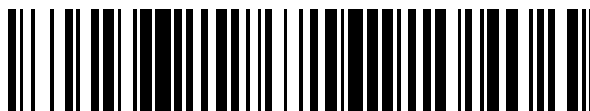


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 148**

51 Int. Cl.:

B01J 20/26 (2006.01)

A61K 31/74 (2006.01)

C08J 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2007** **PCT/DK2007/000083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2007** **WO07095949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007** **E 07702501 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 1988993**

54 Título: **Preparación mejorada de polímeros con impresión molecular**

30 Prioridad:

21.02.2006 DK 200600248

21.02.2006 US 743330 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2019

73 Titular/es:

MIPSALUS APS (100.0%)

Agern Allé 3

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

KRISTENSEN, JESPER SVENNING;

NIELSEN, KLAUS GREGORIUS y

KROGH, NICOLAS OTTO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 736 148 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 mejorada de polímeros con impresión molecular

Campo de la invención

La presente invención se refiere a mejoras en la preparación de polímeros con impresión molecular (MIPs) y, en particular, la presente invención se refiere a procedimientos que incrementan la capacidad de enlazamiento y la especificidad de MIPs para volver factible su uso como agente de captura en preparaciones farmacéuticas, de manera notable aquellas preparaciones farmacéuticas que enlazan moléculas diana en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, colesterol y ácidos biliares y sales de ácidos biliares. Además, este mejoramiento de la preparación de MIPs sirve como un medio de caracterización de los dichos MIPs.

Antecedentes de la invención

La impresión molecular de polímeros sintéticos es un procedimiento en el que los monómeros funcionales y de reticulación se copolimerizan en presencia de una molécula diana que actúa como una plantilla molecular. Antes de la polimerización, los monómeros funcionales forman un complejo con la plantilla por medio de interacciones no covalentes, o bien se acoplan de modo covalente y forman un derivado polimerizable de la plantilla. Después de la polimerización, los grupos funcionales de los monómeros se mantienen en posición por la estructura polimérica altamente reticulada. La extracción subsiguiente de la plantilla mediante extracción con disolvente y/o la disociación química revelan sitios de enlazamiento que son complementarios en tamaño y forma a la molécula diana. De esta manera, se introduce una memoria molecular en el polímero (denominado ahora un "polímero con impresión molecular" o "MIP"), el cual es capaz ahora de re-enlazar la diana con una especificidad muy alta.

Originalmente fueron empleados MIPs como fases estacionarias en HPLC, de manera notable para separación quiral. A continuación, su uso se ha extendido a otras técnicas analíticas tales como cromatografía de capa delgada, electroforesis capilar, extracción en fase sólida y ensayos de enlazamiento de tipo inmunoensayo. Los sitios de enlazamiento tienen frecuentemente afinidades y selectividades que se aproximan a aquellas de los sistemas de anticuerpo-antígeno. Estas similitudes demuestran algunas ventajas claras sobre anticuerpos reales para la tecnología de sensores. Debido a su naturaleza altamente reticulada, los MIP son intrínsecamente estables y robustos, lo cual facilita su aplicación en ambientes extremos tales como en presencia de ácidos, bases o iones de metales, en disolventes orgánicos o a altas temperaturas y presiones. Además, es barato producir MIPs y estos pueden almacenarse en un estado seco a temperatura ambiente durante períodos largos de tiempo.

Por lo tanto, en principio todos los MIP están hechos de la siguiente manera: se mezclan los monómeros y las moléculas diana (o plantillas), ocurre un auto-ensamblaje, se adiciona un reticulante y puede iniciarse la polimerización. Después de la polimerización, el polímero se descompone en fracciones pequeñas y se extrae la molécula diana. Si los MIP se ponen en una solución de moléculas diana, estas se re-enlazarán para formar los MIP (cf. también: Yu Cong; Leif Schweitz; y Ioana Wärmmark-Surugiu).

Las etapas tecnológicas generales en la preparación de MIPs se ilustran de manera esquemática en la Fig. 1.

Historia de los MIP

Uno de los primeros ejemplos de preparación de MIP fue descrito ya en 1949 (Dickey) quien utilizó un tipo de sílice (silicato de sodio) para el reconocimiento selectivo de tintes. Mucho después, fueron descritos otros tipos de sistemas de auto-organización para desarrollar redes en los que era posible enlazar dianas/analitos de modo específico (Ramström et al., Schweitz et al., y Vlatakis et al.)

Elección de monómeros y polimerización

En los años 1970 y 1980 (cf. Shea 1986, Shea 1990 y Wulff 1987) fue descrito el concepto de enlazar de modo covalente la molécula plantilla/diana directamente con el polímero usado para formar el andamio. La reivindicación fue que el enlazamiento directo conduciría a una distribución más homogénea de sitios de enlazamiento por todo el polímero. Sin embargo, al mismo tiempo esto deja el problema de retirar la plantilla después de la polimerización. Para retirar la plantilla se necesita tanto una micronización del polímero, como la ruptura del enlace químico.

Preparar MIPs sin ligar la plantilla a uno de los monómeros usados durante la polimerización frecuentemente da lugar a buenos MIPs, pero la experiencia en la bibliografía es que muchos de los sitios de enlace contendrán sitios de enlazamiento que tienden a enlazar la plantilla/analito en partes menos específicas de la molécula y, por lo tanto, que no dan la especificidad deseada de los MIP resultantes. Esto es muy importante para los MIP usados para propósitos analíticos, especialmente si el objeto es separar formas estereoisoméricas de las moléculas, mientras que esto es menos importante en el caso en el cual el objetivo principal es mejorar la capacidad total de enlazamiento de los MIP resultantes.

En ciertas situaciones analíticas se ha demostrado que la plantilla tiene que ser de una identidad diferente, es decir que, en vez de usar la plantilla actual, los MIP producidos están formados sobre "imitaciones" de plantilla para no

contaminar la muestra que va a analizarse. Es obvio que encontrar una imitación de plantilla que sea capaz de asegurar un enlazamiento específico o entre el analito y el MIP es una tarea difícil.

Un procedimiento completamente diferente para preparar MIPs es polimerizar la mezcla mientras que el monómero, los reticulantes y la plantilla (o imitaciones de plantilla) se mantienen en formato particulado en una emulsión y, por lo tanto, dejan el MIP resultante como una partícula directamente (Funke et al.). El tamaño de partícula de MIP hecho con este proceso dependerá, entre otras cosas, de la concentración del monómero y de la velocidad de agitación (que determina el tamaño de gota en la emulsión). (Para obtener tamaño de partícula por debajo de 1 μm , se necesita agitar la solución a más de 1000 rpm). Según la bibliografía, las desventajas con este tipo de procedimientos son los largos tiempos de preparación y los bajos rendimientos.

En general, la técnica anterior describe frecuentemente las dificultades de preparar MIPs reproducibles en los que no se comprometan ni la capacidad ni la especificidad (por consiguiente, más bajas que las deseadas). A la fecha, la técnica no ha divulgado un procedimiento confiable y factible para preparar composiciones de MIP con alta capacidad de enlazamiento (Selligren 1998).

Obtención de un tamaño de partícula útil

Cuando se usa un procedimiento de polimerización de formación en masa para preparar MIPs, el alto grado de reticulación exige una micronización del polímero a tamaños de partícula muy pequeños antes de que pueda realizarse la extracción de las moléculas plantilla. Los procedimientos para la micronización se usan en áreas industriales muy diferentes que varían desde la industria del cemento (creando partículas del tamaño de mm) hasta pequeños molinos de bolas para la preparación de pasta de película espesa (partículas con tamaño de partícula de μm) para circuitos eléctricos. A pesar del hecho de que el procedimiento de micronización es una parte crucial de la funcionalidad de MIP (tanto especificidad, como capacidad), no se describe en detalle el propio procedimiento de elección en la mayor parte de la bibliografía de MIP, mientras que solo se menciona que el polímero en masa se muele y se tamiza (se clasifica por tamaño de partícula) antes de la extracción de la plantilla de los MIP.

Extracción de plantilla

En la mayor parte de la bibliografía no se describe de manera intensa la extracción de las moléculas de plantilla a pesar del hecho de que este procedimiento es crucial para la funcionalidad del MIP resultante. Con la mayor frecuencia, el procedimiento se menciona solamente como un procedimiento de lavado no especificado que usa uno o más disolventes nombrados de manera específica. Especialmente, si el MIP se desarrolla para usar en extracción en fase sólida (SPE), por ejemplo, como una herramienta para pre-concentración de analitos, incluso cantidades residuales de plantilla estorbarían la capacidad de uso de los MIP. La clasificación de MIP a partir de la matriz usada para retirar la plantilla con frecuencia se realiza mediante filtración o centrifugación.

Esfuerzos conocidos para mejorar MIPs

La patente estadounidense 4.111.863 describe "Un polímero tridimensional incapaz de hincharse que tiene un componente que es un residuo de un compuesto ópticamente activo, cuyo residuo puede retirarse químicamente de dicho polímero para dejar atrás, en la estructura física de dicho polímero, un hueco correspondiente al tamaño y forma de dicho residuo de compuesto ópticamente activo..." y "el compuesto ópticamente activo" es la plantilla que el MIP debe poder enlazar a continuación de manera intencionada.

En la patente estadounidense 5.110.833 se reivindica "Un procedimiento para producir enzimas sintéticas o anticuerpos sintéticos que comprende la orientación de monómeros alrededor de una molécula impresa, adición de agentes de reticulación, polimerización para obtener un polímero y extracción subsiguiente de la molécula impresa, por lo cual se crea una cavidad en el polímero que corresponde a dicha molécula impresa" para incrementar la especificidad del MIP hacia la molécula de plantilla. En otras palabras, el mejoramiento de desempeño reivindicado en la publicación US 5,110,833 se basa en optimizar el contacto entre la molécula plantilla y las unidades de monómero antes de la polimerización.

En la patente estadounidense 6.881.804 se describe la introducción de porosidad en el MIP como un medio para incrementar el desempeño de un MIP incrementando el acceso al sitio hueco destinado a interactuar con la plantilla.

En la patente estadounidense 6,638,498 se reivindican monómeros específicamente seleccionados para la generación de MIPs específicos de ácido biliar, y en la publicación US 2004/0157209 A1, se sugiere inmovilizar la molécula de plantilla sobre un material de soporte antes de la polimerización. Todas las sugerencias para mejorar el desempeño de los MIP tienen que ver con las características químicas de los monómeros o la arquitectura de los MIP, que son todas etapas de procedimiento que tienen lugar antes o durante la preparación del MIP.

La publicación US 5.994.110 divulga MIPs que se producen in situ para formar pequeños polímeros/oligómeros que incluyen una estructura complementaria a una molécula plantilla. Los polímeros u oligómeros forman un recubrimiento o imagen alrededor de la Biomolécula y dicho recubrimiento o imagen se retira de la misma y de la misma se derivan entidades discretas que pueden usarse, por ejemplo, como agentes terapéuticos o profilácticos, es decir medicamentos. Debido a este tipo de procedimiento de producción, la publicación US 5,994,110 no utiliza una

etapa de micronización como en la preparación convencional de partículas de MIP. La publicación US 5.994.110 sí sugiere la separación de MIPs de no aglutinantes, pero los procedimientos sugeridos se basan todos en el tamaño muy pequeño de los MIP producidos, por ejemplo, por medio de cromatografía, pero sólo cuando los MIP son entidades solubles. Por ejemplo, se indica específicamente que los MIP terapéuticamente activos según la publicación US 5,994,110 son aquellos que exhiben pesos moleculares en el extremo inferior del intervalo de 1-200 kDa. Además, la publicación US 5,994,110 no divulga medio alguno para separar MIPs suspendidos insolubles en “buenos aglutinantes”, por una parte, y “aglutinantes menos efectivos o no aglutinantes”, por la otra.

La publicación WO006129088 divulga un procedimiento para la síntesis de polímeros solubles con moléculas impresas mediante polimerización viva.

10 Objeto de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar procedimientos mejorados para preparar MIPs para proporcionar composiciones de MIP que tengan una capacidad suficientemente alta de enlazamiento para permitir que tales composiciones se usen en aplicaciones farmacéuticas como una alternativa a los anticuerpos y receptores solubles. También es un objeto proporcionar composiciones de MIP que tengan propiedades mejoradas sobre las composiciones de MIP de la técnica anterior.

Sumario de la invención

A pesar de los intentos antes discutidos para mejorar la tecnología existente para preparar MIPs, hoy en día no ha habido intentos exitosos de preparación de composiciones de MIP que puedan usarse clínicamente como una alternativa factible a, por ejemplo, anticuerpos y receptores solubles en procedimientos de tratamiento en los que el despeje de una molécula diana particular fuera del cuerpo es relevante como parte de la terapia.

Los presentes inventores atribuyen esto al hecho de que incluso aunque MIPs individuales pueden tener una afinidad muy alta para un ligando dado, una composición de, por ejemplo, MIPs micronizados/molidos exhiben una gran variedad de afinidades de enlazamiento hacia el ligando, volviendo de esta manera insatisfactoria e inadecuada la capacidad de enlazamiento total, por ejemplo, para el uso clínico o, expresado en términos más simples, la capacidad de enlazamiento de composiciones conocidas de MIP para el ligando diana normalmente es demasiado bajo para volver los MIP una alternativa factible a receptores solubles y anticuerpos en la terapia.

Los presentes inventores también se han enfocado en el hecho de que ha habido poca investigación, si acaso alguna, en la influencia del tamaño de partícula de MIP sobre la capacidad total de enlazamiento de una composición de MIP.

Los presentes inventores enseñan, por lo tanto, el mejoramiento ulterior del desempeño de los MIP mediante la clasificación de partículas de MIP según su capacidad de enlazarse a la plantilla o a análogo de plantilla, lo cual aumenta de esta manera la concentración de MIPs que se enlazan efectivamente a la diana. Mediante una clasificación funcional o procedimiento de purificación de este tipo, puede generarse una fracción de las partículas de MIP que presentan un vacío o cavidad con capacidad adecuada de enlazamiento a la plantilla seleccionada o a un análogo, lo cual, por lo tanto, da lugar a partículas de MIP de tamaño promedio más pequeño, por lo cual exhiben una proporción mejorada entre los sitios de enlazamiento y el volumen.

Por consiguiente, la presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición que comprende polímeros con impresión molecular (MIPs) que tienen una alta capacidad de enlazamiento y especificidad para una molécula diana, y dicho procedimiento comprende

a) obtener una suspensión de MIPs insolubles que se enlazan a la molécula diana y los cuales han sido preparados usando la molécula diana o una imitación de la misma como molécula plantilla;

b) someter los MIP suspendidos a un procedimiento de purificación por afinidad, en el que la molécula plantilla o un fragmento de la misma o una imitación de la misma se usan como agente de captura;

c) recuperar los MIP que enlazan el agente de captura en el procedimiento de purificación por afinidad mientras sustancialmente se excluye el agente de captura y los MIP que no enlazan el agente de captura del producto recuperado, y

d) combinar los MIP recuperados y opcionalmente un soporte, vehículo o diluyentes para obtener dicha composición.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar MIPs que tienen una alta capacidad de enlazamiento para una molécula diana y dicho procedimiento comprende someter un MIP crudo el cual comprende moléculas de plantilla que consisten en dicha molécula diana o una imitación de la misma a una primera etapa de micronización para obtener un tamaño de partícula de MIP suficientemente pequeño para permitir la extracción de moléculas de plantilla, retirar sustancialmente todas las moléculas de plantilla y someter

opcionalmente los MIP obtenidos de esta manera a una segunda etapa de micronización, en la que dicha primera etapa y dicha segunda etapa opcional de micronización proporcionan un diámetro promedio de MIP a lo sumo de 50 μm y a continuación someter los MIP obtenidos de esta manera al procedimiento antes mencionado del primer aspecto de la invención.

- 5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición de MIPs insolubles en la que todos los MIP en la composición enlazan la misma molécula diana y, opcionalmente, la composición no incluye todos los sitios de enlazamiento para la molécula diana.

En particular, según la invención se proporciona una composición para usar en el tratamiento, profilaxis o mejoramiento de enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad de cálculos biliares, enfermedad de hígado colestásico, hipercolesterolemia, obesidad, infecciones que se originan de parásitos o microorganismos tales como bacterias y hongos, o intoxicación que se origina de toxinas dadas oralmente.

10 Finalmente, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación cuantitativa o cualitativa de una molécula diana en una muestra y el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con una composición de la invención o preparada según la invención, en el que los MIP en la composición enlazan específicamente la molécula diana y, a continuación, se realiza una evaluación cuantitativa o cualitativa de dicha composición que enlaza la molécula diana.

Leyendas de figuras

Fig. 1: representación esquemática de un procedimiento de preparación de MIP simple.

Fig. 2: recorrido simple a través de los procedimientos inventivos descritos aquí. Los procedimientos pueden repasar varias veces, si se necesita.

Fig. 3, Parte I:

Purificación o clasificación por absorción del lecho expandido.

MIPs que enlazan la plantilla, tal como un colesterol como molécula acoplada a la partícula del lecho, se retienen mientras los MIP que no enlazan, atraviesan y son descartados.

Figura 3, Parte II

Funcionalidad de MIPs purificados.

Los MIPs que se enlazan a la molécula plantilla pueden ser extraídos por elución a continuación.

Los MIPs eluidos tendrán una capacidad de enlazamiento específico más alta que la colección cruda de MIPs que contienen MIPs tanto de enlazamiento, como de no enlazamiento.

Figura 4: partículas de MIP del ejemplo 4 en una imagen superpuesta. La imagen superpuesta se compone de dos imágenes tomadas con luz blanca visible y luz UV, respectivamente. Las manchas blancas representan partículas iluminadas con luz blanca y las manchas negras representan las partículas fluorescentes verdes iluminadas con UV.

Divulgación detallada de la invención

Definiciones

A continuación, se definirá una cantidad de términos para asegurar un entendimiento correcto de los límites y fronteras de la presente invención.

Un "polímero con impresión molecular" (MIP) es un polímero que comprende cavidades (o vacíos) que al menos en parte corresponden a una o más moléculas plantillas que han sido incorporadas en una matriz de monómero, que incluye monómeros de reticulación, antes de la polimerización. El polímero resultante después de la polimerización incluye una cantidad de cavidades que corresponden en forma a la molécula plantilla. Normalmente, el MIP es aislado en partículas pequeñas, por lo cual se facilita la extracción de la plantilla y deja cavidades parciales abiertas para interacción con una molécula diana que se asemeja o es idéntica a la molécula plantilla. En la presente especificación y en las reivindicaciones, el término MIP generalmente se refiere a la forma de partículas de un MIP, lo cual significa que los términos "MIP" y "MIPs" se usan de modo intercambiable con las expresiones partícula de MIP y partículas de MIP, respectivamente.

Se entenderá que los MIP empleados en la presente invención son entidades/moléculas insolubles. Estos MIP son especialmente adecuados como fármacos para uso en el tracto gastrointestinal puesto que su insolubilidad limita o impide su paso por el cuerpo (por ejemplo, a la circulación) desde el tracto gastrointestinal. En otras

palabras, cuando se administra oralmente, los MIP usados en la presente invención permanecerán sustancialmente confinados en el tracto gastrointestinal hasta que sean desechados en las heces.

Un "MIP crudo" es un MIP que todavía no ha sido sometido a una micronización y, por lo tanto, todavía incorpora moléculas plantillas, o al menos restos derivados de moléculas plantillas en las cavidades de la estructura de MIP.

- 5 "Micronización" denota el procedimiento de aislamiento de MIPs que todavía contienen plantilla en partículas más pequeñas. Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para este propósito.

Una "molécula diana" es en el presente contexto cualquier molécula a la cual puede enlazarse un MIP.

- 10 Una "molécula plantilla" normalmente es idéntica a la molécula diana, pero también puede ser una imitación de la misma (es decir, una molécula que tiene al menos en parte una estructura 3D y un perfil que son idénticos y que coinciden con los de la molécula diana; una imitación puede constituirse, por ejemplo, por un fragmento de la molécula diana). La plantilla sirve como el "generador" de los vacíos en la estructura de MIP, los cuales a continuación son capaces de enlazarse con la molécula diana.

- 15 "Purificación por afinidad" denota cualquier procedimiento para purificación de una sustancia en el que se utiliza enlazamiento específico entre la sustancia y una contraparte de enlazamiento. Muchos procedimientos de este tipo utilizan un agente de captura enlazado a un soporte sólido (tal como una matriz cromatográfica) que atrapa la sustancia. Ejemplos típicos, conocidos en la técnica, son purificación por afinidad que usan anticuerpos en calidad de agentes de captura, acoplados a bolitas cromatográficas para purificar antígenos que enlazan el anticuerpo. Se entenderá que los procedimientos de purificación por afinidad que se aplican según la presente invención son aquellos que son capaces de capturar partículas de MIP suspendidas, las cuales tienen los tamaños discutidos aquí.
- 20 Por lo tanto, un procedimiento de purificación por afinidad típico podría ser la adsorción de lecho expandido (EBA) el cual es conocido por una persona versada en la técnica.

- 25 En el presente contexto, una "fase sólida" es cualquier material que pueda usarse para anclar un agente de captura por medio de enlazamiento covalente u otro covalente. Por lo tanto, cualquier material (polímeros plásticos, azúcares, metales, vidrio, sílice, gomas, etc.) que se usa convencionalmente en la preparación de materiales cromatográficos puede servir en calidad de la fase sólida. El material de fase sólida puede contener grupos funcionales adecuados que permiten acoplar el agente de captura al material en cuestión. Tales materiales derivatizados son conocidos por la persona versada en la técnica de purificación cromatográfica de proteínas y otras macromoléculas. Además, la fase sólida puede tener cualquier forma física que permitan la captura de partículas relativamente grandes e insolubles, tales como MIPs (al comparar con bio moléculas individuales tales como proteínas). Por consiguiente, la
- 30 fase sólida puede estar en la forma de fibras (preferiblemente huecas), una matriz cromatográfica (preferiblemente una matriz adecuada para EBA), bolitas (preferiblemente aquellas que pueden separarse por medios electromagnéticos) o cualquier otra forma adecuada; cf. más adelante.

Formas de realización del aspecto de purificación según la invención

- 35 Tal como se ha especificado antes, en su primer aspecto la presente invención se refiere un procedimiento para preparar una composición que comprende polímeros de impresión molecular (MIPs) que tienen alta capacidad de enlazamiento y especificidad por una molécula diana y dicho procedimiento comprende

- a) obtener una suspensión de MIPs insolubles que enlacen la molécula diana y que hayan sido preparados usando la molécula diana o una imitación de la misma en calidad de molécula plantilla,
- 40 b) someter los MIP suspendidos a un procedimiento de purificación por afinidad, en el que la molécula plantilla o un fragmento de la misma o una imitación de la misma se usa como agente de captura,
- c) recuperar los MIP que enlazan el agente de captura en el procedimiento de purificación por afinidad mientras se excluyen del producto recuperado sustancialmente el agente de captura y los MIP que no enlazan el agente de captura, y
- 45 d) combinar los MIP y opcionalmente un soporte, vehículo o diluyente para obtener dicha composición (tales soportes, vehículos y diluyentes se seleccionan normalmente entre aquellos que son aceptables farmacéuticamente y conocidos por la persona versada en la preparación de composite de farmacéuticas que comprenden partículas sólidas de tamaño pequeño).

- 50 En otras palabras, este aspecto se basa en el aumento de concentración de los MIP que exhiben una afinidad deseada, suficientemente alta por la molécula diana (o un sucedáneo de la misma, al como un fragmento relevante de la molécula diana), pero este aspecto también tiene el efecto de que de la composición de MIP se retiran fragmentos no enlazantes de un MIP original crudo; por derecho propio, esto incrementa la capacidad de enlace por unidad de masa de la composición de partículas de MIP en un grado significativo, cf. ejemplo 4. Se cree que los presentes inventores son los primeros en demostrar que las composiciones del estado de la técnica de los MIP insolubles, preparados por procedimientos conocidos en la técnica, incluyen una fracción grande de partículas no enlazantes, y que la capacidad de enlazamiento por unidad de masa de cualquier composición de este tipo puede
- 55

mejorarse drásticamente retirando los no enlazantes. Por lo tanto, se entenderá que cualquier preparación de MPs insolubles puede someterse a la etapa de purificación d), de modo que el primer aspecto de la invención puede combinarse con cualquier procedimiento conocido para preparar MIPs insolubles, de manera notable aquellos procedimientos conocidos que incluyen medios para obtener composiciones de MIP de alta capacidad y/o alta especificidad.

A continuación, se discutirán detalladamente diversas formas de realización de los esquemas de purificación diseñados para composiciones de MIP.

Un primer grupo de esquemas de purificación comprende que el agente de captura se acopla de modo covalente o no covalente a una fase sólida (tal como una matriz cromatográfica); es decir, este grupo de esquemas de purificación incluye, entre otros, procedimientos cromatográficos típicos de purificación. Por lo tanto, es útil cualquier material útil en cromatografía y en procedimientos similares, pero las fases sólidas preferidas son matrices de carbohidratos enlazados de modo cruzado, polímeros sintéticos, partículas de metal o combinaciones de los mismos.

Un segundo grupo e igualmente importante de esquemas de purificación son aquellos en los cuales el agente de captura consiste en o es parte de una entidad química soluble (lo cual permite, por ejemplo, una purificación por medio de aglutinación; cf. más adelante). Las formas preferidas de realización de esto abarcan aquellos en los cuales el agente de captura se acopla de modo covalente o no covalente a una fracción seleccionada de un dendrímero, un carbohidrato sustituido y un polímero soluble sustituido tal como polialcohol vinílico y polietilenglicol para exponer múltiples agentes de captura por entidad química soluble.

Sin importar si se selecciona uno u otro grupo de esquemas de purificación, algunas formas de realización del primer aspecto de la invención abarcan hacer que el agente de captura se enlace sólo a una fracción de los sitios de enlazamiento en los MIP definidos en la etapa a) que son capaces de enlazar la molécula plantilla. Puesto en términos más simples, esta forma de realización asegura que solamente los MIP que tienen una especificidad de enlazamiento o una afinidad de enlazamiento deseadas se conservan en el procedimiento de purificación, mientras que, por ejemplo, aquellos MIP que tienen sitios de enlazamiento no específicos o débiles se excluyen en la purificación.

Una manera de excluir sitios de enlazamiento no específicos en el procedimiento de purificación implica usar un agente de captura en la purificación por afinidad, en el que dicho agente de captura es un fragmento de la molécula plantilla. Seleccionando esta estrategia, es posible omitir en el agente de captura partes de la molécula plantilla que sean capaces de competir con otras moléculas por el enlazamiento con los MIP. Esto es especialmente práctico en casos en los que la molécula diana incluye presuntos sitios de enlazamiento de reacción cruzada que podrían dar lugar a MIPs que se enlazarían a dianas irrelevantes. A manera de ejemplo: si se quisiera, por ejemplo, preparar una composición de MIP que enlace una hormona luteinizante, sería relevante excluir la subunidad α de esta molécula en la plantilla porque las subunidades α de LH, FSH, TSH, y hCG son idénticas.

Una alternativa a esta estrategia es utilizar una configuración en la cual el agente de captura comprende la molécula plantilla, o una imitación de la misma o un fragmento de la misma, enlazada a una superficie sólida o porción, cualquiera que sea aplicable, en una orientación específica para evitar sustancialmente la exposición a los MIP de una parte del agente de captura; por consiguiente, acoplando los agentes de captura a su soporte sólido o porción, a una funcionalidad seleccionada para que la orientación del agente de captura acoplado se vuelva sustancialmente el mismo en todas sus contrapartes de acoplamiento, se logra que parte del agente de captura no sea accesible para enlazamiento con los MIP y, por lo tanto, los MIP capaces de enlazar con la parte no accesible del agente de captura serán cribados para sacarlos del procedimiento integral de purificación. El producto de tal procedimiento de purificación será, por lo tanto, una composición de partículas de MIP en la que sustancialmente todas las partículas de MIP en la composición enlazan una diana particular, pero en la que al menos un sitio de enlazamiento de la diana no se enlaza por las partículas de MIP en la composición.

Como alternativa, y en casos en los que no hay deseo o ventaja apreciable o necesidad de limitar el enlazamiento entre el agente de captura y los MIP, se prefiere que el procedimiento de purificación de la invención sea uno en el que el agente de captura comprenda la molécula plantilla, o imitación de la misma o fragmento de la misma, enlazada con la superficie sólida con la porción (cualquiera que sea aplicable), en una orientación específica para que sustancialmente todas las partes del agente de captura se expongan a los MIP.

En los casos en los que el agente de captura enlace un soporte sólido, el procedimiento de purificación por afinidad puede seleccionarse de cualquier tipo de tecnología de purificación adecuada que se base en el acoplamiento de agentes de captura a una superficie sólida. Sin embargo, se prefiere que el procedimiento de purificación se selecciona del grupo que consiste en adsorción de lecho expandido (EBA), separación por bolitas paramagnéticas y purificación por fibras huecas.

Adsorción de lecho expandido (EBA)

Los procedimientos cromatográficos convencionales que usan un lecho empacado en una columna habitualmente no pueden usarse para aislar material en forma de partículas debido a la tendencia de las partículas a quedar atrapadas de manera específica dentro del vacío estático del lecho.

El principio principal en EBA es mantener el medio cromatográfico, también denominado “la fase sólida” fluidizado y, de esta manera, tal como se ha explicado, permitir que las partículas pasen a través de la columna. Las ventajas de usar la tecnología EBA han sido descritas como la posibilidad de purificar material soluble, en la mayoría de los casos una proteína o péptido, a partir de una materia prima o cultivo celular sin etapas de clarificación de pre-columna tales como filtración y centrifugación antes de la aplicación de la materia prima a la columna (van Reis & Zapata; Lihme et al.). La idea es que el material insoluble o en forma de partículas tal como el residuo celular y el precipitado se eliminan lavando simultáneamente con el enlazamiento de las moléculas diana a la fase sólida del lecho. De esta manera, se reducen tiempo y gastos para estos procedimientos lo cual vuelve a EBA una tecnología valiosa que es recomendable económicamente para la purificación de una cantidad incontable de moléculas. Sin embargo, si el lecho se expande, el volumen incrementado del vacío estático del lecho permite que el material en forma de partículas atraviese y, de esta manera, se ponga en contacto apropiado con la fase sólida del lecho y, en consecuencia, se enlace si se logra la afinidad requerida entre el material en forma de partículas en cuestión y la fase sólida del lecho. En este caso también se ha mostrado que puede usarse EBA para selección de células y otro material en forma de partículas (Ujam et al.), en la cual los monocitos de la sangre periférica fueron mezclados y, a continuación, se aplica un sistema EBA en el que a las partículas del lecho se había suministrado estreptavidina.

Los presentes inventores han concluido que de una manera similar aquellas partículas preparadas mediante la tecnología de MIP pueden clasificarse o purificarse por medio de EBA si la fase sólida o las partículas del lecho del sistema EBA exponen una estructura química similar idéntica a la plantilla usada para hacer el dicho MIP. Como puede ser importante que las partículas de MIP se transporten con el flujo de la parte fluida del sistema EBA, mientras las partículas del lecho se mantienen a volumen expandido relativamente constante, las partículas del lecho con densidad relativamente alta (>2 g/ml) probablemente demostrarán superioridad al separar MIPs no enlazados de MIPs enlazados al lecho en el procedimiento de fluidización. Un ejemplo de tales bolitas de alta densidad se da en Ujam et al. También se prefieren partículas de lecho que no son porosas o exhiben una porosidad limitada; cf. Chase, más adelante. La plantilla, tal como colesterol o ácido biliar, se acopla preferiblemente con una orientación (orientaciones) que asegura una exposición máxima de las características estructurales y químicas de la molécula plantilla a las partículas de lecho y los MIP preparados con un tamaño preferido de $0,2-50\ \mu\text{m}$ (cf. más adelante) se aplican al lecho fluidizado y después de un tiempo de reacción adecuado, preferiblemente con recirculación de la fase fluida que incluye MIPs no enlazados, los MIP no enlazados se retiran mediante lavado, por ejemplo, aumentando la velocidad de flujo o simplemente aplicando regulador de pH limpio para lavado al sistema EBA y conducen el caudal a los residuos. Los MIPs enlazados pueden liberarse de las partículas de lecho aplicando plantilla soluble, mediante calor, fuerza iónica incrementada o aplicando un estrés físico al lecho. También debería ser posible utilizar partículas de lecho que no son porosas o exhiben porosidad limitada, tal como se ha discutido previamente (cf. Chase).

Como una alternativa a expandir o fluidizar el lecho mediante circulación, el lecho podría expandirse revolviendo mecánicamente, mezclando de modo repetido, agitando, mediante ultrasonido y otros procedimientos que incrementan la convección/transporte de masa. La separación de partículas de MIP enlazadas a partículas del lecho podría hacerse a continuación mediante fluidización adecuada del lecho por medio de una fase de circulación. Como alternativa, los MIP enlazados y no enlazados podrían separarse por diferencias en densidad, tamaño, forma, propiedades ópticas, mediante centrifugación, sedimentación, filtración, captura u otros medios que separan según tamaño y/o peso, densidad, forma, color, emisión de luz, dispersión de luz, coeficiente de extensión.

Por lo tanto, tal como se describe en la técnica anterior de purificación, las partículas pueden clasificarse o purificarse por medio de EBA y según la presente invención esto puede aplicarse ventajosamente a partículas preparadas mediante tecnología de MIP si la fase sólida o las partículas del lecho o el sistema EBA exponen una estructura química similar a la plantilla usada para hacer el MIP dicho.

Separación mediante enlazamiento a partículas magnéticas

Dynal (Invitrogen) y otras compañías han desarrollado tecnologías usando bolitas paramagnéticas principalmente para purificación de moléculas solubles, normalmente proteínas, péptidos o ADN, pero también ha sido presentado el aislamiento de células y organelas mediante enlazamiento específico, por ejemplo, a anticuerpo inmovilizado sobre la bolita paramagnética. Las bolitas más grandes M450 ($450\ \mu\text{m}$) se recomiendan para aislamiento de tal material particulado como células. Después de que las bolitas paramagnéticas portan la molécula capturada, normalmente un anticuerpo específico para una proteína de membrana sobre la célula, y la diana, por ejemplo, una célula u otro material particulado, hayan estado en contacto durante un intervalo de tiempo apropiado, las partículas paramagnéticas que han enlazado ahora la célula por medio del anticuerpo se fijan aplicando un campo magnético al contenedor de las muestras. Las células no enlazadas pueden eliminarse lavando cuando las bolitas paramagnéticas se fijan y, cuando el campo magnético se retira, las partículas paramagnéticas serán liberadas. Estas bolitas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, en Dynal con diferentes tipos de activación tales como tosilo, epoxi, carboxi y amina, que pueden usarse para acoplar el anticuerpo u otra molécula de captura tal como una molécula plantilla proveniente de una síntesis de MIP.

Acoplando plantillas tales como colesterol o ácidos biliares a tal partícula magnética, los MIP reactivos con plantilla se enlazarán a la partícula y podrán separarse de los MIP enlazantes o no enlazantes de plantilla aplicando un campo magnético de la misma manera que pueden aislarse células que portan una proteína de membrana específica.

5 Separación mediante aglutinación

La aglutinación es un fenómeno que ocurre si las moléculas y las partículas o células establecen interacciones multivalentes con formación de redes con solubilidad cambiada o propiedades de suspensión, lo cual tiene como consecuencia que las redes pueden detectarse, por ejemplo, por el cambio en las propiedades ópticas o por medio de microscopio. Se usa aglutinación principalmente para propósitos de diagnóstico en ensayos rápidos en puntos de atención. El elemento soluble que promueve la reticulación, por ejemplo, entre eritrocitos son frecuentemente anticuerpos di- o multivalentes (Pla et al.), lectinas o un antígeno específico para la aplicación (Rogers et al.).

Pueden aplicarse moléculas solubles que exponen múltiples plantillas o moléculas análogas a plantillas, tales como estructuras dendrímicas provistas de, por ejemplo, colesterol o ácidos biliares, a una colección de MIPS que se mantienen fluidizados o en suspensión, por ejemplo, revolviendo mecánicamente, mezclando de modo repetido, agitando, mediante ultrasonido, un flujo de fase fluida, etc. Los MIPS reactivos de plantilla interactuarán con las moléculas de plantilla expuestas, por ejemplo, sobre el dendrímeros y formarán preferiblemente una red en la que la plantilla que expone estructura dendrímica actuará como un agente de reticulación.

Las partículas de MIP no ligadas se separan de las partículas de MIP integradas en el aglutinado o en la red por las diferencias aparentes en densidad, tamaño, forma, propiedades ópticas, mediante centrifugación, sedimentación, filtración, citometría de flujo, captura u otros medios que separan según tamaño y/o peso, densidad, forma, color, emisión de luz, dispersión de luz, coeficiente de extensión. A continuación, las partículas de MIP reactivos de plantilla se extraen como partículas individuales aplicando estrés al aglutinado o a la red en forma de calor, disolvente orgánico, agitación o aplicando plantilla soluble en exceso.

Formas de realización que se refieren a micronización de MIPS

En un intento previo de la técnica anterior por preparar un MIP específico de colesterol, la capacidad fue limitada a 17 mg de colesterol por g de MP; sin embargo, un MIP no impreso preparado de la misma forma enlazó 13 mg de colesterol por g de MIP (Selligren 1998). Otro intento obtiene una capacidad incluso más baja, inferior a 1 mg de colesterol por g de MIP (Whitcombe 1995).

Los presentes inventores ven estos problemas de la técnica anterior en obtener capacidades de enlazamiento satisfactorias como una consecuencia de no enriquecer con aglutinantes efectivos en las composiciones de partículas de MIP.

El modelo más simple para la capacidad de enlazamiento de plantilla sobre un MIP es una consideración de área pura. El área ocupada por la plantilla (por ejemplo, colesterol) como una función del área de superficie de partícula de MIP puede usarse como una guía para determinar las demandas de tamaño de partícula y eficacia de enlazamiento (el porcentaje de área de superficie de MIP cubierto por plantillas individuales).

Consideraciones teóricas:

El siguiente ejemplo calculado, mostrado en los resultados más adelante será con la plantilla colesterol sobre una partícula esférica de polímero. Se supone que el colesterol tiene un diámetro molecular de 16 Å (1.6 nm).

El área A cubierta por una diana (colesterol) puede considerarse un círculo. El área está dada por

$$A_T = \pi \times r_T^2 \quad (r_T \text{ es el radio molecular de la Diana})$$

El área de una esfera (la partícula de MIP) está dada por:

$$A_{MIP} = \pi \times d_{MIP}^2 \quad (d_{MIP} \text{ es el diámetro de la esfera de MIP})$$

Para evaluar cuánto MIP (en masa) se necesita para enlazar una cantidad suficiente de colesterol se necesita la densidad del polímero usado. La densidad elegida también se someterá a ciertos límites.

La capacidad de enlazamiento del MIP es la masa de la diana (m_T) que pueden enlazarse por una masa dada de MIP (m_{MIP}):

$$\frac{m_T}{m_{MIP}} = \frac{n_T \cdot M_w^T}{V_{part} \cdot \rho_{MIP}} = \frac{\frac{A_{MIP}}{A_T} \cdot CA \cdot M_w^T}{V_{MIP} \cdot \rho_{MIP}}$$

CA denota el área cubierta sobre la superficie de MIP por parte de la diana.

Además, esto puede reducirse a:

$$\frac{m_T}{m_{MIP}} = \frac{M_w^T \cdot CA}{N_A \cdot r_T^2 \cdot \pi \cdot r_{MIP} \cdot \rho_{MIP}}$$

- lo cual en términos matemáticos proporcionan los resultados esperados intuitivamente:

- 5 • un menor tamaño de diana proporciona una capacidad más grande
- una partícula de MIP más pequeña proporciona una capacidad más grande
- una densidad de MIP más pequeña proporciona una capacidad más grande

Descripción de la superficie de una partícula de MIP con referencia a los atributos de enlazamiento entre las partículas individuales

- 10 El número teórico de moléculas de plantilla en una partícula de MIP como una función del tamaño de la partícula puede calcularse si se hace la suposición de que las moléculas de plantilla adicionadas, normalmente 50 mM, se distribuyen de manera uniforme en el volumen total antes de la polimerización. El número de moléculas de plantilla y, por lo tanto, el número de sitios de enlazamiento posibles en un volumen dado, por ejemplo, una partícula pulverizada, puede describirse mediante una distribución estándar con una desviación estándar dada. Teóricamente
- 15 esto no influenciará la variación de partículas en que la desviación estándar entre dos sitios sobre una partícula s_x está dada por:

$$s_x^2 = \frac{\sum (\Delta r - \bar{\Delta r})^2}{n-1}$$

en la que Δr es la distancia real entre dos sitios y $\bar{\Delta r}$ es la distancia media dada entre dos sitios de enlazamiento, determinada por la distribución de moléculas de plantilla en la partícula. N representa el número de sitios de

- 20 enlazamiento sobre cada partícula. A medida que tanto $\Delta r - \bar{\Delta r}$ como n disminuyen con el tamaño de partícula decreciente, s_x no cambia por micronización de partículas. Sólo cuando la partícula es minúscula, inferior a 10^{-8} m (cf. Tabla 1), de modo que haya un promedio de menos de 1 moléculas de plantilla por partícula, habrá una gran disimilitud en las partículas. En la práctica, esta disimilitud se “extenderá” “hacia arriba” presumiblemente para incluir también partículas superiores a 10^{-8} m, pero disminuida con el creciente tamaño de partícula y en el caso de
- 25 partículas más grandes con muchos sitios de enlazamiento se vuelve insignificante.

- Por otra parte, la orientación de las moléculas de plantilla dará lugar a una disimilitud. Si la dirección longitudinal de la molécula de plantilla es orientada perpendicularmente sobre la partícula, en principio tiene sólo dos direcciones de orientación en las cuales suponemos que no dará causa a diferentes sitios de enlazamiento incluso si la molécula de
- 30 plantilla en la posición perpendicular rota alrededor de su propio eje longitudinal. Sin embargo, si la dirección longitudinal de la molécula de plantilla se orienta en paralelo con la superficie de partícula, podría dar lugar a infinitamente más sitios de enlazamiento diferentes cuando la molécula de plantilla rota alrededor de su propio eje longitudinal. En otras palabras, el número de grados de libertad (posiciones posibles que la molécula de plantilla puede ocupar) en esta situación es infinito y cada nueva orientación, como resultado de la rotación alrededor del eje longitudinal, creará en principio un sitio de enlazamiento que es disímil de todos los otros. En definitiva, esto significa
- 35 que la orientación de la molécula de plantilla da lugar a un número infinito de sitios de enlazamiento diferentes.

Estos sitios de enlazamiento pueden caracterizarse por su constante de enlazamiento, K_d , a la molécula plantilla. A pesar de que difieren, algunas orientaciones darán claramente ocasión a sitios de enlazamiento con la misma K_d , tal como se volverá claro a partir de lo siguiente.

Resultados y evaluación

- 40 Tabla 1 muestra

- Cálculos del número teórico de moléculas plantilla en una carcasa esférica de un espesor de 0,9 nm como función del tamaño de la partícula.
- Cálculo del número total de sitios de enlazamiento que puede esperarse a ser encontrado
- Cálculo del número esperado de sitios de enlazamiento con alta afinidad

- 45 Los números en las dos columnas extremas se calculan con base en observaciones publicadas (Kempe y Mosbach 1991, Ramström et al 1994, 1996 I y 1996 II, Liu, Mosbach 1997 y 1998, Andersson et al 1995). El grosor de la

carcasa esférica se selecciona como un radio del volumen dinámico que se supone tiene una molécula con una longitud de 1.8 nm, por ejemplo, colesterol (Davidson y Hayes, 2002). Normalmente, los MIP contienen 20 mmol de sitios de enlazamiento por gramo de MIPs (Kempe y Mosbach 1991, Ramström et al 1994 y 1996 I, Liu y Mosbach 1997 y 1998), pero la variación en las constantes de enlazamiento (K_d) es muy grande, desde 10^{-3} a 10^{-9} M, la cual está de acuerdo con las suposiciones antes mencionadas; la participación de sitios de enlazamiento con alta afinidad representa menos del 1 % del número total de sitios de enlazamiento (Ramström et al 1996 II, Andersson et al 1995). Por ejemplo, Ramström et al 1996 II, quien describe MIPs contra corticosteroides diferentes (por ejemplo, moléculas que muestran una similitud estructural con el colesterol) de la participación de sitios de enlazamiento de alta afinidad ($<10^{-6}$ M) que es respectivamente de 0,075 % y 0,28 %. En el cálculo para la tabla 1, se supone que el número de sitios de enlazamiento de alta afinidad es 0,5 %. En los artículos referidos aquí, el tamaño de partícula es normalmente de 25 μm . Este tamaño se logra de manera relativamente fácil mediante tratamiento del polímero en un mortero manual.

Tabla 1

Descripción de número de sitios de enlazamiento en una carcasa esférica delgada como función de tamaño de partícula.

Diámetro de partícula (m)	Número de moléculas plantilla en carcasa esférica de 0.9 nm con plantilla de 50 nM	Número de sitios de enlazamiento esperados en carcasa esférica	Número de sitios de enlazamiento de alta afinidad esperados en carcasa esférica
1,0E-04	847.784.740	373.025.285	1.865.126
1,0E-05	8.476.474	3.729.649	18.648
5,0E-06	2.118.737	932.244	4.661
1,0E-06	84 627	37.236	186
5,0E-07	21.119	9.292	46
1,0E-07	833	366	2
1,0E-08	7	3	0

En la práctica se ha encontrado que el número máximo de sitios de enlazamiento que puede lograrse con una partícula de 10 μm es de 3,7 millones (Tabla 1). Si se pulveriza una partícula de 10 μm para obtener partículas de 1 μm , cada nueva partícula de 1 μm tendrá 37 000 sitios de enlazamiento, es decir 1 % de la partícula original de 10 μm . En principio, los sitios de enlazamiento de la partícula de 10 μm se distribuyen, por lo tanto, sobre 100 nuevas partículas de 1 μm . Puesto que existe una gran cantidad de posibles sitios de enlazamiento diferentes, tiene que haber variaciones en las partículas de 1 μm recién producidas ya que cada una de ellas contiene sólo 1 % de los sitios de enlazamiento 'disímiles' que estaban presentes en la partícula de 10 μm . El mismo resultado se logra si se usa sólo la fracción de sitios de enlazamiento, es decir, 0,5 % del número total. Sin embargo, puesto que la cantidad de sitios de enlazamiento se vuelve entonces más pequeña, el efecto (descrito en la sección 1) que da lugar a muy pocos sitios de enlazamiento, seguirá contribuyendo de manera supuesta a la disimilitud entre las partículas individuales.

El límite para cuando un 'hueco' en la partícula se define como un sitio de enlazamiento es debatible, pero los sitios de enlazamiento con K_d superiores a 10^{-5} M difícilmente tienen relevancia en el uso para aplicaciones terapéuticas. Los anticuerpos monoclonales que son aprobados como fármacos en el mercado de los Estados Unidos tienen valores de K_d inferiores a 10^{-7} M (Carter 2006).

La distribución de moléculas de plantilla en las partículas (dada la desviación estándar asociada) dependerá, además, de parámetros tales como la temperatura de la mezcla durante la polimerización, viscosidad, tamaño de molécula plantilla, integración con disolvente y otros monómeros, héroe estos parámetros no son universales de la misma manera que la evaluación usada aquí para describir posición y orientación. En nuestra opinión, el uso de estos parámetros de procedimiento será de relevancia al promover las disimilitudes entre las partículas pulverizadas.

En la anterior explicación, el número de grados de libertad se refiere exclusivamente a la posición de la molécula de plantilla individual; el número de grados de libertad que están unidos a la orientación de la molécula plantilla se refleja supuestamente de manera directa sobre la distribución de sitios de enlazamiento de baja y alta afinidad. Puesto que planificamos producir composiciones de partículas de alta especificidad y capacidad, usaremos un rigor suficientemente alto en la separación de modo que sean principalmente los sitios de enlazamiento de alta afinidad los que sean clasificados y seleccionados. Es difícil de decir cuándo el número de sitios de enlazamiento relevantes, es decir de alta afinidad, alcanza un tamaño para que este parámetro (el número) también contribuya de manera decisiva a la disimilitud, pero es probable un estimado razonable de alrededor de 1 μm .

Existen procedimientos para producir partículas muy duras con canales que son suficientemente anchos para que pueda fluir un fluido a través de ellos sin limitarse a una velocidad de difusión si se desea exponer más sitios de enlazamiento de los que se encuentran disponibles inmediatamente en la superficie exterior de la partícula. Este procedimiento se explota en sistemas cromatográficos (por ejemplo, suministrados por Applied Biosystem), conocidos como matrices PorosTM, en los que es posible correr un flujo rápido sin afectar la resolución debido a que el flujo de fluido a través de las partículas es el mismo que aquel del fluido que rodea las partículas. En matrices más

tradicionales para cromatografía (es decir, no HPLC), el flujo se limita a la velocidad de difusión dentro de la partícula de matriz individual.

Si se desea explotar la peristalsis del tracto intestinal para incrementar el contacto con colesterol o ácido biliar que enlazan MIPs, las partículas con canales podrían ser una ventaja. Si se usa un gel, el 'intercambio' de fluido intestinal posiblemente se limitaría a la velocidad de difusión dentro del gel. Han sido producidos geles de MIPs, principalmente para el propósito de sistema de liberación de medicamento (por ejemplo, liberación de insulina) que actúan por la apertura de gel cuando la glucosa se enlaza a un sitio específico. Esto evidencia que en realidad también es posible producir MIPs con una estructura de gel (Wizeman y Kofinas 2001, Seong et al 2002).

Puesta en práctica del aspecto de micronización

Por consiguiente, y tal como es evidente de lo anterior, el segundo aspecto de la invención implica un procedimiento para preparar MIPs que tienen alta capacidad de enlazamiento y especificidad por una molécula diana y dicho procedimiento comprende someter un MIP crudo (es decir, un MIP polimerizado, reticulado, en el que todavía no se ha realizado una extracción sustancial de la plantilla o micronización de la estructura de MIP), el cual comprende moléculas plantillas que consiste en dicha molécula diana o una imitación de la misma, a una primera etapa de micronización para obtener un tamaño de partícula de MIP suficientemente pequeña para permitir la extracción/extracción de moléculas de plantilla, removiendo/extrayendo sustancialmente todas las moléculas de plantilla y sometiendo opcionalmente los MIP obtenidos de esta manera a una segunda etapa de micronización, en la que dicha primera etapa y opcionalmente segunda etapa de micronización proporcionan un diámetro promedio de MIP a lo sumo de 25 μm . Por lo tanto, utilizando esta estrategia se obtienen MIPs que tienen una proporción superior entre volumen y sitios de enlazamiento expuestos. Normalmente es suficiente (y más simple) utilizar sólo la primera etapa de micronización para obtener el pequeño tamaño deseado de partícula de MIP porque esto permitirá la extracción de moléculas de plantilla, pero pueden imaginarse situaciones en las que se facilite la separación de la plantilla de los MIP teniendo dos etapas de micronización separadas por una etapa de extracción de plantilla.

Se prefiere que el diámetro promedio de MIP después de la (las) etapa(s) de micronización sea inferior a 20 μm , tal como menos de 15 μm , menos de 10 μm , menos de 5 μm , menos de 1 μm , menos de 900 nm, menos de 800 nm, menos de 700 nm, menos de 600 nm e incluso menos de 500 nm, 400 nm, 300 nm y 200 nm.

En cualquier caso, se prefiere que los MIP en una composición dada después de micronización no incluyen sustancialmente partículas de más de 50 μm de diámetro (tales como más de 40, 30, 20, 10, o 1 μm en diámetro).

La micronización puede obtenerse por medio de cualquier procedimiento adecuado para minimizar el tamaño de los MIP; es decir, procedimientos tales como trituración, molienda, explosión, martilleo, molienda con bolas, crio-trituración y homogeneización por colisión, así como también cualquier combinación de tales procedimientos.

A partir de lo anterior será evidente que una forma muy importante de realización de la presente invención implica una combinación de una primera preparación de MIPs que implica la micronización a pequeño tamaño de partícula de MIP según la invención, seguida por los esquemas de purificación por afinidad detallados en la discusión del primer aspecto de la invención.

En la mayoría de los casos han sido usados MIPs para propósitos analíticos en sistemas cromatográficos o como sustituto de proteína en sensores. El tamaño de la partícula de MIP en tales aplicaciones se encuentra normalmente en el intervalo de 25 a 100 μm . Estos tamaños de MIP son, tal como se ha detallado antes, demasiado grandes para obtener la capacidad de enlazamiento deseada cuando se apunta a una composición de MIP, por ejemplo, para uso oral y, además, estos MIPs grandes no pueden seleccionarse/purificarse por medio de los procedimientos tradicionales de purificación de célula.

Por lo tanto, para obtener una capacidad adecuada el tamaño de la partícula de MIP es crítico. La manera más simple de incrementar la capacidad de una masa dada de MIP es, según lo anterior, incrementar la proporción de área a volumen; es decir, volver las partículas de MIP más pequeñas y/o mejorar el área "activa" (el área del MIP que es capaz de enlazar el analito deseado). La proporción de área a volumen aumenta a la vez que el diámetro recíproco; es decir que la mitad del diámetro dobla la proporción de área a volumen. Esto significa que puede obtenerse un incremento de 64 veces en la capacidad de enlazamiento mediante la disminución del diámetro de partícula desde 25 μm a 0,4 μm por unidad de masa de MIP.

Tabla 2: Incremento en la proporción de área a volumen como una función del diámetro de partícula. El incremento está indexado al diámetro de partícula de 25 μm

Diámetro de partícula (μm)	Índice
25,0	1
12,5	2
6,3	4
3,1	8

(continuación)	
Diámetro de partícula (µm)	Índice
1,6	16
0,8	32
0,4	64
0,2	128

Según la invención se contempla que los MIP con un diámetro en el intervalo de 0,5 µm pueden optimizarse aún más con respecto a la capacidad (fracción de enlazamiento de área) mediante una selección funcional/purificación en un sistema EBA que usa partículas del lecho acopladas a plantilla; cf. la discusión anterior del primer aspecto de la presente invención. Tales partículas de MIP se encuentran en el mismo intervalo de tamaño que las células que se conocen por estar aisladas por características de superficie en sistemas EBA. A fin de lograr el tamaño de partícula pequeño deseado, es necesario triturar/moler con múltiples procedimientos debido a los diferentes procedimientos que son óptimamente adecuados para diferentes intervalos de tamaño; cf. más adelante.

Para obtener el tamaño de partícula deseado del polímero en masa frecuentemente existe la necesidad de usar más de un procedimiento de trituración. No existe una tecnología bien día que sea universalmente capaz de moler todos los polímeros de tamaño de mm a tamaños sub-µm.

Reducir el tamaño intercalando materiales que pueden hincharse con agua, que son compatibles con el polímero y que usan un procedimiento de humectación y de congelamiento (por ejemplo, la tecnología Cryo-Grind™) puede romper el polímero de manera muy eficiente en partículas más pequeñas de ~ 200 µm. Para facilitar este procedimiento, pueden hacerse estructuras porosas en el polímero adicionando fibras (por ejemplo, celulosa, acetato de celulosa) al polímero.

Usando altas concentraciones de plantilla pueden crearse pequeños dominios de polímero que pueden proporcionar tanto una alta capacidad de enlazamiento, como también un polímero estructuralmente débil cuyo tamaño puede reducirse fácilmente.

Una reducción del tamaño subsiguiente a partículas por debajo de 1 µm puede hacerse empleando nanomolienda/trituración (por ejemplo, molinos de bolitas de NETZSCH), un procedimiento de arriba abajo que puede triturar partículas desde 20 µm hasta tamaños de 40 a 200 nm. (Estos tipos de partículas se usan frecuentemente en productos farmacéuticos).

La reducción de tamaño acelerando los MIP con la ayuda de un chorro de aire, chorro de líquido o similares y permitiendo que esta corriente de alta velocidad de los MIP y soporte golpeen una diana sólida usando fuerza de colisión para quebrar los MIP en tamaño de partícula más pequeños también sería una forma posible de reducción de tamaño de los MIP.

Finalmente, tal como se muestra en los ejemplos, el uso de la trituración física de MIPs, por ejemplo, en un mortero simple, ha demostrado ser efectivo para una cantidad de MIPs.

Otras consideraciones concernientes a la invención

Elección de polímeros para MIP

Para obtener una buena adhesión entre dos sustancias, la tensión de humectación tiene que ser baja; es decir, ninguna fuerza repulsiva tiene que actuar contra la adsorción del ligando sobre la superficie del polímero. Para elegir los materiales correctos para MIPs, se tendrán en cuenta los parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) (cf. Hansen CM) cuando deban elegirse los monómeros para un polímero adecuado.

En el caso de colesterol, el HSP se determina para el compuesto y, estudiando las tablas de polímeros, puede encontrarse que los polímeros muy hidrófugos serán una buena elección para preparar MIPs capaces de enlazar colesterol. El HSP para colesterol es (δD, δP, δH, R) = (20,4; 2,8; 9,4; 12,6) y el listado de polímeros para MIP que solapa con la esfera de HSP para colesterol es polietileno de alta densidad (HDPE) > policloruro de vinilo (PVC) > poliácridonitrilo (PAN) > polipropileno (PP) > teflón (PTFE) > poliácetato de vinilo (PVAc) > poliestireno (PS) > polimetacrilato de butilo (PBMA) > policarbonato (PC) > poliestireno-poliácido metacrílico (copolímero de PS/PMAA) > politereftalato de etileno (PETP) > poliuretano (PUR) > poliestireno-acrilonitrilo (SAN) > polimetacrilato de metilo (PMMA) > poliamida, por ejemplo, Nylon 66 > polidifluoruro de vinilideno (PVDF) > polialcohol vinílico (PVA). No todos estos polímeros se polimerizarán fácilmente juntos con un reticulante y la plantilla, pero, no obstante, la lista anterior es un punto de inicio conveniente para seleccionar monómero y reticulantes que proporcionarán al polímero mejor adecuado. También pueden hacerse co-polímeros, polímeros en bloque y co-polímeros en bloque (etc.) para emparejar el HSP para cualquier ligando dado.

Extracción de plantilla

La extracción de la plantilla de los MIP tiene que hacerse después del procedimiento de reducción de tamaño y antes de la etapa de purificación. Si se requiere enfriamiento durante el procedimiento de reducción de tamaño, los disolventes que disuelven la plantilla bien serán una elección excelente en calidad de medio refrigerante.

La extracción de la plantilla puede obtenerse mediante el uso de disolventes y mezclas de disolventes, ya sean solos o en combinación con calor y fuerza iónica incrementada o disminuida. Un procedimiento usado comúnmente es el procedimiento de extracción soxhlet en el que el MIP se lava con disolvente recién destilado (o azeótropos, si se usan mezclas) de una manera semicontinua. Si el MIP resultante (y enlazado en cruz) es termoestable (y la molécula de plantilla no lo es), puede aplicarse un procedimiento pirogénico antes de la extracción para destruir la plantilla y, por lo tanto, hacerla más fácil de extraer; por ejemplo, mediante el uso de disolventes que no se usan comúnmente para disolver la plantilla.

Hallazgos generales de los aspectos de preparación de la invención

Los presentes inventores se han dado cuenta que para preparar un MIP con alta capacidad debe usarse una combinación cuidadosamente seleccionada de preparación y micronización de MIP, extracción de plantilla y selección de los MIP aptos para el uso, con un enfoque particular en las tecnologías de micronización y selección.

Por consiguiente, si se combinan los procedimientos tradicionales para preparación y purificación de MIP con procedimientos de selección y purificación conocidos en el campo de trabajo de las células y/o proteínas, se contemplan resultados superiores.

Un ejemplo podría ser: de la tecnología de MIP "Selección de monómeros", micronización, extracción y tamizaje serán combinados con una purificación funcional tal como EBA. Clasificando las partículas de MIP según su capacidad para enlazarse a una matriz funcionalizada/superficie del lecho expandido, la tradicional producción de MIP "corriente arriba" (en dirección ascendente) se complementa con etapas de selección y purificación "corriente abajo" (en dirección descendente).

La corrida más simple por los procedimientos combinados descritos antes puede verse en la figura 2.

Ejemplos típicos de moléculas diana útiles (o moléculas plantillas) para las composiciones de MIP de la invención son aquellos encontrados en el tracto gastrointestinal, tal como en el tracto gastrointestinal humano. Las moléculas diana especialmente preferidas son aquellas que están relacionados con una patología. Moléculas diana especialmente preferidas se seleccionan de colesterol o un ácido biliar o una sal de ácido biliar, pero también sustancias tóxicas, toxinas (que incluyen toxinas bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias), así como también antígenos y receptores encontrados en patógenos, tales como bacterias, virus, hongos y parásitos son dianas/plantillas interesantes para las composiciones de MIP preparada según la invención.

Composiciones y usos farmacéuticos según la invención

La invención también se refiere una composición de MIPs insolubles en la que todos los MIP en la composición enlazan la misma molécula diana y opcionalmente la composición no incluye todos los sitios de enlazamiento para la molécula diana.

El diámetro promedio de MIP en una forma de realización es inferior a 20 μm . Se prefiere que el diámetro promedio de MIP sea inferior a 15 μm , tal como de menos de 10 μm , menos de 5 μm , menos de 1 μm , menos de 900 nm, menos de 800 nm, menos de 700 nm, menos de 600 nm, e incluso menos de 500 nm, 400 nm, 300 nm y 200 nm.

En cualquier caso, se prefiere que los MIP en una composición dada de la invención no incluyan sustancialmente partículas de más de 50 μm en diámetro (tales como más de 40, 30, 20, 10, o 1 μm en diámetro).

Las composiciones preferidas de la invención enlazan cualquiera de las moléculas diana descritas antes; es decir, los "ejemplos típicos de moléculas diana útiles" referidos anteriormente.

Las composiciones de la invención (y las composiciones preparada según el procedimiento de la invención) son útiles como productos farmacéuticos y pueden utilizarse en gran parte en la misma forma que se utilizarían las composiciones de anticuerpos. Sin embargo, debido a su estabilidad, las composiciones de MIP son adecuadas para administración oral en la que, a diferencia de los anticuerpos y muchos receptores proteínicos solubles, son estables hacia la degradación proteolítica en el intestino delgado. Además, debido al hecho de que los MIP pueden prepararse a partir de materiales que son incapaces de atravesar el epitelio gastrointestinal, son útiles para dirigir moléculas/agentes relacionados con patología los cuales se confinan al tracto gastrointestinal. Dianas adecuadas son colesterol, ácido biliar y sales de ácido biliar, pero también son posibilidades las diversas sustancias tóxicas o antígenos/ligandos encontrados en patógenos en el tracto gastrointestinal.

Sin embargo, si los MIP se preparan a partir de un polímero adecuado, biocompatible y/o biodegradable (por ejemplo, polilactida (PLA), poliglicólido (PLG)), también pueden emplearse como productos farmacéuticos parenterales en los que el peligro de aumentar una respuesta deseada contra el agente farmacéutico es reducido en comparación con la administración de, por ejemplo, anticuerpos y receptores solubles. En tales formas de

realización, virtualmente cualquier molécula diana que sea una diana adecuada para un anticuerpo o un receptor soluble podría ser la diana para una composición de MIP de la invención.

También se describe un procedimiento para tratar, mejorar o reducir el riesgo de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, del corazón, enfermedad de cálculos biliares, enfermedad de hígado colestásico, hipercolesterolemia, obesidad, infecciones que se originan de parásitos, virus o microorganismos, por ejemplo, bacterias y hongos, intoxicación que se origina de toxinas recibidas oralmente, el cual comprende administrar una cantidad efectiva de una composición de la invención o de una composición preparada según la invención a un sujeto que la necesite. La invención también concierne a tales composiciones para uso en la preparación de una preparación farmacéutica para el tratamiento, profilaxis o mejoramiento de enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad de cálculos biliares, enfermedad de hígado colestásico, hipercolesterolemia, obesidad, infecciones que se originan de parásitos, virus o microorganismos tales como bacterias y hongos, o intoxicación que se origina de toxinas dadas oralmente. Normalmente se contempla una administración oral.

La dosificación diaria esperada de una composición de MIP de la invención o preparada según la invención es a lo sumo de 40 g por día, pero debido a la alta capacidad de direccionamiento de las composiciones de MIP, se contemplan dosis diarias más pequeñas, tales como a lo sumo 30 g por día, 20 g por día, 10 g por día, 5 g por día, y 1 g por día.

Los MIP pueden formularse según procedimientos estándar conocidos por la persona versada en la técnica, especialmente formulados para uso oral, en los que se espera que los MIP se administren en forma de polvos, emulsiones, emulsiones encapsuladas, pastillas y tabletas, pero también como ingredientes en productos alimenticios en los que los MIP puedan aparecer dispersados en virtualmente cualquier alimento o productos alimenticios.

Para la formulación de MIPs en tales composiciones se hace referencia general a Mark Gibson, CRC press, 2001.

Por supuesto, las composiciones de MIP según la invención y preparadas según la invención pueden usarse en todos los tipos de aplicaciones en las que se hayan sugerido MIPs como contrapartes específicas de enlazamiento en la técnica anterior. Por lo tanto, a pesar de que la presente invención se enfoca en usos médicos de las composiciones de MIP de la invención, esto no excluye el uso de las composiciones de MIP actualmente divulgadas en dispositivos analíticos y procedimientos conocidos per se. Por consiguiente, la presente invención también incluye dentro de su alcance un procedimiento para la determinación cuantitativa o cualitativa de una molécula diana en una muestra y el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con una composición de la invención o preparada según la invención en la que los MIP en la composición enlazan específicamente la molécula diana y, a continuación, realizar una evaluación cuantitativa o cualitativa de la molécula diana que enlaza a dicha composición. En este contexto, las divulgaciones referidas anteriormente se refieren a la preparación general y al uso de MIPs.

Preámbulo a los ejemplos

Procedimiento general para hacer polímeros molecularmente impresos

La preparación de los MIP sigue el procedimiento de reacción general de mezclar el monómero funcional con la molécula de impresión y el monómero de reticulación en un disolvente adecuado. La elección del monómero se hace según su capacidad para coordinar la molécula de impresión y es rutinario para la persona versada en la técnica. La polimerización comienza adicionando un iniciador en una concentración adecuada, seguido por una perturbación con, por ejemplo, luz UV (para iniciadores UV) o calor (para iniciadores disociables con calor).

Después de la polimerización, el polímero (frecuentemente) rígido y crujiente es micronizado al tamaño deseado y las moléculas de impresión, los monómeros no enlazados y agentes de reticulación y sobras del iniciador se extraen mediante extracción ya sea mediante lavado directo y/o con ayuda del reflujo del disolvente durante un período dado de tiempo.

Ejemplo 1

MIP con fluoresceína en calidad de plantilla

En un matraz de 100 ml se mezclan 1,4 ml del monómero ácido metacrílico (MAA), 9,5 ml de ácido etilenglicoldimetacrílico (EGDMA), 50 mg de fluoresceína y 10 ml de tetrahidrofurano (THF) en un baño de agua caliente (aproximadamente de 40°C) durante 30 min. Se agregan lentamente 2 g de 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ACHCN). Después de la disolución se purga la solución con Ar (saturado con THF) durante 15 min. La polimerización es iniciada mediante luz UV continua (365 nm, 9W) durante 48 horas. El polímero resultante es crujiente amarillento y se microniza en un mortero manual a tamaño de partícula entre 10 µm y 25 µm. El polvo se somete a reflujo en THF durante 30 minutos y se lava y se filtra varias veces en etanol/THF (75:25). El polvo blanco se deja secar al aire.

Ejemplo 2MIP con ácido cólico como plantilla

En un matraz de 100 ml, se mezclan 1,4 ml del monómero ácido metacrílico (MAA), 9,5 ml de ácido etilenglicoldimetacrílico (EGDMA), 2 g de ácido cólico y 12 mL de tetrahidrofurano (THF) en un baño de agua caliente durante 30 minutos. Lentamente se adicionan 0,2 g de 2,2'-azobisisobutironitrilo/2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN). Después de la disolución, la solución se purga con Ar durante 15 min. La polimerización es iniciada por medio de luz UV continua (365 nm, 9W) durante 24 horas en un baño de hielo. El polímero resultante es amarillento, duro y es micronizado en un mortero manual a tamaño de partícula entre 25 µm y 50 µm. El polvo se somete a reflujo en THF durante 30 minutos (una vez) y se lava y se filtra cuatro veces en etanol/THF (75:25). El polvo blancuzco se deja secar al aire por una noche.

Ejemplo 3MIP con ácido cólico en calidad de plantilla

En un matraz de 100 ml se mezclan 2,8 ml del monómero ácido 2-(dimetilamino)-etilmetacrílico (DMA-EMAA), 9,5 ml de ácido etilenglicoldimetacrílico (EGDMA), 2 g de ácido cólico y 12 ml de tetrahidrofurano (THF) en un baño de agua caliente durante 30 minutos. Lentamente se agregan 0,8 g de 2,2'-azobisisobutironitrilo/2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN). Después de la disolución, la solución expurgada con Ar durante 15 minutos. La polimerización es iniciada mediante luz UV continua (365 nm, 9W) durante 24 horas en un baño de hielo. El polímero resultante es blancuzco, crujiente y es micronizado en un mortero manual a tamaño de partícula entre 10 µm y 25 µm. El polvo se somete a reflujo dos veces en THF durante 30 - 60 min y se lava y se filtra tres veces en etanol/THF (75:25). El polvo blanco se deja secar al aire por una noche.

Ejemplo 4Capacidad de enlazamiento de partículas de MIP individuales

Para evaluar las diferencias en la capacidad de enlazamiento/especificidad entre las partículas de MIP en el polvo se configuró un experimento de enlazamiento en su forma más simple. Los MIPs del ejemplo 1 fueron ensayados para capacidad de enlazamiento hacia fluoresceína.

Se suspendieron 1,9 mg de MIP con respecto a fluoresceína en 380 ml de etanol (96 %), se suplementó con 5 ml de solución de fluoresceína (0,05 mg/ml en etanol) y se mezcló durante 5 minutos. La suspensión fue centrifugada y se extrajo el sobrenadante. Las partículas se lavaron luego tres veces con 300 ml de etanol. Las partículas lavadas fueron esparcidas sobre una placa de vidrio de microscopio y se hizo el análisis de capacidad contando visualmente las partículas en luz blanca (todas las partículas) y las partículas que mostraban fluorescencia verde (partículas de MIP de enlazamiento) cuando se expusieron a la luz UV (365 nm). Debido al uso de la luz UV no fueron necesarios filtros de emisión para ver la fluorescencia verde.

Las imágenes mostradas en la figura 4 es una imagen superpuesta de las dos imágenes tomadas con luz blanca y luz UV. Las manchas blancas son partículas iluminadas con luz blanca y las manchas negras son las partículas fluorescentes verdes iluminadas con UV. De la figura 4 es evidente que las partículas iluminadas con luz blanca (manchas blancas) sobrepasan en número las partículas fluorescentes verdes visibles cuando se exponen a la luz UV (manchas negras). La diferencia en número de partículas visibles bajo las dos fuentes diferentes de luz demuestra que la micronización de un MIP da lugar a la provisión de una población de partículas de MIP de enlazamiento y una población de partículas de MIP de no enlazamiento (= restos); por lo tanto, una selección de las partículas de MIP de enlazamiento con base en propiedades de afinidad incrementará efectivamente la capacidad de enlazamiento medida como la capacidad para enlazar la plantilla usada por unidad de peso del MIP empleado.

La imagen mostrada no es capaz de ilustrar nuestra observación de que las partículas fluorescentes verdes exhiben diferentes grados (intensidad) de fluorescencia verde no correlacionada con el tamaño de partícula. Esta observación corresponde a diferencias en la capacidad de enlazamiento entre diferentes partículas de MIP de enlazamiento. Esta diferencia de intensidad (fluorescencia) ilustran nuevamente que las partículas de MIP no tienen una capacidad diferente de enlazamiento; por lo tanto, puede incrementarse la capacidad del MIP seleccionando las partículas de MIP con la intensidad de fluorescencia más alta (en este ejemplo).

Para concluir sobre esto, el presente ejemplo demuestra que la capacidad de enlazamiento de una composición de partículas de MIP puede incrementarse extrayendo partículas no enlazantes. La capacidad de enlazamiento puede mejorarse aún más mediante el enriquecimiento para partículas de MIP que tienen alta afinidad y/o múltiples bolsillos de enlazamiento expuestos que enlazan la molécula diana.

Lista de referencias

- 1) Yu Cong, Ph.D-thesis: "Molecular Recognition Studies Based on Imprinting Technology", Dept. of Pure and Applied Biochemistry, Universidad de Lund, Suecia 1998.

- 2) Leif Schweitz, tesis de Ph-D: "Molecular Imprinted Matrices for Electrochromotography", Technical Analytical Chemistry, Universidad de Lund, Suecia 2001,
- 3) Ioana Wärmarm-Surugiu, tesis de Ph.D: "Antibodies and Antibody Mimics in Binding Assays", Dept. of Pure and Applied Biochemistry, Universidad de Lund, Suecia 2002,
- 5 4) Dickey FH, "The preparation of specific absorbents" Proc. Natl. Acad. Sci. 35(1949)227-229,
- 5) Ramström O et al J. Mol. Recog. 9(1996)691-696
- 6) Schweitz L et al J Chromatog. A 792(1997)401-409
- 7) Vlatakis G et al "Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting" Nature 361(1993)645-647
- 10 8) Funke, W. et al, Adv. Polym. Sci. 136(1998) 139-243
- 9) Van Reis y Zapata US 6,027,650
- 10) Lihme A et al US 6,620,326
- 11) Ujam et al Biotechnol Bioeng 83(2003)554-66, Isolation of monocytes from human peripheral blood...
- 12) Chase J. Mol. Recognit 11(1998)217-221
- 15 13) Pla et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(2000)381-5
- 14) Rodgers et al Ann. NY. Acad. Sci. 849(1998)282-92
- 15) Hansen CM, "Hansen Solubility Parameters, A Users Handbook CRC Press (ISBN 0-8493-1525-5)
- 16) Shea KJ y Dogherty TK, J. Am. Chem. Soc. 108(1986)1091-1093
- 17) Shea KJ, Stoddard GJ, Shavelle DM, Wakui F y Choate RM Macromolecules 23(1990)4497-4507
- 20 18) Wulff G y Poll HG Makromol. Chem. 188(1987)741-748
- 19) Sellergren, B. et al. (1998), Chem. Mater. 10; 4037-46
- 20) Whitcombe, MJ. et al (1995) J. Am. Chem. Soc. 117; 7105-11
- 21) Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form, Mark Gibson, CRC press, 2001
- 25 22) Kempe y Mosbach (1991), Anal. Lett. 24, 1137-45
- 23) Ramström et al (1994), Tetrahedron: Asymmetry 5, 649-56
- 24) Ramström et al (1996 I), J. Mol. Recog. 9, 691-6
- 25) Ramström et al (1996 II), Chem. Biol. 3, 471-7
- 26) Liu y Mosbach (1997), Macromol. Rapid. Commun. 18, 609-25
- 30 27) Liu y Mosbach (1998), Macromol. Rapid. Commun. 19, 671-4
- 28) Davidson y Hayes (2002), Current. Org. Chem. 6, 265-281
- 29) Andersson et al (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 4788-92
- 30) Carter (2006), Nat. Rev. Immunol. 6, 343-57
- 31) Wizeman y Konfinas (2001), Biomat. 22, 1485-91
- 35 32) Seong et al (2002), J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 13, 637-49

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una composición que comprende polímeros de impresión molecular (MIPs) que tienen alta capacidad de enlazamiento y especificidad para una molécula diana, y dicho procedimiento comprende
 - 5 a) obtener una suspensión de MIPs insolubles que enlazan la molécula diana y que han sido preparados usando la molécula diana o una imitación de la misma en calidad de molécula plantilla,
 - b) someter los MIP suspendidos a un procedimiento de purificación por afinidad, en el que la molécula plantilla o un fragmento de la misma o una imitación de la misma se usan como agente de captura,
 - 10 c) recuperar los MIP que enlazan el agente de captura en el procedimiento de purificación por afinidad mientras sustancialmente del producto recuperado se excluye el agente de captura y los MIP que no enlazan el agente de captura, y
 - d) combinar los MIP recuperados y opcionalmente un soporte, vehículo o diluyente para obtener dicha composición.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de captura se acopla de modo covalente o no covalente a una fase sólida tal como una fase sólida seleccionadas del grupo que consiste en matrices de carbohidratos enlazados cruzados, polímeros sintéticos o combinaciones de los mismos.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de captura consiste en o parte de una entidad química soluble.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el agente de captura se acopla de modo covalente uo covalente a una porción seleccionada de un dendrímero, un carbohidrato sustituido y un polímero sustituido soluble tal como polialcohol vinílico y polietilenglicol para exponer agentes de captura múltiples por entidad química soluble.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de captura sólo enlaza a una fracción de sitios de enlazamiento en los MIP de la etapa a) que enlazan la molécula plantilla, de modo como cuando el agente de captura es un fragmento de la molécula plantilla.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de captura comprende la molécula plantilla, o una imitación de la misma o un fragmento del mismo, enlazada a una superficie sólida o porción, cualquiera que sea aplicable, en una orientación específica para impedir sustancialmente la exposición a los MIP de una parte del agente de captura, o como alternativa en una orientación no específica de modo que sustancialmente todas las partes del agente de captura estén expuestos a los MIP.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento de purificación por afinidad se selecciona del grupo que consiste en adsorción de lecho expandido (EBA), separación por bolitas paramagnéticas, purificación por fibra hueca y aglutinación.
8. Un procedimiento de preparación de MIPs que tienen alta capacidad de enlazamiento y especificidad para una molécula diana y dicho procedimiento comprende someter un MIP crudo que comprende moléculas de plantilla que consisten en dicha molécula diana, o una imitación de la misma, a una primera etapa de micronización para obtener un tamaño de partícula de MIP suficientemente pequeño para permitir la extracción de moléculas de plantilla, retirar sustancialmente todas las moléculas de plantilla y opcionalmente someter los MIP obtenidos de esta manera a una segunda etapa de micronización en el que dicha primera etapa y opcionalmente segunda etapa de micronización proporcionan un diámetro promedio de MIP a lo sumo de 50 μm y, a continuación, someter los MIP obtenidos de esta manera al procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula Diana es una molécula encontrada en el gastrointestinal, tal como en el tracto gastrointestinal humano.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula diana se selecciona de colesterol, un ácido biliar y una sal de ácido biliar.
11. Una composición de MIPs insolubles en la que todos los MIP en la composición enlazan la misma molécula diana y, opcionalmente, la composición no incluye todos los sitios de enlazamiento para la molécula diana.
12. La composición según la reivindicación 11, en la que el diámetro promedio de MIP es inferior a 20 μm .
13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en la que los MIP en la composición enlazan colesterol, ácido biliar pozal de ácido biliar.
14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 11-13 para su uso como un producto farmacéutico.

15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 para su uso en el tratamiento, profilaxis o mejoramiento de enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, enfermedad de cálculos biliar, enfermedad de hígado colestásico, hipercolesterolemia, obesidad, infecciones que se originan de parásitos, virus o microorganismos tales como bacterias y hongos, o intoxicación originada por toxinas recibidas oralmente.

5 16. La composición para el uso según la reivindicación 15 para tratamiento mediante administración oral.

17. Un procedimiento de determinación cuantitativa o cualitativa de una molécula diana en una muestra y el procedimiento comprende

10 poner en contacto la muestra con una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 o una composición preparada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que los MIP en la composición enlazan específicamente la molécula diana y, a continuación,

realizar una evaluación cuantitativa o cualitativa de la molécula diana que se enlaza a dicha composición.

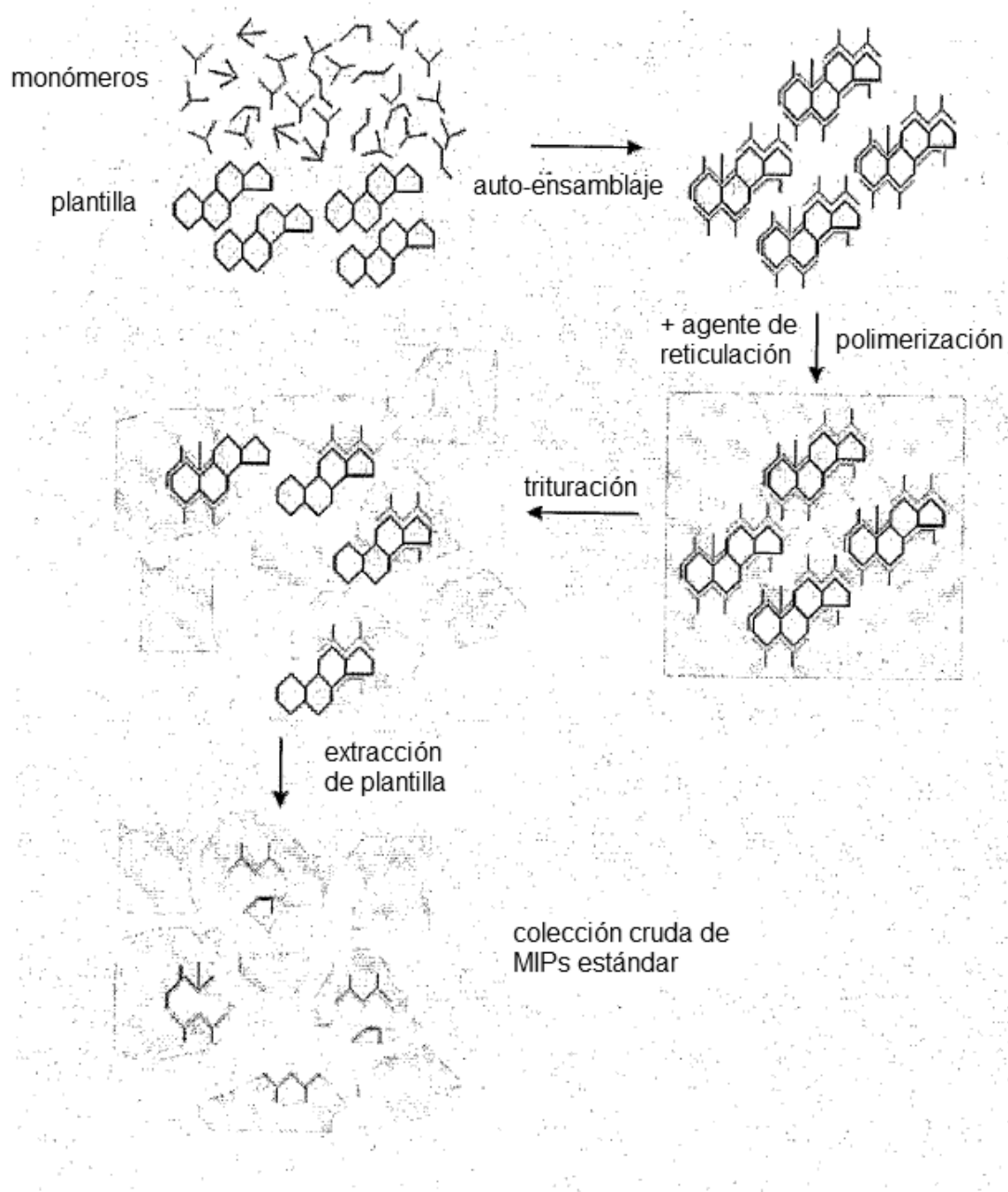


Fig 1

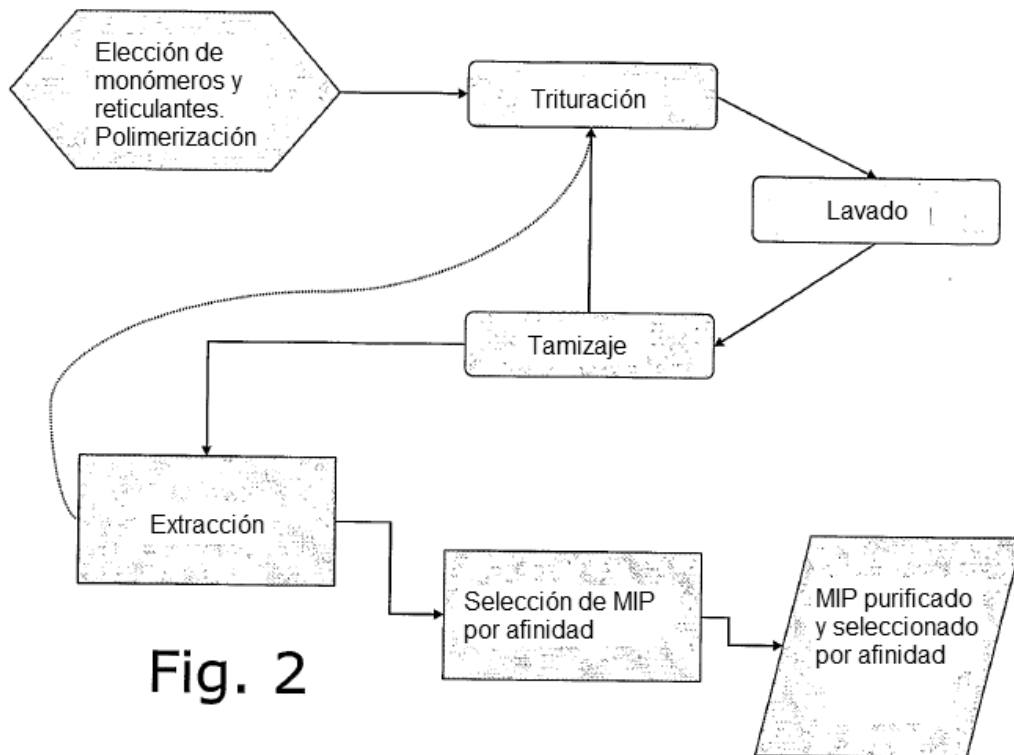


Fig. 2

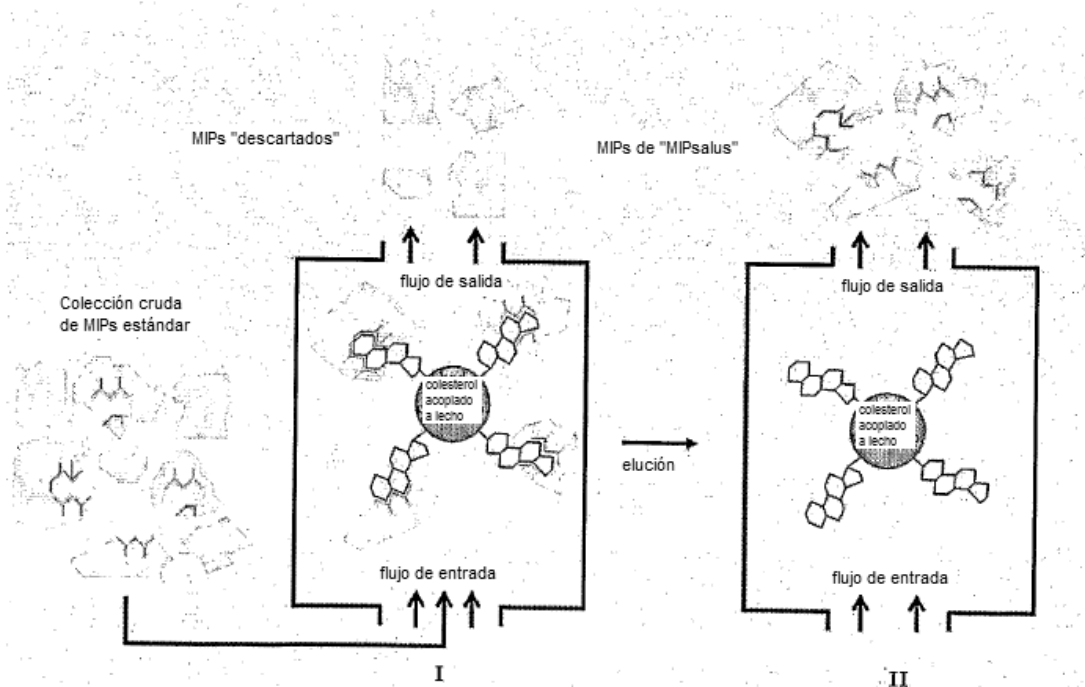


Fig. 3

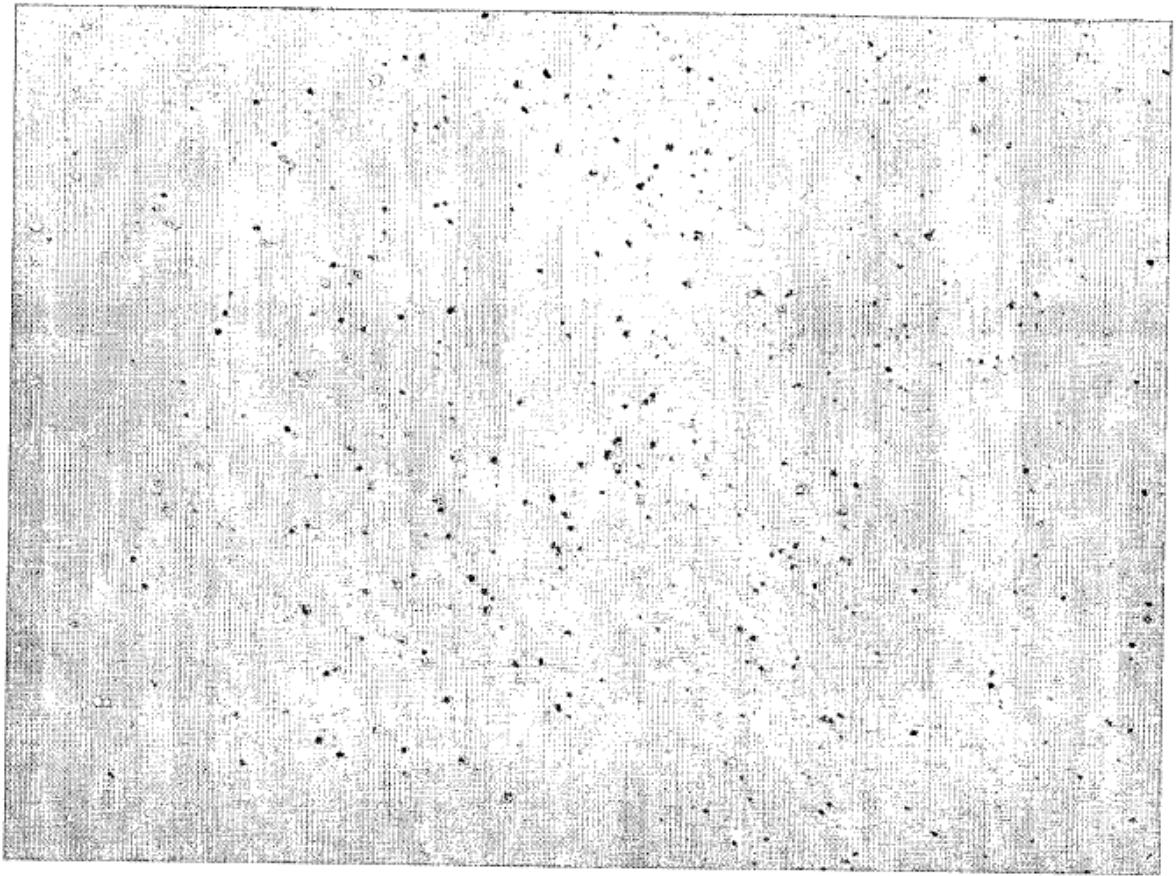


Fig. 4