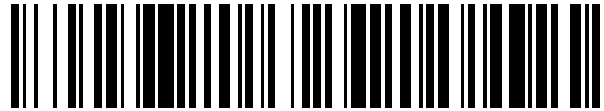


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 302**

51 Int. Cl.:

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 19/12 (2006.01)

C08F 293/00 (2006.01)

C08F 2/46 (2006.01)

C08F 2/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12780259 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2758164**

54 Título: **Fotorreactor y proceso para preparar nanopartículas de MIP**

30 Prioridad:

21.09.2011 GB 201116312

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

17.05.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PILETSKY, SERGEY;
PILETSKA, OLENA;
GUERREIRO, ANTONIO;
WHITCOMBE, MICHAEL y
POMA, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 570 302 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

Fotorreactor y proceso para preparar nanopartículas de MIP.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a nuevos procesos para producir nanopartículas hechas de polímeros impresos molecularmente.

10 **Antecedentes en la técnica**

La expresión "síntesis dirigida por plantilla" 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 una plantilla que sirve como patrón para la formación de la nueva estructura. Un ejemplo específico es la "impresión molecular", basada en la polimerización de monómeros vinílicos o acrílicos en presencia de una plantilla o plantillas (véanse las referencias 1, 2). El enfoque tradicional implica la producción de polímeros impresos altamente reticulados, que son insolubles en disolventes acuosos y orgánicos. Debido a su insolubilidad inherente, la posibilidad de usar polímeros impresos molecularmente (MIP) en farmacología y medicina es restringida. Recientemente, se han realizado varios intentos de desarrollar protocolos para la preparación de polímeros impresos con pesos moleculares relativamente bajos que podrían existir en formas solubles o al menos coloidales. Este formato permitirá que se usen los polímeros como moléculas biológicamente activas (fármacos, efectores, moduladores, inhibidores) en farmacología y medicina, y como "anticuerpos plásticos", que reemplacen moléculas biológicas en sensores y en separación por afinidad y como catalizadores con propiedades de tipo enzimático.

Una forma de sintetizar MIP insolubles es mediante polimerización controlada. La polimerización controlada se define aquí como un proceso que conduce a la formación de fracciones solubles de polímeros con una distribución relativamente reducida de tamaños moleculares. Algunos ejemplos habituales de polimerización controlada emplean polimerización viva, como se describe posteriormente.

Las técnicas de polimerización viva por radicales libres, tales como polimerización mediante *iniferter*, polimerización radicalaria mediada por nitróxido, polimerización radicalaria de transferencia de átomo (ATRP) y polimerización de transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible (RAFT), abren nuevas rutas para la síntesis de polímeros con pesos moleculares relativamente controlados (véanse las referencias 3-9). Las técnicas de polimerización controlada/viva se basan en un delicado equilibrio entre especies durmientes y activas que reduce de forma eficaz la concentración de las entidades de propagación en el sistema y minimiza el grado de terminación. La polimerización viva podría estar exenta de reacciones secundarias tales como terminación y transferencia de cadena y de ese modo puede generar polímeros con distribuciones de peso molecular y estructuras bien definidas. Se puede aplicar el mismo enfoque a la formación de copolímeros, haciendo posible de ese modo producir copolímeros en bloque mediante polimerización por radicales libres mediante la secuenciación apropiada de las adiciones de monómero. La polimerización viva se ha usado anteriormente en la producción de MIP con injertos voluminosos (véanse las referencias 10, 11). También se han producido polímeros solubles mediante polimerización viva y se han usado posteriormente en la producción de MIP (véase la referencia 12). Recientemente, se ha usado la polimerización viva controlada para la preparación de nanopartículas de MIP (13).

Una de las complicaciones de la síntesis de MIP es la frecuente necesidad de usar plantillas que son caras y/o difíciles de obtener, tales como proteínas, algunas toxinas, etc. Tales plantillas también son difíciles de recuperar después de la polimerización y limitan la cantidad de MIP que se puede obtener. De forma ideal, la plantilla debería ser capaz de reutilizarse para superar estas limitaciones. La forma óptima de conseguir esto es mediante el uso de la plantilla en una forma inmovilizada. La plantilla inmovilizada se ha usado anteriormente (véase el documento de Patente US 7393909). Aquí, la plantilla se inmovilizó sobre una superficie de sílice y a continuación se formó el polímero en los poros alrededor de la misma. Mediante la disolución del soporte de sílice y la retirada de la plantilla, se obtuvieron MIP de diversas morfologías. En todos los ejemplos que se desvelan en el documento de Patente US 7393909, la superficie que porta la plantilla inmovilizada se pierde durante el proceso de disolución y no se puede reutilizar. En otros ejemplos, se usaron plantillas inmovilizadas para la producción de superficies impresas (documentos de Patente US 6127154; US 6458599; US 7288415). Potencialmente, las superficies que portan plantillas que se desvelan en estos informes se pueden regenerar y usar varias veces más. Estos enfoques se pueden usar para la producción de sensores o matrices, pero serían difíciles de adaptar para la producción de nanopartículas o moléculas solubles de pequeño tamaño.

Otro problema principal más asociado a los MIP es la heterogeneidad de los sitios de unión producidos, que es generalmente responsable de altos niveles de unión no específica. Este problema se ha solucionado mediante la separación por afinidad de nanopartículas de MIP en una columna que porta una especie o plantilla diana inmovilizada después de su producción (13). Está claro que para que sea posible la separación por afinidad, los MIP deberían estar en una forma adecuada, preferentemente en forma de nanopartículas.

65

Una invención reciente aborda los problemas relacionados con el desarrollo de nanopartículas de MIP reticuladas de alto rendimiento al desvelar una combinación de dos técnicas: (i) llevar a cabo una polimerización controlada, opcionalmente polimerización radicalaria controlada, en presencia de una superficie o superficies que portan una plantilla inmovilizada para formar nanopartículas impresas y (ii) retener las nanopartículas mediante interacción por afinidad con la plantilla inmovilizada con fines de selección y purificación. De ese modo, el documento anterior de solicitud WO 2011/067563 de los presentes solicitantes desvela un proceso para la preparación de un polímero impreso molecularmente ("MIP") en forma de una solución o suspensión coloidal de partículas de MIP, que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una sustancia portadora que tiene un material de plantilla inmovilizado sobre ella a fin de que se exponga en una superficie;
- (b) proporcionar una composición polimerizable en contacto con dicha superficie;
- (c) efectuar una polimerización controlada de dicha composición polimerizable en contacto con dicha superficie, preferentemente mediante un proceso de polimerización radicalaria viva, terminándose dicha polimerización cuando se han formado partículas de MIP capaces de formar una solución o suspensión coloidal; y
- 15 (d) separar dichas partículas de MIP de dicha superficie. Esto puede ir seguido por una etapa de purificación (e) en la que (i) una solución o suspensión que contiene dichas partículas de MIP separadas se pone en contacto con una sustancia portadora que tiene dicho material de plantilla inmovilizado sobre ella a fin de que se exponga en una superficie, de modo que dichas partículas de MIP se unen a dicho material de plantilla inmovilizado, (ii) el material no unido se separa de dicha sustancia portadora; y posteriormente (iii) se recuperan las partículas de MIP del material de plantilla inmovilizado para formar una solución o suspensión coloidal purificada.

Se puede encontrar material de apoyo en las siguientes referencias.

- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 15. Shim, S.E. *et al.* Macromolecules. 2003, 36, 7994-8000.
- 16. Yu, Q.; Zeng, F.; Zhu S. Macromolecules. 2005, 34, 1612.

Patentes citadas

Patente número	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		30-Oct-2007	COMPOSITIONS AND METHODS FOR CAPTURING ISOLATING DETECTING ANALYZING AND QUANTIFYING MACROMOLECULES
WO2011/067563	PCT	9-Jun-2011	PREPARATION OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS

Divulgación de la invención

La presente invención proporciona un proceso para producir nanopartículas de polímeros impresos molecularmente que comprende:

- (i) inmovilizar una especie de plantilla sobre un soporte sólido para proporcionar un material de plantilla soportado;
- (ii) ubicar el material de plantilla soportado en un recipiente de reacción que tiene uno o más puertos de entrada de flujo, uno o más puertos de salida de flujo, un refrigerador/calentador adaptado para afectar la temperatura de los contenidos del recipiente, y una fuente de radiación adaptada para irradiar el interior del recipiente;
- (iii) hacer pasar una composición polimerizable al recipiente a través de uno o más de dichos puertos de entrada de fluido;
- (iv) hacer que la fuente de radiación irradie el interior del recipiente para efectuar la polimerización controlada de la composición polimerizable, mientras se usa el refrigerador/calentador para controlar la temperatura de la misma;
- (v) suspender la irradiación en una etapa en la que la polimerización haya generado partículas con pesos moleculares en el intervalo de 500-1.000.000 Da, estando unidas al menos algunas de las nanopartículas a la plantilla inmovilizada;
- (vi) hacer pasar disolvente a través del recipiente mediante uno o más de dichos puertos de entrada y uno o más de dichos puertos de salida para retirar por lavado los componentes sin reaccionar de la composición polimerizable y los polímeros no unidos; y
- (vii) hacer pasar disolvente a través del recipiente mediante uno o más de dichos puertos de entrada y uno o más de dichos puertos de salida en condiciones tales que al menos algunas de dichas nanopartículas unidas se separen de la plantilla inmovilizada y salgan del recipiente a un recipiente de recogida, comprendiendo dichas condiciones una o más de temperatura aumentada producida por el refrigerador/calentador, y el uso de una composición de disolvente que es capaz de interrumpir la unión de las nanopartículas a la plantilla.

El proceso puede emplear un fotorreactor con un recipiente de reacción controlado termostáticamente que contiene la plantilla inmovilizada, lámparas para irradiar dicho recipiente y un sistema fluido para suministrar la mezcla de monómeros y la recogida de las nanopartículas sintetizadas, preferentemente cuando la operación del equipo se lleva a cabo con control de computadora.

Los presentes inventores han descubierto que el control cuidadoso de los parámetros de reacción es crucial en el éxito y la producción consistente de MIP formados en nanopartículas útiles.

En primer lugar, los presentes inventores han descubierto que el control cuidadoso del tiempo de irradiación es vital. La Figura 1 muestra algunos resultados experimentales, que muestran la forma en que el tiempo de reacción afecta a (a) el diámetro de las partículas de producto, y (b) el rendimiento. Mientras que el rendimiento aumenta de forma bastante constante con el tiempo, el diámetro aumenta con bastante lentitud al principio, hasta un valor de aproximadamente 60 nm a 3,5 minutos, y a continuación aumenta con mucha rapidez hasta aproximadamente 375 nm a 4,5 minutos. Dado que los presentes inventores también han descubierto que la afinidad de las nanopartículas de MIP muestra un pico a aproximadamente 60 nm, está claro que el control preciso de los parámetros es crítico para conseguir un proceso de fabricación práctico.

En un aspecto de la invención propuesta, se producen los MIP en el fotorreactor en presencia de una plantilla inmovilizada usando polimerización controlada, opcionalmente polimerización fotoquímica radicalaria controlada. El tipo preferente de la reacción explorada en la presente invención es polimerización radicalaria viva basada en *iniferter*, iniciada y controlada mediante irradiación UV. La reacción de polimerización se termina en una etapa en la que el tamaño de las moléculas sintetizadas es relativamente pequeño. El producto de tal proceso existe en forma soluble o coloidal estable en solución o suspensión. Las suspensiones coloidales o las soluciones de MIP de acuerdo con la presente invención pueden estar en líquidos acuosos u orgánicos.

La luz inicia la formación de radicales y la propagación de la reacción de polimerización. La energía luminosa utilizada en la presente invención es luz ultravioleta ("UV") o luz visible. Sin embargo, la energía luminosa también puede ser de banda ancha, suministrada por cable de fibra óptica o mediante una unión de reflectancia total atenuada (ATR).

5 En otro aspecto de la presente invención, se pueden unir selectivamente partículas de alta afinidad a (y posteriormente recuperar de) superficies que portan la plantilla inmovilizada, permitiéndolas que se separen de las partículas de baja afinidad. Las superficies que portan la plantilla inmovilizada pueden ser las mismas superficies que se usan en el recipiente del fotorreactor o pueden ser superficies distintas (por ejemplo, contenidas en una columna distinta) con la diana inmovilizada, que puede ser un análogo de, o idéntica a, la plantilla. Las superficies mencionadas aquí pueden ser superficies de columnas de afinidad, perlas, fibras, pocillos, microplacas, membranas, filtros, fosos, nanoestructuras, vesículas, cápsulas, muestras de tejidos, células vivas, etc. La superficie puede ser sólida, semisólida o líquida o fluida (como en el caso de micelas o interfases). Opcionalmente, las partículas se pueden analizar sistemáticamente además usando una columna o columnas adicionales, para seleccionar una subfracción de las partículas que no poseen afinidad por un compuesto interferente potencial, alternativamente se puede emplear un enfoque similar para seleccionar una subfracción o subfracciones de partículas que además tengan afinidad por uno o más análogos de la plantilla con el fin de producir aglutinantes "selectivos de clase".

20 Otro aspecto de la presente invención describe una aplicación de las nanopartículas de MIP sintetizadas. Las moléculas sintetizadas como se describe en la presente invención (dímeros, oligómeros, polímeros, o sus mezclas) se pueden usar como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptor en química analítica (sensores, ensayos), para separación en las industrias de biotecnología, farmacéutica y alimentaria y como catalizadores en síntesis o como reemplazos para enzimas en ensayos, sensores y otras aplicaciones tales como polvos de lavado.

25 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de irradiación y el diámetro de partícula (nm) o el rendimiento de polímero (mg).

30 La **Figura 2** es una vista esquemática de un fotorreactor usado para la síntesis de nanopartículas de MIP.

La **Figura 3** es una imagen de SEM de nanopartículas de MIP producidas en el fotorreactor.

Descripción detallada

35 La presente invención es un proceso sintético, llevado a cabo generalmente en un fotorreactor. Específicamente, un aspecto de la presente invención se refiere a la síntesis de MIP en el fotorreactor mediante polimerización controlada, opcionalmente polimerización radicalaria viva (LRP) controlada en presencia de una plantilla inmovilizada que puede ser un receptor biológico, ácido nucleico, 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 de enfermedad, toxina, pesticida, herbicida, explosivo, agente nervioso, contaminante, compuesto de alteración endocrina, nucleótido, nucleósido, oligonucleótido, metabolito, metabolito secundario, metabolito de fármaco, compuesto intermedio de fármaco o fármaco u otra clase de plantilla conocida por los expertos en la materia. La plantilla se puede inmovilizar sobre superficies poliméricas, de polisacárido o de vidrio, por ejemplo en forma de perlas, la superficie de guías de ondas, fibras, incluyendo fibras ópticas, membranas, capilares y cualquier otra superficie adecuada para la aplicación destinada, como conocen los expertos en la materia.

50 Se pueden emplear diversas formas diferentes de polimerización controlada en la presente invención. Todas se basan en la capacidad de controlar la reacción de adición a un nivel tal que se formen principalmente nanopartículas solubles en lugar de capas o redes de polímero continuas. En el ejemplo de la polimerización radicalaria viva, las moléculas de iniciador emprender transformaciones reversibles mediante estímulos fotoquímicos, transformando irreversiblemente especies durmientes en radicales libres o iones reactivos que actúan como propagadores de cadena. Para que se cumpla esta condición, las constantes de equilibrio de las reacciones deberían favorecer la formación de las especies durmientes y deberían permitir un rápido intercambio entre las especies durmientes y de propagación. De ese modo, las concentraciones de las especies de propagación serían muy bajas y sus tiempos de residencia muy cortos, lo que reduce la probabilidad de reacciones secundarias que conduzcan a la terminación de la cadena del polímero en crecimiento. Algunos ejemplos de polimerización viva incluyen polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización radicalaria de transferencia de átomo (ATRP) y polimerización de transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible (RAFT). La polimerización RAFT se basa en el equilibrio de transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible, donde existe un intercambio entre especies activas y durmientes. Los radicales generados en la etapa de iniciación se propagarán por adición de monómero hasta que encuentren una molécula, capaz de actuar como agente de transferencia de cadena, y a la que se pueden añadir de forma reversible. Generalmente, los procesos de polimerización viva permiten 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. Los *iniferters* pueden ser foto-*iniferters* que portan un grupo ditiocarbamilo o *iniferters* térmicos que portan grupos carbono-carbono o azoicos (véase, por ejemplo, la referencia

14) u otros tipos de compuesto conocidos por los expertos en la materia. El tipo preferente de *iniferters* es el que produce radicales diferentes, un radical de carbono que es reactivo y otro radical menos reactivo, por ejemplo, un radical ditiocarbamilo. El radical de carbono, que es por lo general un radical bencilo, puede reaccionar con un monómero insaturado para iniciar la polimerización. El radical menos reactivo, por ejemplo el radical ditiocarbamilo, puede terminar la polimerización por recombinación con una cadena de polímero en crecimiento. Sin embargo, el producto de terminación se puede disociar además en un nuevo radical de propagación y un terminador en respuesta a la aplicación continuada del estímulo, por ejemplo irradiación UV (véase, por ejemplo, la referencia 15).

Una ventaja de la polimerización viva a diferencia de la polimerización radicalaria tradicional es que la primera transcurre a baja velocidad y sin ninguna autoaceleración observable, mientras que la segunda transcurre frecuentemente con una fuerte autoaceleración (véase, por ejemplo, la referencia 16). La presente invención aprovecha esto llevando a cabo la polimerización viva en condiciones que favorecen la formación de polímeros con un peso molecular relativamente bajo. Por lo general, la reacción se detiene en una etapa temprana para producir polímeros con pesos moleculares de 500-1.000.000 Da.

La presente invención facilita la optimización de las condiciones de la reacción con el fin de 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. Alternativamente, se puede controlar la velocidad de formación de radicales y de propagación por adición de inhibidores de reacción o agentes de transferencia de cadena tales como mercapto derivados.

Los iniciadores de 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, carboxílico o amino se pueden convertir en un iniciador, e incorporar fácilmente de ese modo al polímero. Esto puede ser en el extremo terminal del polímero en el caso de un iniciador monofuncional, o en la parte media 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 se limitan a: (i) usar una proporción estequiométrica entre el iniciador y los monómeros; (ii) refrigerar la reacción o retirar la fuente de UV u otra irradiación, lo que pondrá fin a la formación de nuevas especies de propagación en una etapa temprana de la reacción; (iii) retirada de los monómeros del contacto con la cadena de polímero en crecimiento, por ejemplo, por filtración o cromatografía; (iv) añadir inhibidores a la reacción; (v) llevar a cabo la polimerización en una solución muy diluida; (vi) añadir agentes transferencia de cadena. La opción preferente sería la retirada de la fuente de irradiación o su interrupción. Alternativamente, se pueden retirar los monómeros y otros reactivos del MIP en crecimiento unido a la plantilla inmovilizada por elución. Como resultado de la polimerización viva controlada, se pueden formar partículas de MIP en un intervalo de tamaño de 500-1.000.000 Da, que podrían existir en formas solubles o al menos coloidales después de la separación de la plantilla inmovilizada.

En la presente invención, los monómeros que se pueden usar para la preparación de MIP incluyen: monómeros vinílicos, monómeros alílicos, acetilenos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, cloroacrilatos, itaconatos, trifluorometacrilatos, derivados de aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, y carbohidratos. La polimerización se puede llevar a cabo en presencia o sobre la superficie de partículas que contienen enlaces dobles. Los monómeros de reticulación se usan para fijar o estabilizar la estructura del polímero resultante, de modo que permanezca complementaria a la de la plantilla. Algunos ejemplos habituales de reticuladores adecuados para la síntesis de MIP incluyen, pero no se limitan a, etilenglicol, dimetacrilato, trimetacrilato de trimetilolpropano, divinilbenceno, metilénbisacrilamida, etilénbisacrilamida y N,N'-bisacriloilpiperazina. La función de los agentes de reticulación se puede llevar a cabo mediante partículas o polímeros precursores que contienen enlaces dobles, o partículas o polímeros con funcionalidades múltiples unidas que se pueden unir a monómeros funcionales. Los expertos en la materia podrían seleccionar monómeros y reticuladores adecuados para un sistema particular. Alternativamente, se podría usar diversos métodos combinatorios y computacionales para ayudar a esta selección.

Las nanopartículas sintetizadas tienen mayor afinidad por la plantilla inmovilizada que los monómeros, los oligómeros no específicos y los polímeros de baja afinidad (por ejemplo, los formados en el volumen de reacción en ausencia de la plantilla). De ese modo, en un aspecto de la invención propuesta, se retira el material unido débilmente de las nanopartículas unidas a la plantilla inmovilizada por lavado. La separación de las nanopartículas de alta afinidad de la plantilla inmovilizada se puede conseguir por calentamiento, lo que interrumpe la formación de complejos, por cambio del pH de la solución, cambio de la fuerza iónica, o mediante la adición de urea, guanidina, u otra sustancia o sustancias que interaccionen con la plantilla más fuertemente que el polímero.

Los procesos de la presente invención se llevan a cabo preferentemente usando un reactor que proporciona un entorno adecuado y controlado para la síntesis de las nanopartículas de MIP. Incluyen adecuadamente un sistema fluido que comprende depósitos de fluido, bombas, válvulas, tuberías, fritas y conectores para suministrar monómeros y disolventes, y para la elución de los productos secundarios, materiales sin reaccionar o para recogida de las nanopartículas sintetizadas. Opcionalmente, el suministro de reactivos, el lavado y los procesos de elución, así como la temperatura en el interior del reactor y el tiempo de irradiación se controlan por computadora. Un

ejemplo no restrictivo de tal reactor se presenta en la Figura 1.

El recipiente 10 de reacción puede estar hecho de vidrio, cuarzo, o plástico, o una combinación de dos o más de estos materiales, con la condición de que la transparencia a la luz en la longitud de onda requerida sea adecuada para iniciar la polimerización dentro del recipiente. La ruta por la que entra la luz en el recipiente reactor puede ser desde una dirección o desde todas las direcciones; alternativamente, la fuente 12 de luz se puede ubicar en el interior del recipiente de reacción o en un compartimento transparente dentro del recipiente de reacción o la luz se puede canalizar al recipiente de reacción a través de una o más fibras ópticas o guías de ondas. En los casos en los que la fuente 12 de luz se ubica en el interior del recipiente 10 de reacción o en un compartimento transparente dentro del recipiente de reacción o la luz se puede canalizar al recipiente de reacción a través de una o más fibras ópticas o guías de onda, no existe ningún requisito general para que el recipiente de reacción sea transparente, aparte de la conveniencia de poder inspeccionar visualmente los contenidos del reactor, de modo que se puede usar una mayor diversidad de materiales, incluyendo materiales metálicos, cerámicos, materiales compuestos reforzados con fibras, PTFE u otros materiales no transparentes.

La polimerización se inicia por irradiación, preferentemente por irradiación con luz UV o visible y normalmente dura minutos u horas dependiendo de la reactividad de las especies. La luz inicia la formación de radicales y propaga la reacción de polimerización. La energía luminosa utilizada en la presente invención es luz ultravioleta ("UV") o luz visible. Sin embargo, la energía luminosa también puede ser de banda ancha, suministrada mediante cable de fibra óptica o mediante unión de reflectancia total atenuada (ATR). A este respecto, el fotorreactor de la Figura 1 incluye una ventana transparente o una guía de ondas para la entrada de energía luminosa desde una fuente de luz tal como, por ejemplo, una lámpara ultravioleta. La irradiación también se puede suministrar desde el interior del reactor a través de cable de fibra óptica o una guía de ondas.

El recipiente fotorreactor 10 se diseña para contener una fase sólida 14 que porta una plantilla inmovilizada. La fase sólida 14 puede estar en forma de perlas (empaquetadas, o de relleno laxo), membranas o fibras. Las perlas podrían se estacionarias o se podrían agitar durante la duración de parte o la totalidad del proceso de fabricación de MIP. El recipiente reactor contiene uno o más puertos 16 de entrada, cada uno equipado opcionalmente con una válvula antirretorno y una frita para retener la fase sólida dentro del recipiente reactor, para el suministro de monómeros y disolventes de lavado y un puerto 18 de salida, equipado opcionalmente con una válvula antirretorno y una frita para retener la fase sólida dentro del recipiente reactor, para la elución de reactivos, monómeros sin reaccionar y nanopartículas sintetizadas, conectada a través de una válvula de conmutación 20 para dirigir el flujo a un depósito 22, 24, 26 de recogida apropiado para la recogida de residuos o de producto. La operación y el uso de este equipo se describen más particularmente más adelante.

La mezcla de monómeros, que comprende el monómero o monómeros funcionales, el iniferter, el reticulador o reticuladores y el agente de transferencia de cadena o agentes de transferencia de cadena opcionales, disueltos en un disolvente apropiado, habiéndose seleccionado dicha mezcla de monómeros con el fin de optimizar las interacciones plantilla-monómero, se inyecta en el recipiente reactor que contiene la plantilla inmovilizada, como se ha definido anteriormente. El proceso de polimerización comienza cuando los contenidos del recipiente de reacción alcanzan una temperatura predeterminada, preferentemente una temperatura baja (por lo general entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por irradiación de los contenidos del recipiente con UV o con luz visible. Las nanopartículas se forman en solución y sobre la superficie que porta la plantilla inmovilizada. La reacción se termina al interrumpirse la irradiación. Los monómeros sin reaccionar, los polímeros formados parcialmente y las partículas con baja afinidad por la plantilla se retiran a continuación por lavado con un disolvente de lavado que puede ser igual o diferente que el usado en la mezcla de monómeros. El flujo o efluente de la columna que comprende los lavados se dirige mediante la válvula de conmutación a un depósito (26) de residuos adecuado. La temperatura del recipiente de reacción se aumenta a entre $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, punto en el que las nanopartículas de MIP de baja afinidad se eluyen mediante flujo continuado del disolvente de lavado. Finalmente, las nanopartículas de MIP de alta afinidad deseadas se recogen por aumento de la temperatura del recipiente de reacción a entre $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y elución de los contenidos del recipiente con un disolvente de elución, que puede ser el mismo disolvente que el disolvente de lavado o un disolvente diferente, que contiene opcionalmente uno o más compuestos como aditivos con el fin de facilitar la elución de las nanopartículas. El flujo del disolvente que contiene nanopartículas eluido se dirige mediante la válvula de conmutación a un recipiente o recipientes 22, 24 adecuados para la recogida del producto o productos de reacción. La elución de las nanopartículas también se puede facilitar y/o controlar mediante el cambio del pH del disolvente de elución o mediante la adición de compuestos ácidos, básicos o tensioactivos o mediante la adición de compuestos que interrumpen de otro modo la unión entre la plantilla y las nanopartículas de MIP. Una forma conveniente de monitorizar la temperatura dentro del recipiente de reacción es mediante el uso de uno o más termopares 28. El calentamiento y la refrigeración de la mezcla de monómeros en el reactor se puede conseguir usando un control termostático (opcionalmente con líquido circulante) 30 o mediante el uso de elementos Peltier.

Los beneficios que surgen de este enfoque son numerosos, incluyendo la posibilidad de reutilizar la plantilla inmovilizada para la síntesis de MIP, la posibilidad de fraccionar los MIP con partículas de alta afinidad de partículas de baja afinidad y monómeros sin reaccionar, la fácil retirada de los MIP sintetizados de la plantilla, la capacidad de funcionalizar posteriormente los MIP mientras aún están unidos a la plantilla inmovilizada, la capacidad de automatizar total o parcialmente el proceso de fabricación, etc. Otros beneficios de la invención deberían ser

evidentes para los expertos en la materia.

En un tipo preferente de realización de la presente invención, la separación y la purificación de las nanopartículas de MIP sintetizadas se consigue en la misma fase sólida que porta la plantilla inmovilizada que se usa para el proceso de impresión. La separación se basa en las interacciones por afinidad entre las nanopartículas de MIP sintetizadas y las moléculas de plantilla inmovilizada. Las partículas con baja afinidad se podrían retirar de la fase sólida por lavado en condiciones suaves (opcionalmente a una temperatura entre -20 °C y + 40 °C y en ausencia de agentes de interrupción de complejos, cambios de pH, etc.). Las nanopartículas de MIP específicas con alta afinidad por la plantilla se pueden retirar por recogida a temperatura elevada, por cambio de pH o mediante el uso de agentes interruptores de complejos o disolventes o combinaciones de mezclas de los mismos.

Las nanopartículas de MIP de alta afinidad sintetizadas se pueden purificar además por cromatografía, filtración y/o electroforesis. La separación del polímero sintetizado se puede conseguir mediante cromatografía por afinidad, o elución selectiva, cuando se usa la unión de las nanopartículas a una plantilla inmovilizada o un compuesto diana iguales o similares para la purificación de una fracción de partículas de polímero con la más alta afinidad por la plantilla, y/o mediante cromatografía de permeación en gel (cromatografía por exclusión de tamaño) que permite que se separen fracciones de polímero de diferente tamaño. El fraccionamiento, separación y purificación durante la separación por afinidad se consigue por lavado y elución usando tampones con diferente pH, fuerza iónica, o mediante la adición de ácidos, bases, agentes tensioactivos, urea, guanidina, u otra sustancia o sustancias que interactúen con la plantilla más fuertemente que el copolímero. Alternativamente, el fraccionamiento de partículas con alta afinidad se puede conseguir por filtración, electroforesis, separación cromatográfica, lavado, centrifugación o diálisis. En particular, la cromatografía por afinidad es una herramienta poderosa, y es particularmente preferente, debido a que permite la preparación de MIP con una distribución reducida de afinidades por la plantilla.

La separación por afinidad se puede usar además para seleccionar una subfracción de partículas con alta afinidad por la estructura diana o plantilla, pero que tiene baja afinidad por uno o más compuestos interferentes mediante la selección de una fracción que se una a la primera pero no a los últimos. Se pueden seleccionar subfracciones adicionales que tengan propiedades de unión amplias o específicas de clase mediante la selección de fracciones con alta afinidad por la estructura diana o plantilla, pero que también muestran alta afinidad por uno o más análogos estructurales de la plantilla o la diana, que comprenden ejemplos representativos de la clase de compuestos para los que se requieren aglutinantes.

Las realizaciones de la presente invención también pueden incluir modificaciones posteriores de las nanopartículas sintetizadas. Las nanopartículas de MIP sintetizadas se pueden modificar con otro polímero o polímeros, lineales o reticulados, o se modifican con un compuesto o compuestos que portan un grupo o grupos funcionales específicos con la intención de introducir una o más propiedades específicas en los MIP para modificar sus características de solubilidad o su biocompatibilidad, facilitar su extracción u otra forma de separación, permitir su detección, introducir una funcionalidad de reconocimiento o catalítica adicional, que incluye, pero no se limita a, una segunda etapa de impresión molecular, unión a ciclodextrina, éter corona, calixareno, o curcubiturilo u otros grupos supramoleculares de unión o catalíticos, unir moléculas de colorante, opcionalmente colorantes fluorescentes, ligandos de unión a metales, profármacos, antibióticos, agentes inmunoestimulantes, bioligandos, etc., preferentemente por reactivación de grupos *iniferter* unidos a la superficie o mediante su modificación química selectiva, preferentemente mientras las nanopartículas de MIP aún están unidas a la fase de plantilla inmovilizada. Un ejemplo de esto podría ser la formación de polímeros lineales de uno o más monómeros hidrófobos, de modo que se formen "colas" hidrófobas que permitirían, por ejemplo, la extracción del polímero de una solución acuosa mediante un disolvente orgánico o la localización de una nanopartícula de MIP en una interfase acuosa-orgánica. Sería posible introducir grupos de unión específicos, por ejemplo, biotina, que permitirían la retirada selectiva del polímero mediante un adsorbente de afinidad o para permitir la unión a la superficie de un biosensor, tal como un dispositivo sensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) o un sensor acústico, un electrodo o cualquier otro dispositivo sensor conocido por los expertos en la materia. Los expertos en la materia estarán familiarizados con la abundancia de protocolos experimentales que permiten que se lleven a cabo esta modificación y la correspondiente separación. Preferentemente, la modificación se consigue en el recipiente fotorreactor directamente en la superficie mientras el polímero está unido a la plantilla inmovilizada o por separado o después de se hayan llevado a cabo las etapas adicionales de separación y/o purificación, como se describe en el ejemplo previo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a polimerización secuencial cuando el polímero impreso se modifica con otros tipos de moléculas con el fin de cambiar las propiedades o funciones de las partículas sintetizadas. Ya se ha mencionado que las nanopartículas de MIP se pueden modificar con otro polímero o grupo funcional para facilitar su separación. Una propiedad importante de la polimerización viva es la capacidad de detener la reacción y continuarla posteriormente deteniendo simplemente la reaplicación, por ejemplo, de irradiación UV a la mezcla de reacción. El extremo de la cadena del polímero en crecimiento contiene una especie de iniciador que se puede reactivar para iniciar una nueva ronda de polimerización. De ese modo, los extremos durmientes de la cadena de polímero se podrían exponer a otro monómero o mezcla de monómeros y continuar la polimerización, dando como resultado la formación de polímeros o copolímeros lineales o reticulados injertados en la superficie de la nanopartícula reticulada, y además se pueden introducir dos o más soluciones de monómeros e irradiar secuencialmente con el fin de injertar arquitecturas de copolímero en bloque. El nuevo monómero o monómeros

pueden introducir nuevas funcionalidades en las partículas de polímero. De ese modo, además de la afinidad por la primera plantilla, proporcionada por el primer MIP, se podría producir un polímero extendido con afinidad por una segunda plantilla introducida en el sistema o con funcionalidad catalítica mediante la impresión de un análogo de estado de transición. El polímero, copolímero o copolímero en bloque injertado extendido podría tener marcas fluorescentes unidas a los grupos extremos, lo que sería útil en diagnóstico. También son posibles otros tipos de modificación que introducirían otras funcionalidades tales como la capacidad de generar especies activas con propiedades biocidas, grupos catalíticos, etiquetas isotópicas, grupos útiles para inmovilización, detección, formación de imágenes (por ejemplo, agentes de contraste), etc. Estas funcionalidades también se podrían introducir en el polímero mediante el uso del iniciador funcionalizado de forma correspondiente. La modificación se puede conseguir directamente en la superficie mientras la partícula está unida a la plantilla inmovilizada o por separado o después de se hayan llevado a cabo las etapas adicionales de separación y/o purificación, como se describe en el ejemplo previo.

La presente invención también se preocupa de las aplicaciones de las nanopartículas sintetizadas. Estas incluyen aplicaciones de las partículas sintetizadas como fármacos en farmacología y medicina, como ligandos específicos de receptores en química analítica (sensores, ensayos), para separaciones en biotecnología, farmacología y la industria alimentaria y como catalizadores. La naturaleza soluble de los polímeros sintetizados los hace candidatos ideales para su uso como fármacos. La unión selectiva a una enzima, receptor u otra molécula biológica se podría usar para afectar las funciones biológicas de estas moléculas. De ese modo, los MIP sintetizados mediante polimerización viva se podrían usar *in vivo* para la modulación de procesos biológicos.

Los polímeros preparados como se describe en la presente invención se asemejan a efectores (activador, inhibidor o sustrato) de la plantilla, y como tales tienen actividad biológica si la plantilla está implicada en un proceso fisiológico o un análogo eficaz de tal molécula o estructura. Tales polímeros se pueden usar, por ejemplo, como fármacos en farmacología y medicina.

Cuando se unen a isótopos o marcas fluorescentes, los MIP se podrían 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 podrían usar como agentes biocidas selectivos. Los expertos en la materia podrían proponer diversas modificaciones distintas para introducir propiedades antibióticas en los MIP preparados mediante polimerización viva.

Los MIP sintetizados se podrían usar como sustituto de anticuerpos y receptores naturales en diferentes formas de ensayos y sensores. Diferentes características hacen de los MIP preparados mediante polimerización viva objetivos particularmente atractivos para la aplicación en sensores. De ese modo, los MIP sintetizados todavía contienen iniciador que se puede usar para formar radicales útiles para la unión covalente de polímeros a las superficies sólidas, por ejemplo, con funcionalidades que contienen dobles enlaces. De ese modo, la simple irradiación UV sería suficiente para unir los MIP a superficies cubiertas con dobles enlaces.

La capacidad de usar cromatografía de afinidad para separar las preparaciones de MIP en varias fracciones con diferentes afinidades podría ser ventajosa para la preparación de sensores/ensayos con intervalos de detección variables. También se podrían usar para algunas aplicaciones polímeros en Blanco (los preparados de la misma forma que los MIP, pero en ausencia de plantilla) preparados mediante polimerización viva. Sin embargo, sería necesario preparar tales polímeros usando monómeros que posean cierta afinidad u otras propiedades necesarias para esta aplicación particular. Los expertos en la materia conocen la forma de seleccionar tales monómeros usando, por ejemplo, enfoques computacionales o combinatorios. Es necesario aclarar que el uso tanto de los MIP como de los polímeros en Blanco preparados de una forma como se describe en las correspondientes realizaciones está cubierto por el alcance de la presente invención.

La presente invención se describirá adicionalmente a continuación por referencia particular a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

55 Ejemplo 1.

Preparación de un soporte sólido derivatizado con plantilla. Se activaron perlas de vidrio por ebullición en NaOH 4 M durante 10 minutos, a continuación se lavaron con agua doblemente destilada y acetona y se secaron a 80 °C. Las perlas se incubaron a continuación en una solución al 2 % v/v de 3-aminopropiltrimetoxisilano en tolueno durante una noche, se lavaron con acetona y posteriormente se incubaron en una solución al 7 % v/v de glutaraldehído en tampón PBS a pH 7,2 durante 2 horas, después de lo cual se aclararon con agua doblemente destilada. La inmovilización superficial de la plantilla se llevó a cabo por incubación de las perlas en una solución de 5 mg/ml de la plantilla en PBS a pH 7,2 durante una noche a 4 °C. También se añadió metilpirrolidona (10 % v/v) como codisolvente durante la inmovilización de melamina. Las perlas de vidrio se lavaron con agua y se secaron al vacío, y a continuación se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Síntesis automatizada de partículas impresas con especificidad frente a melamina. El sintetizador usado

consistió en dos bombas 32, 34 que suministran hasta la ocho líneas de alimentación distintas a un recipiente 10 de reacción de vidrio de temperatura controlada (reactor, Figura 1) empaquetado con el soporte sólido 14 derivatizado con la plantilla. Se usó una línea 36 para suministrar la mezcla de monómeros, y las restantes 38 se usaron para el suministro de agua y disolventes de elución. El puerto de salida 18 de dicho reactor 10 se conectó a una válvula 20 de múltiples vías con seis puertos de salida (solo tres de los cuales se muestran en la Figura 1) y se usó como recolector de fracciones, se usó una línea 40 para fracciones de desperdicios, y las restantes 42 se conectaron a viales 22, 24 de recogida. Se usó una fuente UV 12 que comprende cuatro lámparas de vapor de mercurio de 8 W colocadas a 20 cm del reactor para iniciar la polimerización. Las bombas, el controlador 30 de temperatura, las lámparas UV y la válvula de múltiples vías se conectaron a una interfaz 50 de computadora y se controlaron por computadora mediante software programable en una computadora 52. El software permite el control de los caudales, la selección de las líneas de alimentación, la temperatura del reactor, la cadencia/tiempos de irradiación, el tiempo de elución del reactor y los ajustes de la válvula de múltiples vías. Para la síntesis de las partículas de polímero impreso, se empaquetaron las perlas revestidas con melamina (23,5 g) en el reactor de vidrio de temperatura controlada. Las siguientes etapas se programaron todas en el software de control y el sintetizador operó en modo automático. El reactor se llenó con disolvente (acetonitrilo) suministrado mediante una bomba 34 controlada por computadora a 2 ml/min. La columna se refrigeró a 4 °C y se inyectaron 4 ml de mezcla de monómeros en la columna desde una línea 36 de alimentación diferente. La composición de la mezcla de monómeros fue (en % p/p): 50,5 % de acetonitrilo, 15,5 % de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), 15,5 % de trimetacrilato de trimetilopropano (TRIM), 13,8 % de ácido metacrílico (MAA), 3,7 % de dietilditiocarbamato de bencilo (INIFERTER), 0,86 % de tetrakis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol (CTA). Se desconectaron las bombas y se inició la polimerización mediante una irradiación UV que duró 3,5 min. Después de esto, se conectó la bomba 34 del disolvente con el fin de eluir los monómeros y las partículas sin reaccionar con poca o ninguna afinidad por la plantilla durante 30 min con un caudal de 2 ml/min a 4 °C. A continuación se aumentó la temperatura de la columna a 25 °C y el disolvente cambió a acetonitrilo: ácido fórmico 10 mM y transcurrió con un caudal de 2 ml/min durante 11 min. Finalmente, para eluir las partículas con alta afinidad por la plantilla, la temperatura se aumentó a 60 °C y las partículas se recogieron durante 20 min con un caudal de 2 ml/min.

EJEMPLO 2. Síntesis automatizada de partículas impresas con especificidad frente a vancomicina. Para la síntesis de partículas de polímero impreso, se prepararon perlas de vidrio (23,5 g) revestidas con vancomicina como se describe en términos generales en el Ejemplo 1, y se cargaron al reactor de vidrio de temperatura controlada. El montaje usado fue como se describe en el Ejemplo 1. Las siguientes etapas se programaron todas en el software de control y el sintetizador operó en modo automático. El reactor se llenó con disolvente (acetonitrilo) suministrado mediante una bomba controlada por computadora. La columna se refrigeró a 4 °C y se inyectaron 4 ml de la mezcla de monómeros en la columna desde una línea de alimentación diferente. La composición de la mezcla de monómeros fue (en % p/p): 79 % de acetonitrilo, 10 % de N-isopropilacrilamida (NIPAm), 8,5 % de N-terc-butilacrilamida (TBA), 1,62 % de dietilditiocarbamato de bencilo (INIFERTER), 0,5 % de N,N'-metileno-bisacrilamida (BIS). La polimerización se inició mediante una irradiación UV que duró 3,5 min. Después de esto se conectó la bomba de disolvente para eluir los monómeros y las partículas sin reaccionar con poca o ninguna afinidad por la plantilla durante 30 min con un caudal de 2 ml/min a 25 °C. A continuación se aumentó la temperatura de la columna a 60 °C para eluir las partículas con alta afinidad por la plantilla que se recogieron durante 20 min con un caudal de 2 ml/min.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir nanopartículas de polímeros impresos molecularmente que comprende:

- 5 (i) inmovilizar una especie de plantilla sobre un soporte sólido para proporcionar un material de plantilla soportado;
 (ii) ubicar el material de plantilla soportado en un recipiente de reacción que tiene uno o más puertos de entrada de flujo, uno o más puertos de salida de flujo, un refrigerador/calentador adaptado para afectar a la temperatura de los contenidos del recipiente y una fuente de radiación adaptada para irradiar el interior del recipiente;
 10 (iii) hacer pasar una composición polimerizable al recipiente a través de uno o más de dichos puertos de entrada de flujo;
 (iv) hacer que la fuente de radiación irradie el interior del recipiente para efectuar una polimerización controlada de la composición polimerizable, mientras se usa el refrigerador/calentador para controlar la temperatura de la misma;
 15 (v) detener la irradiación en una etapa en la que la polimerización haya generado nanopartículas con pesos moleculares en el intervalo de 500-1.000.000 Da, estando unidas al menos algunas de las nanopartículas a la plantilla inmovilizada;
 (vi) hacer pasar disolvente a través del recipiente mediante uno o más de dichos puertos de entrada y uno o más de dichos puertos de salida para retirar por lavado los componentes sin reaccionar de la composición polimerizable y los polímeros no unidos; y
 20 (vii) hacer pasar disolvente a través del recipiente mediante uno o más de dichos puertos de entrada y uno o más de dichos puertos de salida en unas condiciones tales que al menos algunas de dichas nanopartículas unidas se separen de la plantilla inmovilizada y salgan del recipiente hacia un recipiente de recogida, comprendiendo dichas condiciones una o más de temperatura aumentada producida por el refrigerador/calentador y el uso de
 25 una composición de disolvente que es capaz de interrumpir la unión de las nanopartículas a la plantilla.

2. Un proceso de la reivindicación 1 en el que la etapa (vii) comprende una primera etapa (a) en la que las condiciones se seleccionan de modo que las nanopartículas unidas de forma relativamente laxa a la plantilla se separen y salgan hacia un primero de dicho recipiente de recogida; y una segunda etapa (b) en la que las
 30 condiciones se seleccionan de modo que las nanopartículas unidas más firmemente se separen y salgan hacia un segundo recipiente de recogida.

3. Un proceso de la reivindicación 2 en el que la etapa de polimerización (iv) se lleva a cabo con control de la temperatura en el intervalo de -20 a +20 °; dicha primera etapa (vii) (a) se lleva a cabo con control de la temperatura en el intervalo de 20 a 40 °; y dicha segunda etapa (vii) (b) se lleva a cabo con control de la temperatura en el
 35 intervalo de 60 a 80 °.

4. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que las etapas (iii) a (vii) se llevan a cabo con control por computadora.
 40

5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que las condiciones de polimerización se controlan para producir partículas de un diámetro medio de 40-100 nm.

6. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 en el que las condiciones de polimerización se controlan para producir partículas de las que al menos un 50 % tienen diámetros en el intervalo de 40-100 nm.
 45

7. Un proceso de cualquier reivindicación anterior en el que la polimerización es polimerización radicalaria viva basada en *iniferter*.

50 8. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye una etapa posterior de unir nuevamente las nanopartículas separadas en la etapa (vii) a una plantilla inmovilizada y separarlas posteriormente de la misma.

9. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye una etapa posterior de someter las nanopartículas separadas a polimerización adicional para injertar segmentos de copolímero en bloque en las mismas.
 55

10. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye una etapa posterior de uso de las nanopartículas separadas como fármaco, como ligando específico de receptor para análisis o separación, o como catalizador.
 60

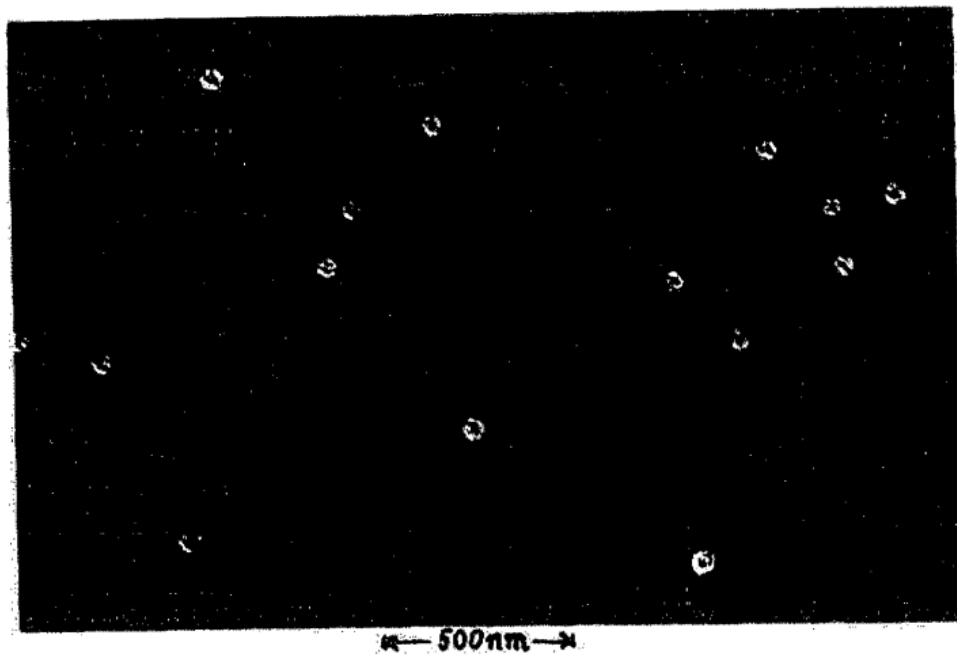
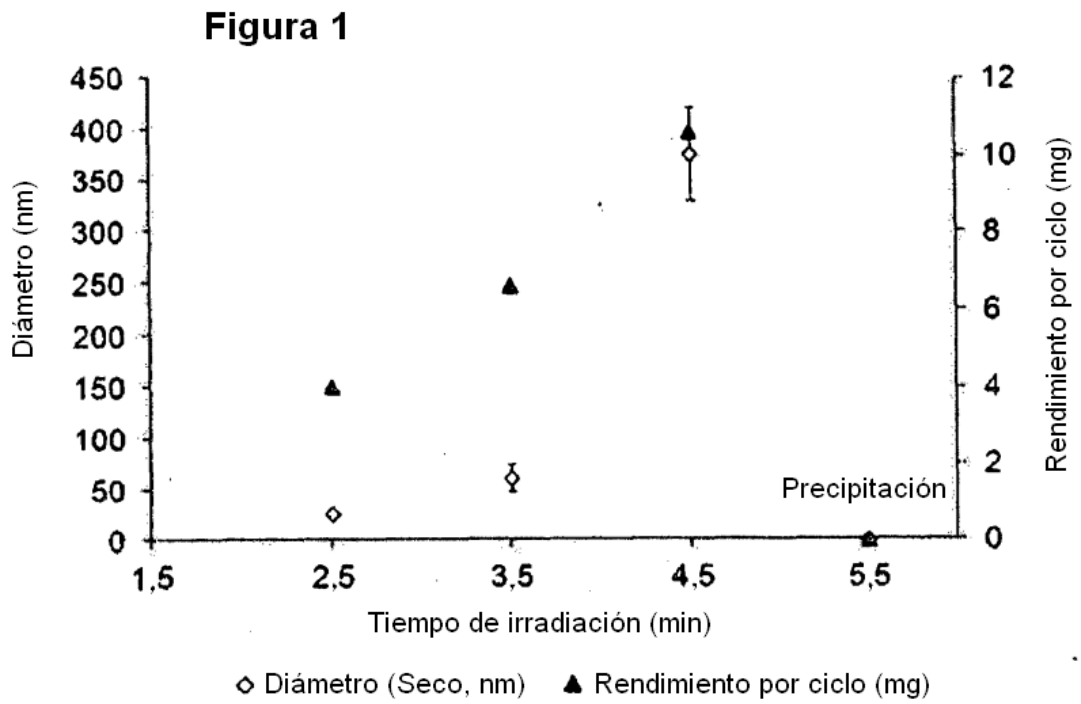


Figura 3

Figura 2

