C durante 10 minutos, y a continuación se vertió en los cartuchos de SPE para separar las cuentas de vidrio con nanopartículas unidas de los otros componentes. Se realizaron cinco etapas de lavado, cada una con 20 ml de agua fría destilada dos veces, para eliminar el material con baja o ninguna afinidad. A continuación, las nanopartículas de alta afinidad se separaron de los medios de afinidad mediante el paso de 5 fracciones de 20 ml de PBS a pH 7,2 a 60 °C. Las nanopartículas sin impronta se han preparado de la misma manera pero utilizando las cuentas de vidrio derivatizadas con clorotrimetilsilano. Las nanopartículas con impronta solubles resultantes tenían un diámetro medio de 228 nm, según los cálculos de dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Zetasizer Nano (Nano-S) de Malvern Instruments Ltd (Malvern, Reino Unido).

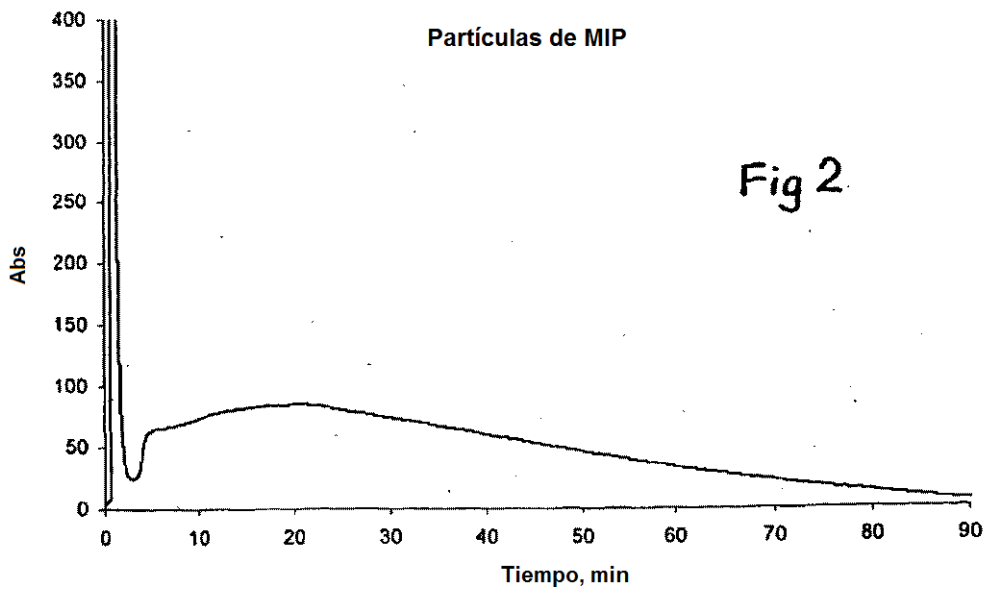
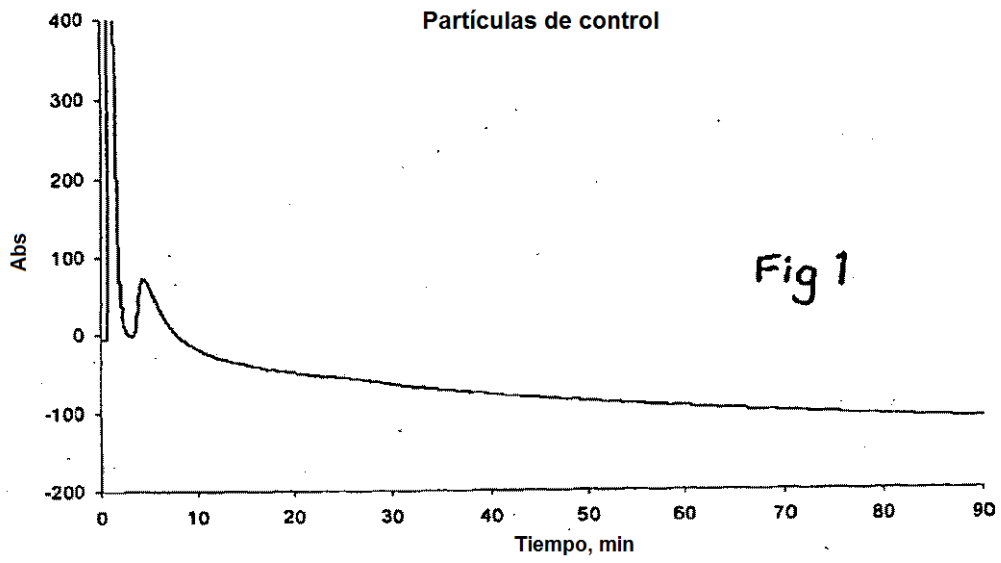
Análisis de la afinidad de las nanopartículas sintetizadas

45 Chips recubiertos con Au (SIA Kit Au) adquiridos en Biacore se limpiaron por inmersión en una solución Piranha (H_2SO_4/H_2O_2 , 3:1 en v/v) durante 5 minutos. A continuación se aclararon bien con agua destilada dos veces y etanol y se incubaron en una solución de 0,2 mg/ml de 4-aminotiofenol en etanol durante 24 horas a 4 °C. Después de esto los chips se enjuagaron con agua destilada dos veces y se incubaron en 2,5 ml de una solución al 7 % en v/v de GA en PBS a pH 7,2 a temperatura ambiente durante 1 hora. Los chips se lavaron adicionalmente con agua destilada dos veces y se incubaron en una solución de 1,2 mg/ml de vancomicina en PBS a pH 7:2 a temperatura ambiente durante 24 horas y se anclaron a Biacore 3000. Se inyectaron 100 μ l de nanopartículas y nanopartículas diluidas a 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 en PBS a pH 7,4 (caudal 15 μ l/min) a 30 °C. La respuesta del sensor se analizó usando el *software* Biacore. La constante de disociación aparente K_D de la vancomicina para las nanopartículas de MIP fue de 0,9 nM.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un polímero con impronta molecular ("MIP") en forma de solución o suspensión coloidal de partículas de MIP, que comprende las etapas de:
- 5 (a) suministro de una sustancia de soporte que tiene un material molde inmovilizado sobre la misma para que quede expuesto a una superficie;
- (b) suministro de una composición polimerizable en contacto con dicha superficie;
- 10 (c) realización de una polimerización controlada de dicha composición polimerizable en contacto con dicha superficie, terminándose dicha polimerización cuando se hayan formado partículas de MIP capaces de formar una solución o una suspensión coloidal; y
- (d) separación de dichas partículas de MIP de dicha superficie.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, después de dicha etapa de separación de dichas partículas de MIP de dicha superficie, dicha sustancia de soporte con dicho material molde inmovilizado sobre la misma se reutiliza en las etapas (b), (c) y (d).
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que dicha sustancia de soporte es una resina polimérica, un polisacárido, un vidrio o una superficie metálica; y/o dicha sustancia de soporte está en forma de cuentas, la superficie de guías de ondas, fibras, incluyendo fibras ópticas, membranas o capilares.
- 20 4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además incluye, después de dicha etapa de separación de dichas partículas de MIP de dicha superficie, una etapa de purificación (e) en la que (i) una solución o una suspensión que contienen dichas partículas de MIP separadas se ponen en contacto con una sustancia de soporte que tiene dicho material molde inmovilizado sobre la misma para que quede expuesto en una superficie, de modo que dichas partículas de MIP se unen a dicho material molde inmovilizado, (ii) el material no unido se separa de dicha sustancia de soporte; y posteriormente (iii) las partículas de MIP se recuperan del material molde inmovilizado para formar una solución o una suspensión coloidal purificadas.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicha sustancia de soporte usada en la etapa (e) es como se define en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, y es igual o diferente de la sustancia de soporte usada en la etapa (c).
- 30 6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicha polimerización controlada se selecciona entre polimerización radicalaria tal como polimerización radicalaria viva opcionalmente controlada (LRP); polimerización aniónica viva; polimerización catiónica viva; y policondensación controlada, preferentemente seleccionada entre polimerización mediada por *iniferter*, polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización radicalaria por transferencia de átomos (ATRP) y polimerización de transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible (RAFT).
- 35 7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que en la etapa (c), la polimerización se termina para producir partículas de MIP solubles con masas moleculares en el intervalo de 500-1.000.000 Dalton, o partículas coloidales con tamaños de partícula < 1 µm y que son estables en solución.
- 40 8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha composición polimerizable contiene uno o más monómeros seleccionados entre monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, cloroacrilatos, itaconatos, trifluorometilacrilatos, derivados de aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos y carbohidratos.
- 45 9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicha composición polimerizable también contiene al menos un agente de reticulación.
- 50 10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que dicho al menos un agente de reticulación se selecciona entre dimetacrilato de etilenglicol, trimetacrilato de trimetilolpropano, divinilbenceno, metilenbisacrilamida, etilenbisacrilamida y N,N'-bisacrilolpiperazina.
- 55 11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que dicha etapa (d) de separación de dichas partículas de MIP de dicha superficie se efectúa por medio de calentamiento, modificación del pH de la solución, modificación de la concentración iónica o por medio de la adición de urea, guanidina o una sustancia que interactúe con el molde con más fuerza de lo que lo hace el MIP.
- 60 12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que dicha etapa (c) de realización de la polimerización controlada emplea polimerización secuencial en la que dicha composición de polimerización proporcionada en la etapa (b) se usa para una primera etapa de polimerización, tras la cual se proporciona una composición polimerizable diferente y se realiza una etapa de polimerización adicional para producir partículas de MIP modificadas que todavía son capaces de formar una solución o una suspensión coloidal.
- 65

- 5 13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que, después de la etapa (c), los materiales mal consolidados y de baja afinidad se retiran mediante lavado de dicho material molde inmovilizado, tras lo cual, en la etapa (d), se aplican condiciones de elución más fuertes para la elución y la recolección de partículas de alta afinidad.
- 10 14. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa (c) emplea condiciones de polimerización que favorecen la formación de partículas coloidales solubles y finas que comprenden una o más de: dilución de la mezcla de monómeros, realización de la polimerización a baja temperatura, adición de agentes de terminación de cadena o adición de inhibidores.
- 15 15. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que en la etapa (c), la polimerización se inicia mediante calentamiento, irradiación de luz UV o visible, irradiación de microondas, electropolimerización, oxidación o adición de catalizador.
- 20 16. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye una etapa adicional de uso de dichas partículas de MIP separadas (a) como ligandos específicos del receptor en química analítica; (b) como ligandos específicos del receptor para llevar a cabo la separación en las industrias de biotecnología, farmacéuticas o alimentarias; (c) como catalizador; (d) en sensores; o (e) en el que dichas partículas de MIP están unidas a isótopos o marcadores fluorescentes y se usan como agentes de contraste selectivos.
17. Partículas de MIP separadas como las producidas por el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso como medicamento.



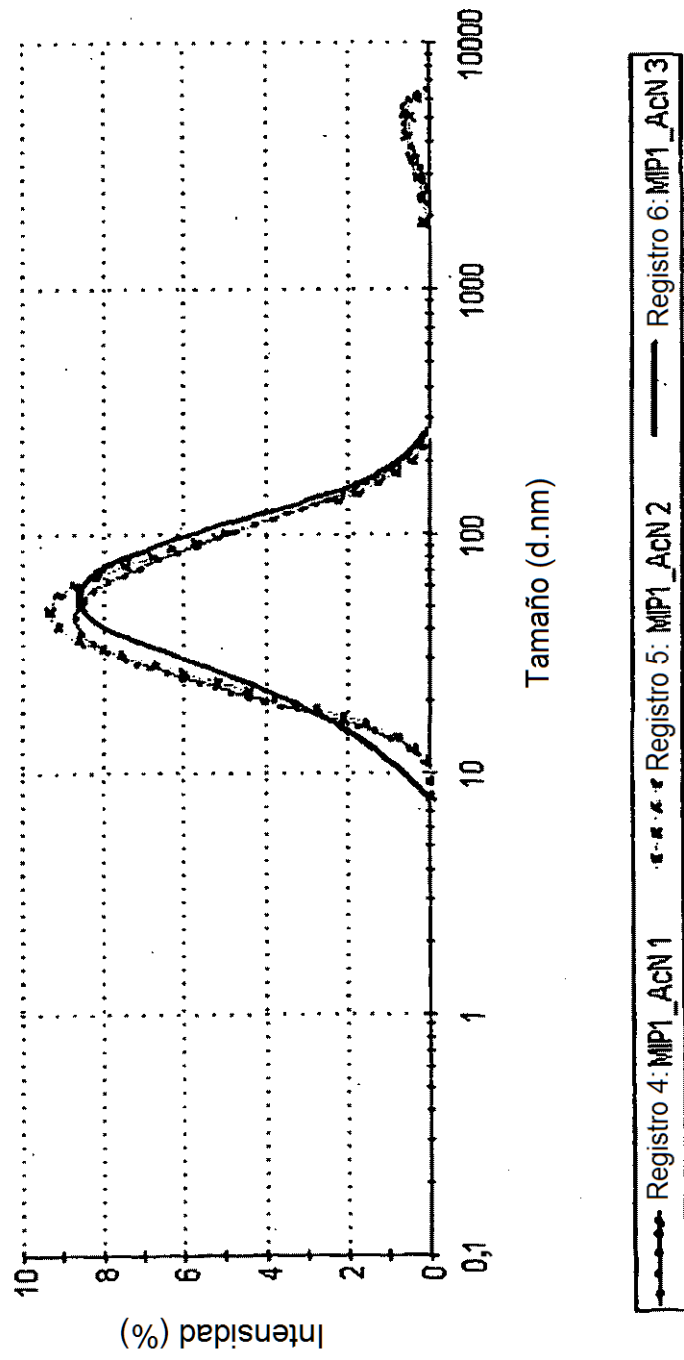


Fig 3