

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 643**

51 Int. Cl.:

C08F 2/38 (2006.01)

C08F 4/00 (2006.01)

B01J 20/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06744047 .9**

96 Fecha de presentación: **01.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1893654**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **PREPARACIÓN DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS SOLUBLES Y COLOIDALES MEDIANTE POLIMERIZACIÓN VIVA.**

30 Prioridad:
01.06.2005 GB 0511116

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.02.2012

73 Titular/es:
**CRANFIELD UNIVERSITY
University Way Cranfield
Bedfordshire MK43 0AL, GB**

72 Inventor/es:
**KARIM, Khalku;
PILETSKY, Sergey Anatoliyovich;
PILETSKA, Olena Volodimirivna;
TURNER, Anthony Peter Francis;
CHIANELLA, Iva y
GUERRIERO, Antonio, Ricardo, Leonardo**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 374 643 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 molecularmente impresos solubles y coloidales mediante polimerización viva.

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere al campo de la síntesis orgánica y la química de polímeros y, en particular, al área relacionada con la metodología para la preparación de moléculas orgánicas mediante síntesis dirigida por plantilla y polimerización con plantilla.

10

Técnica anterior

[0002] La expresión "síntesis dirigida por plantilla" incluye la formación de una sustancia nueva por modificación química de un sustrato o mediante el acoplamiento de dos o más moléculas en presencia de una plantilla que sirve de patrón para la formación de la nueva estructura. El ejemplo más conocido de este proceso es la transcripción génica. Un ejemplo concreto de la síntesis dirigida por plantilla es la polimerización con plantilla, en la que se produce la formación de un receptor polimérico (réplica) en presencia de otro polímero o sustancia orgánica plantilla de bajo peso molecular. Antes de la iniciación de la polimerización y durante la polimerización, los monómeros se distribuyen ellos mismos en el espacio (proceso de autoensamblaje) alrededor de las moléculas plantilla en función del tamaño, la polaridad y la funcionalidad de la plantilla. Los monómeros se polimerizan en forma de cadenas lineales o de redes tridimensionales rígidas.

15

20

[0003] El ejemplo específico de la polimerización con plantilla es la impresión molecular, que se basa en la polimerización de monómeros vinílicos o acrílicos en presencia de una plantilla (véanse las ref. 1, 2). El planteamiento tradicional implica la producción de polímeros impresos altamente reticulados que son insolubles en agua y disolventes orgánicos. La posibilidad de usar polímeros molecularmente impresos (MIP) en farmacología y medicina es limitada debido a su insolubilidad inherente.

25

[0004] Recientemente se han realizado varios intentos de desarrollar protocolos para la preparación de polímeros impresos con pesos moleculares relativamente bajos que pudieran existir en formas solubles o, al menos, coloidales. Este formato permitirá usar polímeros como moléculas biológicamente activas (fármacos, efectores, moduladores, inhibidores) en farmacología y medicina y como verdaderos "anticuerpos de plástico" en sensores y en la separación por afinidad.

30

[0005] En un ejemplo de este tipo se sintetizaron moléculas MIP por medio de una policondensación de aminoácidos y nucleótidos alrededor de un receptor biológico, una enzima, un ácido nucleico, una célula, un virus, un microorganismo, una muestra de tejido o un fármaco (véase la patente de EE.UU. 6852818). En otro ejemplo, se usaron diferentes procedimientos para producir MIP oligoméricos y poliméricos (véase la patente de EE.UU. 6127154). La mayoría de los ejemplos de la técnica anterior describen la preparación de polímeros reticulados de alto peso molecular que requieren de la hidrólisis para liberar partículas solubles o coloidales estables en solución. En un ejemplo de este tipo (véase el documento US 6127154) los investigadores usaron compuestos de diseño especial que contenían grupos perfluorofenilazido fotoactivos capaces de acoplarse bajo iluminación. En este caso se pudieron sintetizar oligómeros en forma de partículas solubles. En todos estos casos, los compuestos sintetizados presentan fracciones de tamaño y propiedades poco controlados. En el documento WO 96/40822 y la patente de EE.UU. 5630978 se describen otros planteamientos para la síntesis de MIP con actividad biológica, en los que se prepararon moléculas biológicamente activas en presencia de polímeros impresos con plantilla que a su vez se prepararon en presencia de otra plantilla, normalmente un fármaco tal como heparina. La réplica resultante se asemeja a la estructura de la molécula farmacéutica original. Apenas se puede esperar que la actividad de las moléculas sintetizadas de esta manera pueda ser más pronunciada que la de la plantilla original.

35

40

45

50

[0006] Las técnicas de polimerización viva por radicales libres, tales como la polimerización por iniferter, la polimerización radicalaria mediada por nitróxido, la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP) y la polimerización por adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT), abren nuevas rutas para la síntesis de polímeros con pesos moleculares relativamente bajos y controlados (véanse las ref. 3 - 9). Las técnicas de polimerización viva/controlada se basan en un equilibrio delicado entre las especies durmientes y activas que reduce eficazmente la concentración de radicales libres en el sistema y minimiza el grado de terminación. La polimerización viva puede carecer de reacciones secundarias, tales como terminación y transferencia de cadena, y, por lo tanto, puede generar polímeros con una estructura y distribución del peso molecular bien definidas. El mismo planteamiento se puede aplicar a copolímeros, haciendo posible así la producción de copolímeros de bloques

55

mediante la polimerización por radicales libres añadiendo los monómeros en la secuencia adecuada.

[0007] La polimerización viva se ha usado previamente en la producción de MIP de bloques injertados (véanse las ref. 10, 11). Los polímeros solubles también se produjeron mediante polimerización viva y se usaron posteriormente en la producción de MIP (véase la ref. 12). Sin embargo, hasta ahora nadie ha desarrollado MIP solubles por polimerización viva.

[0008] Los antecedentes se pueden encontrar en las referencias siguientes.

1. Wulff, G. Makromol. Chem. Macromol. Symp., 1993, 70/71, 285.
2. Vlatakis, G. y col. Nature, 1993, 361, 645.
3. Moad, G.; Rizzardo, E.; Solomon, D.H. Macromolecules 1982, 15, 909.
4. Matyjaszewski, K.; Xia, J. Chem. Rev. 3002, 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. y col. Polym. Int. 2000, 49, 993 - 1001.
10. Ruckert, B.; Hall, A.J.; Sellergren, B. J. Mater. Sci. 2002, 12, 2275.
11. Hattori, K. y col. J. Membr. Sci. 2004, 233, 169.
12. Li, Z.; Day, M.; Ding, J.F.; Faid, K. Macromolecules. 2005, 38, 2620.
13. Jagur-Grodzinski, J. Reactive & Functional Polymers. 2001, 1, 1.
14. Shim, S.E. y col. Macromolecules. 2003, 36, 7994 - 8000.
15. Yu, Q.; Zeng, F.; Zhu S. Macromolecules. 2005, 34, 1612.
16. Documento US 5994110
17. Documento WO 96141173

Descripción de la invención

[0009] La presente invención describe la aplicación de la polimerización viva a la producción de partículas MIP solubles o coloidales.

[0010] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una solución o una suspensión coloidal de un polímero. Se parte de un paso de síntesis que comprende la polimerización viva dirigida por plantilla de monómeros funcionales, realizada en presencia de una plantilla, preferentemente una plantilla molecular, produciéndose de este modo un polímero complementario en el que al menos una parte es complementaria a al menos una parte de la plantilla, incluyendo el paso la terminación de la polimerización viva cuando se hayan formado las partículas poliméricas complementarias adecuadas para la preparación de la solución o la suspensión coloidal. Después sigue un paso de separación en el que se usa un medio cromatográfico que presenta la plantilla inmovilizada en él, con el fin de efectuar una cromatografía de afinidad con el producto del paso de síntesis para aislar una fracción de polímeros complementarios con una afinidad específica por la plantilla.

[0011] El procedimiento puede incluir un paso de modificación de las partículas poliméricas complementarias para producir partículas poliméricas derivadas, siendo al menos una parte de ellas complementaria a al menos una parte de la plantilla, para la preparación de la solución o la suspensión coloidal.

[0012] La técnica de polimerización viva se selecciona preferentemente entre la polimerización por iniferter, la polimerización mediada por radicales libres estables, la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP) y la polimerización por adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT), y es preferentemente una polimerización radicalaria mediada por nitróxido.

[0013] En los casos en los que la técnica de polimerización viva es una polimerización por iniferter, el iniferter se selecciona preferentemente entre: foto-iniferters que llevan un grupo ditiocarbamilo; e iniferters térmicos que llevan un grupo azo.

[0014] El procedimiento puede incluir los pasos de: separar del sistema de polimerización un complejo que comprende la plantilla y el polímero complementario; y eliminar seguidamente la plantilla. Preferentemente, esta separación de la plantilla del polímero se realiza por medio de una o más de las operaciones cambio del pH de la solución; cambio de la fuerza iónica de la solución; y adición de urea, guanidina o una sustancia que interactúe con

la plantilla más intensamente que el polímero. Por ejemplo, la eliminación de la plantilla puede realizarse mediante una o más de las operaciones filtración, electroforesis, separación cromatográfica, lavado, centrifugación y diálisis.

[0015] El procedimiento de la polimerización viva puede incluir los pasos de:

- a) polimerización viva dirigida por plantilla de un monómero funcional en presencia de una plantilla;
- b) detención de la polimerización;
- c) reinicio de la polimerización en presencia de un monómero funcional diferente, produciéndose de este modo un polímero complementario que es un copolímero de bloques en el que al menos una parte es complementaria a al menos una parte de la plantilla; y
- d) repetición opcional de los pasos a) a c).

[0016] El procedimiento puede comprender adicionalmente el paso de reticulación de los monómeros funcionales.

[0017] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un polímero preparado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención como ligando específico de receptor en la química analítica, o para el uso en la realización de separaciones en biotecnología o las industrias farmacéutica o alimentaria, como agente de contraste, catalizador o elemento sensor. El polímero preparado de acuerdo con la invención también se puede usar como fármaco.

[0018] La presente invención incluye el uso de una solución o suspensión coloidal preparada de acuerdo con el procedimiento de la invención para unir el polímero a una superficie, que comprende los pasos de: poner la solución o la suspensión coloidal de un polímero en contacto con una superficie; y reiniciar la polimerización viva para efectuar la reacción entre el polímero y la superficie. La presente invención también incluye productos que presentan una superficie con un polímero unido, estando el polímero unido a la superficie de esta manera, y su uso como ligando específico de receptor en la química analítica o para el uso en la realización de separaciones en biotecnología o las industrias farmacéutica o alimentaria. Tales productos también se pueden usar como fármacos.

[0019] Se describe un procedimiento para la síntesis de una amplia variedad de moléculas biológicamente activas (fármacos, efectores, moduladores, inhibidores). En el procedimiento descrito en la presente memoria, los MIP se producen en presencia de una plantilla usando técnicas de polimerización viva. La reacción de polimerización se termina en un momento temprano cuando el tamaño de las moléculas sintetizadas es relativamente pequeño. El producto de este procedimiento puede existir en forma soluble o coloidal estable en solución. Esto naturalmente es distinto de la forma gelificada que surgiría normalmente si se dejara que la polimerización llegara hasta el final. Las suspensiones coloidales o las soluciones de MIP preparadas de acuerdo con esta invención pueden ser líquidos acuosos u orgánicos.

[0020] Las moléculas sintetizadas presentan una estructura complementaria a la de la plantilla original y poseen la capacidad de unirse a ella con una afinidad razonablemente alta. Estas moléculas sintéticas (polímeros u oligómeros) presentan afinidades y especificidades predeterminadas, una actividad superior a los polímeros sintetizados al azar y se pueden preparar mucho más fácilmente que las estructuras orgánicas discretas diseñadas específicamente. Las moléculas sintetizadas como se describen en esta invención (dímeros, oligómeros, polímeros o su mezcla) se pueden usar como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptor en la química analítica (sensores, ensayos) y para la separación en las industrias biotecnológica, farmacéutica y alimentaria. Los esfuerzos previos dedicados al diseño de fármacos se han basado típicamente en la investigación voluminosa de relaciones estructura/actividad de un gran número de estructuras químicas. La presente invención describe un procedimiento más sencillo y directo, la polimerización viva de impresión, para diseñar una sustancia biológicamente activa que proporcione un gran beneficio (en comparación con el diseño de fármacos y procedimientos de cubrimiento tradicionales), así como ligandos útiles para la separación por afinidad, sensores y catalizadores.

[0021] Los aspectos importantes de la invención incluyen:

(1). Síntesis de las moléculas biológicamente activas mediante polimerización viva en presencia de una plantilla que puede ser un receptor biológico, un ácido nucleico, una célula, un virus, un microorganismo, una muestra de tejido, un carbohidrato, un oligosacárido, un polisacárido, una nucleoproteína, una mucoproteína, una lipoproteína, una proteína sintética, una glicoproteína, un glucosaminoglucano, un esteroide, un inmunosupresor, una hormona, heparina, un antibiótico, una vitamina o un fármaco.

(2). Optimización de las condiciones de la reacción con el fin de generar partículas sintetizadas con un tamaño

relativamente pequeño.

(3). Síntesis de las moléculas biológicamente activas a partir de los monómeros funcionales, que pueden incluir uno o más de: monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, derivados de aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos y carbohidratos.

5 (4). Separación de las partículas sintetizadas por cromatografía, filtración y electroforesis.

(5). Polimerización secuencial cuando el polímero impreso se modifica con otros tipos de moléculas con el fin de cambiar propiedades o funciones de las moléculas sintetizadas.

10 (6). Aplicación de las moléculas sintetizadas en la preparación de fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptor en la química analítica (sensores, ensayos), para la separación en las industrias biotecnológica, farmacéutica y alimentaria.

Breve descripción de los dibujos:

[0022]

15 La figura 1 muestra un modelo esquemático de la polimerización mediada por nitroxí y la estructura del radical nitroxí TEMPO-4-ona.

20 La figura 2 muestra los perfiles de la velocidad de polimerización para la polimerización radicalaria en bloques (a) y la polimerización viva (b).

Descripción detallada

25 **[0023]** La presente invención describe la formación de MIP solubles preparados en presencia de plantillas que pueden ser moléculas pequeñas o grandes, tales como receptores, enzimas o ácidos nucleicos. Al contrario que en el planteamiento tradicional para la preparación de los MIP, los polímeros preparados de esta manera se asemejan a los efectores (activador, inhibidor o sustrato) de la plantilla y pueden presentar actividad biológica. Tales polímeros se pueden usar, por ejemplo, como fármacos en farmacología y medicina.

30 **[0024]** En un aspecto, la presente invención se refiere a la síntesis de moléculas biológicamente activas mediante polimerización radicalaria viva (LRP) o polimerizaciones vivas aniónicas o catiónicas en presencia de una plantilla que puede ser un receptor biológico, un ácido nucleico, una célula, un virus, un microorganismo, una muestra de tejido, un carbohidrato, un oligosacárido, un polisacárido, una nucleoproteína, una mucoproteína, una lipoproteína, una proteína sintética, una glicoproteína, un glucosaminoglucano, un esteroide, un inmunosupresor, una hormona, heparina, un antibiótico, una vitamina o un fármaco. Normalmente, se mezcla una plantilla soluble en un disolvente orgánico adecuado o en agua con monómeros funcionales, uno de los cuales puede ser un agente reticulante, y un iniciador vivo.

40 **[0025]** La polimerización se puede iniciar por calentamiento o, preferentemente, irradiación UV, y normalmente dura minutos u horas, dependiendo de la reactividad de las especies. La presente invención abarca varias formas diferentes de polimerizaciones "vivas"/controladas. Todas ellas se basan en transformaciones reversibles, mediante estímulos térmicos, químicos o fotoquímicos, de la especie durmiente en los radicales libres o iones reactivos que actúan de propagadores de la cadena. Para ello, la constante de equilibrio de las reacciones se desplaza a favor de la especie durmiente y puede permitir un intercambio rápido entre la especie durmiente y los radicales libres. De este modo, las concentraciones de radicales serán muy bajas y su tiempo de residencia muy corto, lo que reduce la probabilidad de reacciones secundarias que conduzcan a la terminación de la cadena polimérica en crecimiento.

50 **[0026]** Ejemplos de la polimerización viva incluyen la polimerización mediada por nitróxido (NMP), la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP) y la polimerización por adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT). En la NMP, por ejemplo, se combina una reacción de acoplamiento muy rápida de los radicales nitróxido con los radicales del extremo de la cadena polimérica con una fragmentación lenta, impulsada térmicamente, del polímero vivo, temporalmente rematado, para regenerar el nitróxido y el radical polimérico P* (véase, por ejemplo, la figura 1). La polimerización RAFT se basa en el equilibrio de adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible, en el que hay un intercambio entre las especies activas y durmientes. Los radicales generados comienzan a crecer y, cuando encuentran una molécula que actúa de agente de transferencia de cadena, se añaden a ella de forma reversible.

55 **[0027]** Generalmente, el procedimiento de la polimerización viva permite el uso de iniferters (iniciador agente de transferencia terminador) que se pueden preparar opcionalmente junto con iniciadores convencionales para conferir

una naturaleza viva a la polimerización. Estos iniferters pueden ser foto-iniferters que llevan un grupo ditiocarbamilo o iniferters térmicos que portan grupos carbono-carbono o azo (véase, por ejemplo, la ref. 13). La clase preferida de iniferters son aquellos que proporcionan diferentes radicales, un radical carbonado que es reactivo y otro menos reactivo o no reactivo que es, por ejemplo, un radical ditiocarbamilo. El radical carbonado, que habitualmente es un radical bencilo, puede reaccionar con un monómero vinílico para iniciar la polimerización. El radical ditiocarbamilo es uno que puede terminar la polimerización recombinándose con una cadena polimérica en crecimiento (véase, por ejemplo, la ref. 14).

[0028] Otros compuestos que se pueden usar como iniciadores para diferentes tipos de polimerización viva (transferencia atómica, aniónica, catiónica, etc.) y que se encuentran dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: 2-bromopropionitrilo con Cu(I)Br complejoado con N,N,N",N",N"-pentametildietilentiaramina, macroiniciador de poliestireno bromado con Cu(I)Cl/PMDETA; 2-bromoisobutirato de etilo con CuCl/bipiridina; dibromuro de 1,4-bis(2,6-diisopropilfenil)acenaftenodiimino-níquel(II); 2,2-dimetoxi-2-fenilacefenona en combinación con disulfuro de tetraetiltiuram; tetrafenilbifosfina; peróxidos terciarios, tales como peróxido de di-terc.-butilo; SmMe(C₅Me₅)₂ (THF); epóxidos basados en estireno junto con TiCl₄; tetrámero de metilostireno disódico; MoOCl₄-n-BuSn-EtOH; HCl/ZnCl₂; p-toluenosulfonato de metilo; 2,10,15,20-tetrafenilporfirato de metilaluminio; 3-metil-1,1-difenilpentil-litio; butil-litio en THF; compuestos de molibdeno-alquilidino; organolantánido(III) bifuncional; 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 diimido de Pd, Ni, Fe o Co; complejos homogéneos de carbenos de Ta, Ti, Mo, W; complejos de metales de tierras raras compuestos por complejos de tipo metaloceno o de tipo no metaloceno; complejos catiónicos de acetamidinato de monociclopentadienilcirconio; telómeros fluorados esterificados con uno o dos grupos hidroxilo como iniciadores para la polimerización viva mediada por cobre; Yb[C(SiMe₃)₃]₂.

[0029] Una ventaja de la polimerización viva en comparación con la polimerización radicalaria tradicional reside en que la primera avanza a una velocidad baja y sin autoaceleración observable, mientras que la última con frecuencia avanza con una fuerte autoaceleración (véase, por ejemplo, la ref. 15). En la figura 2 se representan los perfiles de la velocidad de polimerización típicos para la polimerización por radicales libres que se efectúa mediante mecanismos normales y vivos. Está claro que es mucho más fácil de controlar la polimerización viva que la polimerización en bloques por radicales libres normal. La presente invención aprovecha esta circunstancia realizando la polimerización viva en condiciones que favorezcan la formación de polímeros con un peso molecular relativamente bajo. La reacción se detiene típicamente en un momento temprano, produciendo polímeros con un peso molecular de 500 a 1.000.000 Da.

[0030] En la presente invención se pueden optimizar las condiciones de reacción con el fin de generar partículas con un tamaño relativamente pequeño. Una parte importante del procedimiento es la selección de un iniciador vivo apropiado y la optimización de las condiciones de la reacción de polimerización. Un ejemplo popular de la LRP implica la polimerización viva de olefinas por radicales libres mediada por nitróxido. Otro ejemplo incluye sistemas de CuCl/bpy y cloruro de bencenosulfonilo.

[0031] Los iniciadores de la polimerización radicalaria viva se pueden preparar a partir de moléculas orgánicas discretas o a partir de macromoléculas. En realidad, la mayoría de los compuestos que contienen un grupo hidroxilo, carboxilo o amino se pueden convertir en un iniciador y, por tanto, incorporar fácilmente en el polímero. Esto puede realizarse bien en el extremo del polímero en el caso de un iniciador monofuncional o bien en el centro del polímero en el caso de un iniciador polifuncional.

[0032] Las condiciones de reacción que favorecen la formación de polímeros con un peso molecular relativamente bajo incluyen, pero no se limitan a: (i) uso de una relación estequiométrica entre el iniciador y los monómeros; (ii) enfriamiento de la reacción o detención de UV u otra irradiación, lo que terminará la formación de radicales en un momento temprano de la reacción; (iii) eliminación de los monómeros para que no sigan en contacto con la cadena polimérica en crecimiento, por ejemplo por filtración o cromatografía; (iv) adición de inhibidores a la reacción; (v) realización de la polimerización en una solución muy diluida. La opción preferida es la detención de la irradiación. Como resultado de la polimerización viva controlada se pueden formar partículas MIP con un tamaño de 500 a 1.000.000 Da que pueden existir en formas solubles o, al menos, coloidales.

[0033] Los monómeros que se pueden usar para la preparación de los MIP incluyen: monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, derivados de aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos y carbohidratos.

5 [0034] Asimismo se pueden usar monómeros reticulantes en caso de que fuera necesario fijar o estabilizar la estructura de la molécula réplica resultante para que permanezca complementaria a la de la plantilla. Ejemplos típicos de agentes reticulantes adecuados para los MIP incluyen dimetacrilato de etilenglicol, metilbisacrilamida y N,N'-bisacriloilpiperazina. Los expertos en la técnica podrán seleccionar monómeros y agentes reticulantes adecuados para un sistema concreto. De forma alternativa, se puede usar una variedad de procedimientos combinatoriales y computacionales para asistir en esta selección.

10 [0035] Las partículas sintetizadas mediante polimerización viva se pueden separar por cromatografía, filtración y electroforesis. En la invención se usa la cromatografía de afinidad, usándose la plantilla inmovilizada para la purificación de la fracción polimérica con la mayor afinidad por la plantilla. Se puede usar un cambio en el pH de la solución, en la fuerza iónica o la adición de urea, guanidina o sustancias que interactúen con la plantilla más intensamente que el polímero, filtración, electroforesis, separación cromatográfica, lavado, centrifugación o diálisis.

15 [0036] La cromatografía de afinidad es una herramienta poderosa puesto que permite preparar MIP con una estrecha distribución de afinidades por la plantilla. Esto actualmente es imposible de conseguir con los MIP tradicionales.

20 [0037] También es posible realizar la polimerización viva usando un iniciador que presente una propiedad específica, por ejemplo una hidrofobicidad alta o baja, que permita el uso de la extracción (en fase líquida o sólida) para separar el MIP de los monómeros que no han reaccionado y de la plantilla.

25 [0038] De forma alternativa, las cadenas poliméricas en crecimiento se pueden modificar con otro polímero o grupo funcional con la intención de introducir una propiedad específica en los MIP que pueda facilitar su extracción u otra forma de separación. Un ejemplo de ello podría ser un polímero con una cola hidrófoba que permitiera, por ejemplo, extraer el polímero de una solución acuosa mediante un disolvente orgánico. Sería posible introducir un grupo de unión específico, por ejemplo biotina, que permitiera retirar selectivamente el polímero mediante un adsorbente de afinidad. Los expertos en la técnica están familiarizados con los abundantes protocolos experimentales que permiten realizar esta modificación y la separación correspondiente.

30 [0039] En un aspecto, la presente invención se refiere a la polimerización secuencial cuando el polímero impreso se modifica con otros tipos de moléculas con el fin de cambiar las propiedades o funciones de las moléculas sintetizadas. Se ha mencionado ya 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 continuarla posteriormente deteniendo simplemente, por ejemplo, la irradiación UV de la mezcla de reacción. El extremo de la cadena polimérica en crecimiento contiene el iniciador que se puede activar de nuevo para iniciar una nueva ronda de polimerización. Así, la cadena polimérica en crecimiento se puede exponer a otro monómero y la polimerización continúa, dando como resultado la formación de polímeros de bloques. El nuevo monómero puede introducir una nueva funcionalidad en el polímero. De este modo, además de la afinidad por la primera plantilla, proporcionada por el primer MIP, un polímero ampliado puede tener afinidad por la segunda plantilla introducida en el sistema. El polímero de bloques ampliado puede presentar marcas fluorescentes unidas a los grupos terminales que pueden resultar útiles en el diagnóstico.

45 [0040] También son posibles otros tipos de modificación que puedan introducir otras funcionalidades, tales como la capacidad para generar especies activas con propiedades biocidas, grupos catalíticos, marcas isotópicas, grupos útiles para la inmovilización, detección, etc. Estas funcionalidades también se pueden introducir en el polímero usando un iniciador funcionalizado correspondiente.

50 [0041] Las aplicaciones de las moléculas sintetizadas incluyen los usos como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptor en la química analítica (sensores, ensayos), para la separación en las industrias biotecnológica, farmacéutica y alimentaria. La naturaleza soluble de los polímeros sintetizados los convierte en objetivos ideales para el uso como fármacos. La unión selectiva a la enzima, al receptor o a otra molécula biológica se puede usar para alterar las funciones biológicas de estas moléculas. Así, los MIP sintetizados por polimerización viva se pueden usar *in vivo* para modular procesos biológicos. Cuando se unen a isótopos o marcas fluorescentes, los MIP se pueden usar como agentes de contraste selectivos o en otras formas de diagnóstico. Los MIP integrados con ligandos capaces de producir en ciertas condiciones, por ejemplo, oxígeno molecular singlete se pueden usar como agentes biocidas selectivos. Los expertos en la técnica podrán proponer una diversidad de otras modificaciones para introducir propiedades antibióticas en los MIP preparados por polimerización viva.

[0042] Los MIP sintetizados se pueden usar como sustitutos de anticuerpos y receptores naturales en diferentes formas de ensayos y sensores. Varias características convierten a los MIP preparados por polimerización viva en objetos especialmente atractivos para la aplicación en sensores. Así, las moléculas MIP sintetizadas siguen conteniendo el iniciador, el cual se puede usar para unir polímeros covalentemente a las superficies sólidas. Una simple irradiación UV puede ser suficiente para unir los MIP a las superficies cubiertas de enlaces dobles.

[0043] La capacidad de usar la cromatografía de afinidad para separar ligandos de MIP en varias fracciones con diferentes afinidades puede resultar ventajosa para la preparación de sensores/ensayos con intervalos de detección variables. La presente invención se describirá ahora con más detalle, especialmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de partículas MIP con afinidad por 6-metil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

[0044] Una mezcla de 1,17 g de acetonitrilo, 0,32 g de ácido metacrílico, 0,046 g de 6-metil-1,3,5-triazina-2,4-diamina (plantilla), 0,36 g de trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM), 0,36 g de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y 0,087 g de éster bencílico del ácido dietilditiocarbámico (iniciador vivo) se purgó con nitrógeno y se polimerizó bajo radiación UV (fuente de UV UV-APRINT 100 CVI con una intensidad de 0,163 W/cm², Dr. Hönle) durante 2,5 min en una botella de vidrio cerrada. Las moléculas poliméricas solubles resultantes se separaron por cromatografía de exclusión molecular (GPC) usando el adsorbente ToyoPearl HW55S empaquetado en una columna Buchi B-685 de 230x15 mm. Como eluyente se usó una mezcla de acetonitrilo/agua al 90/10% que se alimentó a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min mediante una bomba de HPLC (Hewlett Packard serie 1050). La columna se cargó con la mezcla de reacción y se recogieron fracciones cada 5 min. El polímero control (blanco) se preparó de la misma manera, pero en ausencia de la plantilla. El peso total del polímero sintetizado fue de 0,034 g (rendimiento ~3%). Para el polímero blanco también se obtuvo aproximadamente el mismo rendimiento. El peso molecular de las fracciones se determinó usando HPLC Agilent serie 1100 equipada con una columna de exclusión por tamaño (Phenomenex BioSep S 2000) calibrada con patrones de poliestireno de peso molecular medio Phenomenex (intervalo 13 a 104 kDa). La fase móvil usada fue THF a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min. El volumen de inyección ascendió a 40 µl. La absorbancia se midió a 256 nm para poliestireno y a 230 nm para las partículas MIP. Las fracciones del polímero sintetizado presentaban un peso molecular medio de:

fracción de 10-15 min - 90 kDa;

fracción de 15-20 min - 67 kDa;

fracción de 20-25 min - 13 kDa.

Ejemplo 2. Separación del polímero sintetizado por afinidad.

a) Preparación del adsorbente de afinidad - inmovilización del análogo de la plantilla

[0045] El polímero con el análogo de la plantilla inmovilizado se preparó mezclando 5 g de DMF, 5 g de EGDMA, 0,30 g de 2,4-diamino-6-(metacrililoiloxi)etil-1,3,5-triazina y 0,1 g de 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo). El 2,4-diamino-6-(metacrililoiloxi)etil-1,3,5-triazina es un análogo de la plantilla que contiene enlaces dobles polimerizables. Esta mezcla se purgó con nitrógeno y se polimerizó mediante UV (fuente de UV UVAPRINT 100 CVI con una intensidad de 0,163 W/cm², Dr. Hönle) durante 20 min. El polímero de afinidad resultante se molió y se tamizó en húmedo en metanol. Las partículas con un tamaño de 25 a 106 µm se recogieron y se lavaron durante 48 horas con metanol en un extractor Soxhlet y se empaquetaron en una columna Buchi B-685 de 230x15 mm.

b) Cromatografía de afinidad

[0046] Las fracciones purificadas del MIP sintetizado se cargaron en la columna de afinidad preparada como se ha descrito en el ejemplo 2a) y se eluyeron con acetonitrilo a una velocidad de flujo de 2 ml/min suministrada por una bomba de HPLC (Hewlett-Packard serie 1050). Después de 10 min, el eluyente se reemplazó por una solución de ácido acético al 0,05% en acetonitrilo para eluir el polímero de alta afinidad. El polímero MIP se limpió del ácido acético y de cualquier plantilla residual mediante una separación adicional por GPC como se ha descrito en el ejemplo 1. Los polímeros MIP y blanco se trataron de la misma manera.

Ejemplo 3. Inmovilización de los polímeros MIP y blanco sintetizados en fase sólida.**a) Preparación de la fase sólida (polímero TRIM) para la inmovilización.**

5 [0047] Una mezcla de 5 g de TRIM, 5 g de acetonitrilo y 0,1 g de 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) se purgó con nitrógeno y se polimerizó bajo UV (fuente de UV UVAPRINT 100 CVI con una intensidad de 0,163 W/cm², Dr. Hönle) durante 2,5 min para obtener un gran número de enlaces dobles sin reaccionar. El polímero resultante se molió y se tamizó en húmedo en metanol. Las partículas con un tamaño de 25 a 106 µm se recogieron y se lavaron durante 48
10 horas con metanol en un extractor Soxhlet. La gran cantidad de enlaces dobles disponibles (- 36%) permanecieron en el polímero según se confirmó mediante el análisis por FTIR.

b) Inmovilización de los polímeros MIP y blanco en el polímero TRIM

15 [0048] Se añadieron 4 ml de una solución de acetonitrilo/ agua (al 90/10%) que contenía 71 µg de partículas MIP con la fracción de tamaño de 90 kDa a 180 mg del polímero TRIM, preparado como se ha descrito anteriormente, en una botella de vidrio de 10 ml. La solución se desgaseó con nitrógeno durante un minuto y se colocó bajo UV durante 8 min. El análisis por HPLC de la fase líquida, realizado después de la exposición a UV, demostró que el
20 88,8% de las partículas MIP estaban inmovilizadas con una densidad del polímero inmovilizado de 0,35 mg/g de TRIM. Después, el polímero resultante se colocó en un tubo Phenomenex SPE y se lavó con 5 volúmenes de acetonitrilo con 1% de ácido acético y 20 volúmenes de acetonitrilo y se secó a 80°C durante 30 minutos. El procedimiento se repitió con partículas no impresas.

Ejemplo 4. Pruebas de afinidad

25 [0049] Se introdujeron 70 mg del polímero TRIM con las partículas MIP y blanco inmovilizadas en viales de HPLC de 2 ml. Se añadió al polímero 1 ml de solución de plantilla con una concentración que variaba entre 1 y 125 ng/ml y se incubó durante 12 horas. La concentración de la plantilla en la solución después de la incubación se analizó por HPLC-EM. Los resultados de los experimentos de unión para los polímeros MIP y blanco se usaron para calcular las
30 constantes de disociación mediante una gráfica del doble recíproco. De acuerdo con el cálculo, el MIP poseía una constante de disociación de $7,7 \times 10^{-8}$ M y una concentración de sitios de unión de $0,97 \times 10^{-6}$ moles/g. Para el polímero blanco se determinó una constante de disociación de $1,9 \times 10^{-5}$ M y una concentración de sitios de unión de $1,5 \times 10^{-5}$ moles/g.

35 [0050] Estos resultados demuestran claramente que el MIP sintetizado posee una afinidad sustancialmente mayor que el blanco (-250 veces).

Ejemplo 5. Prueba de selectividad

40 [0051] Se introdujeron 70 mg del polímero TRIM con las partículas MIP y blanco inmovilizadas en viales de HPLC de 2 ml. Se añadió al polímero 1 ml de solución de analitos con una concentración de 40 ng/ml y se incubó durante 12 horas. La concentración de analitos en solución después de la incubación se analizó por HPLC-EM. Los analitos ensayados incluían 6-metil-1,3,5-triazina-2,4-diamina (plantilla) y sus análogos: atrazina, metribuzina y simazina. En la tabla 1 se muestra la cantidad de cada compuesto adsorbida por el polímero en nmoles/g de polímero.

45 Tabla 1. Adsorción de los analitos por los polímeros MIP y blanco y su reactividad cruzada expresada en porcentaje de unión respecto al de la plantilla.

	Plantilla	Atrazina	Metribuzina	Simazina
MIP				
Unión, nmoles/g	1,62	0,12	0,11	0,07
Reactividad cruzada (%)	100	7,4	6,8	4,3
Blanco				
Unión, nmoles/g	0,41	0,35	0,21	0,18
Reactividad cruzada (%)	100	85	51	44

50 [0052] Los resultados muestran claramente que el polímero impreso posee una selectividad mucho mayor por la plantilla objetivo que por sus análogos estructurales.

Ejemplo 6. Dependencia del rendimiento del polímero del tiempo de irradiación

5 **[0053]** La mezcla de polimerización se preparó como se ha descrito en la sección Ejemplo 1 en ausencia de plantilla. Las alícuotas de la mezcla de monómeros se recogieron después de 0, 20, 60, 90, 150 y 170 s de irradiación UV, se diluyeron 200 veces en THF y se analizaron por GPC como se ha descrito en el ejemplo 1. Los resultados en la tabla 2 describen el rendimiento de la fracción predominante (3-100 kDa).

Tabla 2. Dependencia del rendimiento del polímero a diferentes tiempos de irradiación.

Tiempo de polimerización, s	Concentración de polímero, mg/ml
0	0
20	0
60	0,13
90	0,37
150	0,38
170	0,46

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de una solución o suspensión coloidal de un polímero, que presenta (i) un paso de síntesis que comprende la polimerización viva dirigida por plantilla de monómeros funcionales realizada en presencia de una plantilla, produciéndose de este modo un polímero complementario en el que al menos una parte es complementaria a al menos una parte de la plantilla, e incluyendo el paso la terminación de la polimerización viva cuando se hayan formado las partículas poliméricas complementarias adecuadas para la preparación de la solución o la suspensión coloidal; y (ii) un paso de separación que comprende proporcionar un medio cromatográfico con la plantilla inmovilizada y realizar con él una cromatografía de afinidad del producto del paso de síntesis para aislar una fracción de polímeros complementarios que presenten una afinidad específica por la plantilla.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento incluye un paso de modificación de las partículas poliméricas complementarias para producir partículas poliméricas derivadas en las que al menos una parte es complementaria a al menos una parte de la plantilla, para la preparación de la solución o la suspensión coloidal.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la técnica de polimerización viva se selecciona entre la polimerización con iniferter, la polimerización mediada por radicales libres estables, la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP) y la polimerización por adición, fragmentación y transferencia de cadena reversible (RAFT).
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la técnica de polimerización viva es una polimerización radicalaria mediada por nitróxido.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la técnica de polimerización viva es una polimerización con iniferter y el iniferter se selecciona entre:
foto-iniferters que llevan un grupo ditiocarbamilo; y
iniferters térmicos que llevan un grupo azo.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la polimerización viva se inicia mediante un iniciador seleccionado entre:
2-bromopropionitrilo con Cu(I)Br complejo con N,N,N",N",N"-pentametildietilentríamina;
macroiniciador de poliestireno bromado con Cu(I)Cl/PMDETA;
2-bromoisobutirato de etilo con CuCl/bipiridina;
dibromuro de 1,4-bis(2,6-diisopropilfenil)acenaftenodiimino-níquel(II);
2,2-dimetoxi-2-fenilacefenona en combinación con disulfuro de tetraetiltiuram;
tetrafenilbifosfina;
peróxidos terciarios (por ejemplo peróxido de di-terc.-butilo);
SmMe(C₅Me₅)₂ (THF);
epóxidos basados en estireno junto con TiCl₄;
tetrámero de metilestireno disódico;
MoOCl₄-n-BuSn-EtOH;
HCl/ZnCl₂;
p-toluenosulfonato de metilo;
2,10,15,20-tetrafenilporfinato de metilaluminio;
3-metil-1,1-difenilpentil-litio;
butil-litio en THF;
compuestos de molibdeno-alquilidino;
organolantánido(III) bifuncional;
Mo(CH-t-Bu)(NAr)(OCMe₃)₂;
Mo(CHCPhMe₂)(NAr)(OCMe(CF₃)₂)₂;
HI/I₂;
complejos de Zr, Ti y Hf combinados con metilaluminóxano o boratos de fenilo;
complejos diimido de Pd, Ni, Fe o Co;
complejos homogéneos de carbenos de Ta, Ti, Mo, W;
complejos de metales de tierras raras compuestos por complejos de tipo metaloceno o de tipo no metaloceno;
complejos catiónicos de acetamidinato de monociclopentadienilcirconio;

telómeros fluorados esterificados con uno o dos grupos hidroxilo; y
 $\text{Yb}[\text{C}(\text{SiMe}_3)_3]_2$.

- 5 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero complementario presenta un peso molecular de 500 a 1.000.000 Da.
- 10 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento incluye los pasos de: separar del sistema de polimerización un complejo que comprende la plantilla y el polímero complementario; y eliminar seguidamente la plantilla.
- 15 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la eliminación de la plantilla implica la separación de la plantilla del polímero por medio de una o más de las operaciones cambio de pH de la solución, cambio de la fuerza iónica de la solución y adición de urea, guanidina o una sustancia que interactúe con la plantilla más intensamente que el polímero.
- 20 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que para la eliminación de la plantilla se usa una o más de las operaciones filtración, electroforesis, separación cromatográfica, lavado, centrifugación y diálisis.
- 25 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la polimerización viva se realiza en una o más de las condiciones siguientes:
 i) una relación estequiométrica entre el iniciador y los monómeros;
 ii) enfriamiento de la reacción o detención de la irradiación de la reacción para terminar la formación de radicales después de un periodo de iniciación inicial que es más corto que la duración de la
 30 reacción de polimerización;
 iii) eliminación de los monómeros para que no sigan en contacto con el polímero complementario en crecimiento;
 iv) adición de inhibidores a la reacción; y
 v) una solución de reacción diluida.
- 35 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los monómeros funcionales se seleccionan entre:
 monómeros vinílicos;
 monómeros alílicos;
 acetilenos;
 acrilatos;
 metacrilatos;
 derivados de aminoácidos;
 40 nucleósidos;
 nucleótidos; y
 carbohidratos.
- 45 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la polimerización viva incluye los pasos de:
 a) polimerización viva dirigida por plantilla de un monómero funcional en presencia de una plantilla;
 b) detención de la polimerización;
 c) reiniciación de la polimerización en presencia de un monómero funcional diferente, produciéndose de este modo un polímero complementario que es un copolímero de bloques en el que al menos una
 50 parte es complementaria a al menos una parte de la plantilla; y
 d) repetición opcional de los pasos a) a c).
- 55 14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente el paso de la reticulación de los monómeros funcionales.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la reticulación se efectúa mediante uno o más agentes reticulantes seleccionados entre:
 dimetacrilato de etilenglicol;
 metilenbisacrilamida; y
 N,N'-bisacriloilpiperazina.

- 5 16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye el paso adicional de usar la solución o la suspensión coloidal para unir el polímero a una superficie, comprendiendo dicho paso adicional los pasos de: poner la solución o la suspensión coloidal de un polímero en contacto con una superficie; y reiniciar la polimerización viva para efectuar la reacción entre el polímero y la superficie.
- 10 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, que incluye el paso de usar dicho polímero unido a la superficie como ligando específico de receptor en la química analítica o para la realización de separaciones en biotecnología o en las industrias farmacéutica o alimentaria.
- 15 18. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que incluye el paso de usar la solución o suspensión coloidal de un polímero producida mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 15 o el polímero unido a la superficie producido mediante el procedimiento de la reivindicación 16 en la preparación de un fármaco.
- 20 19. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que incluye el paso de usar la solución o suspensión coloidal de un polímero como ligando específico de receptor en la química analítica o en la realización de separaciones en biotecnología o en las industrias farmacéutica o alimentaria.
- 20 20. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que incluye el paso de usar la solución o suspensión coloidal de un polímero como agente de contraste, catalizador o elemento sensor.

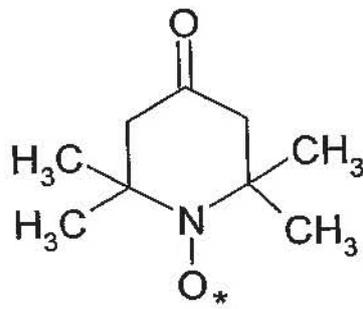
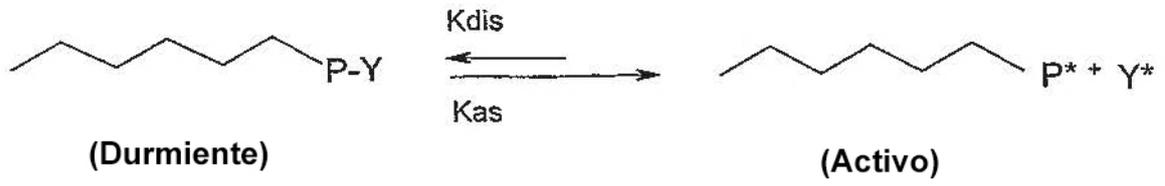


Fig. 1

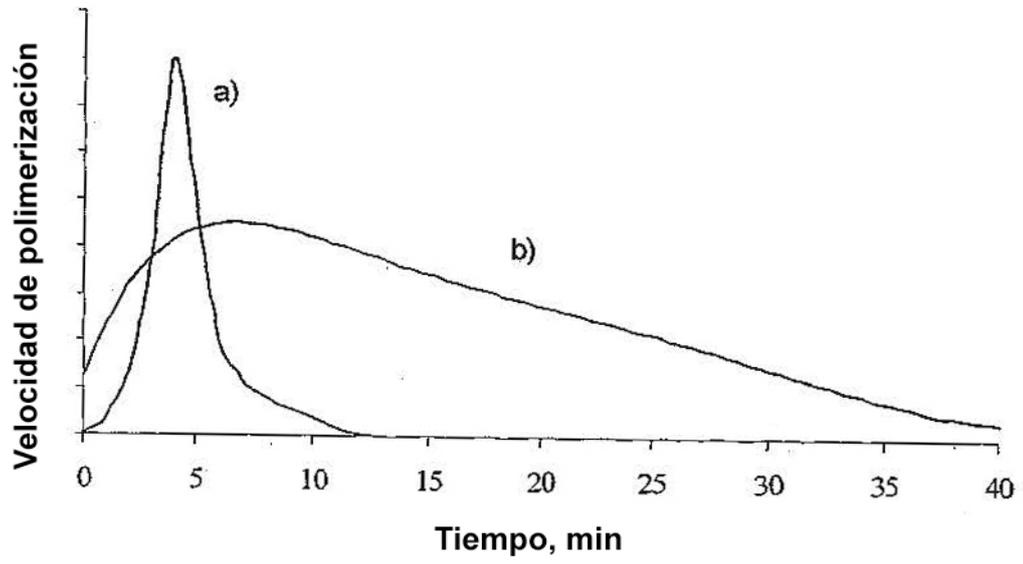


Fig. 2