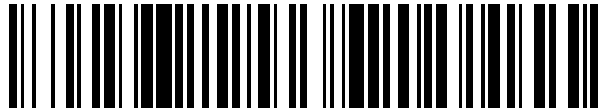


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 782**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
A61K 47/69	(2007.01)
C08G 83/00	(2006.01)
C08G 85/00	(2006.01)
B01J 13/14	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)
C11D 17/00	(2006.01)
C08B 37/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2012 PCT/GB2012/051787**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13014452**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2012 E 12761759 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2736962**

54 Título: **Cápsulas supramoleculares**

30 Prioridad:

26.07.2011 GB 201112893
08.02.2012 GB 201202127

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2020

73 Titular/es:

CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools Trinity Lane Cambridge
Cambridgeshire CB2 1TS, GB

72 Inventor/es:

SCHERMAN, OREN ALEXANDER;
COULSTON, ROGER;
ABELL, CHRISTOPHER y
ZHANG, JING

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 755 782 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

Cápsulas supramoleculares

Prioridad

5 Esta solicitud reivindica prioridad de GB 1112893.1 presentada el 26 de julio de 2011 y GB 1202127.5 presentada el 08 de febrero de 2012.

Campo de la invención

Esta invención se refiere a cápsulas, particularmente microcápsulas, basadas en una red entrecruzada con cucurbiturilo, y métodos para la preparación de tales cápsulas, y su uso en métodos de suministro de componentes encapsulados.

10 Antecedentes

La microencapsulación de un componente por microesferas huecas autoensambladas es uno de los aspectos importantes de la nanotecnología y la ciencia de los materiales. El control sobre la forma y composición de la estructura de soporte, parámetros que influyen en las propiedades del material, es importante para muchas aplicaciones, como diagnósticos, administración de medicamentos, pantallas electrónicas y catálisis (véase Ke et al. *Angew. Chem.* 2011, 123, 3073; De Cock et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6954; Yang et al. *Angew. Chem.* 2011, 123, 497; Comiskey et al. *Nature* 1998, 394, 253; Peyratout et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 3762). La preparación de microcápsulas poliméricas convencionales se realiza a través de un esquema capa por capa (L-b-L), donde un soporte sólido se recubre mediante la adición secuencial de una serie de capas de polielectrolitos con carga opuesta (véase Caruso et al. *Science* 1998, 282, 1111; Donath et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2201). Esta estrategia proporciona un material uniforme, pero sufre de eficiencias de encapsulación reducidas debido a la plantilla sólida. Un método alternativo utiliza la plantilla de emulsión coloidal donde las interfases líquido-líquido impulsan el autoensamblaje de los componentes de la cubierta (véase Cui et al. *Adv. Funct. Mater.* 2010, 20, 1625). Sin embargo, es difícil controlar la monodispersidad y la diversidad de material de las microcápsulas resultantes, lo que limita su funcionalidad en las aplicaciones de suministro y detección de fármacos.

25 Por el contrario, las gotas de microfluidos, un subconjunto de emulsión coloidal, han demostrado ser muy prometedoras para la fabricación de microcápsulas (véase Gunther et al. *Lab Chip* 2006, 6, 1487; Huebner et al. *Lab Chip* 2008, 8, 1244; Theberge et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5846). Estas gotas de distribución de tamaño estrecha (índice de polidispersidad <2%) se pueden generar a una frecuencia extremadamente alta con el uso económico de reactivos (véase Xu et al. *AIChE Journal* 2006, 52, 3005). Los esfuerzos iniciales para preparar cápsulas basadas en la fabricación asistida por microgotitas se han centrado en la separación de fases utilizando doble emulsión y plantilla de núcleo de cristal líquido (véase Utada et al. *Science* 2005, 308, 537; Priest et al. *Lab Chip* 2008, 8, 2182). La formación de paredes de cápsulas poliméricas también se ha descrito en un enfoque que implica el tratamiento de la superficie del dispositivo para microfluidos y las técnicas de polimerización rápida (véase Zhou et al. *Electrophoresis* 2009, 31, 2; Abraham et al. *Advanced Materials* 2008, 20, 2177). La pared se forma a medida que el disolvente se evapora de las gotas de disolvente orgánico formadas. También se ha informado recientemente sobre cápsulas de estructura organometálica (véase Ameloot et al. *Nat. Chem.* 2011, 3, 382). Sin embargo, con las actuales estrategias de entrecruzamiento iónico o covalente, el principal desafío en la fabricación de cápsulas radica en la producción simultánea de cápsulas uniformes con altas eficiencias de carga y fácil incorporación de diversas funciones en la cubierta de la cápsula. El documento WO 2009/071899 describe polímeros supramoleculares que comprenden una molécula polimérica unida a una primera molécula huésped CB[8] y un compuesto de unión unido a una segunda molécula huésped CB[8].

45 Los presentes inventores han establecido ahora una cápsula basada en una red hospedero-huésped basada en cucurbiturilo. El diseño de microestructuras utilizando multivalencia y cooperatividad a través del reconocimiento molecular proporciona una oportunidad sin igual en la fabricación de microcápsulas con interacciones y funcionalidades personalizables. Sin embargo, los esfuerzos en la preparación de microcápsulas usando el enfoque hospedero-huésped supramolecular, como se describe en el presente documento, son escasos (véase De Cock et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6954).

50 Divulgaciones anteriores incluyen una microcápsula coloidal que comprende β -ciclodextrina y nanopartículas de oro modificadas (AuNP) preparadas mediante plantillas de emulsión (Patra et al., *Langmuir* 2009, 25, 13852), y una microcápsula que comprende polímeros funcionalizados con ciclodextrina y ferroceno preparados usando una síntesis L-b-L (Wang et al., *Chemistry of Materials* 2008, 20, 4194).

Resumen de la invención

La presente invención en general proporciona cápsulas que tienen una cubierta de material que es una red entrecruzada supramolecular. La red se forma a partir de una complejación hospedero-huésped de cucurbiturilo (el hospedero) y uno o más bloques de construcción que comprenden la funcionalidad adecuada del huésped. El complejo se entrecruza no covalentemente con el bloque de construcción y/o enlaza no covalentemente el bloque de construcción a otro bloque de construcción formando así la red.

En un aspecto general, la presente invención proporciona una cápsula que tiene una cubierta obtenible de la formación de complejos de cucurbiturilos con moléculas huésped adecuadas.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona una cápsula que tiene una cubierta que es un complejo de un hospedero y uno o más bloques de construcción que tienen una funcionalidad de huésped hospedero adecuada para formar una red entrecruzada supramolecular, en donde el hospedero es cucurbiturilo, y el o más bloques de construcción tienen una funcionalidad huésped hospedero adecuada para el hospedero de cucurbiturilo, en donde un primer bloque de construcción es una molécula polimérica, preferiblemente la molécula polimérica es o comprende un poli(met)acrilato, un poliestireno y/o un polímero de poli(met)acrilamida, y opcionalmente la molécula polimérica comprende un marcador detectable.

En una realización, la cubierta es un complejo de (a) una composición que comprende cucurbiturilo y (1) o (2); o (b) una composición que comprende una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente y (1), (2) o (3).

En una realización, la cubierta es un complejo de una composición que comprende cucurbiturilo y (1) o (2).

En una realización, la cubierta es un complejo de una composición que comprende cucurbiturilo y (1).

(1) comprende un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped cucurbiturilo y un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de segundas moléculas huésped cucurbiturilo, en donde una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario.

(2) comprende un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped cucurbiturilo y una pluralidad de segundas moléculas huésped cucurbiturilo, en donde una primera y una segunda molécula huésped junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario. Opcionalmente, la composición comprende además un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una o más moléculas del tercer huésped cucurbiturilo, una o más moléculas del cuarto huésped cucurbiturilo o ambas, en donde una tercera y una cuarta molécula junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario, y/o la primera y cuarta moléculas junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario, y/o la segunda y tercera moléculas junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario;

(3) comprende un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped de cucurbiturilo, en donde la primera molécula huésped junto con el cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped binario. Opcionalmente, la composición comprende además un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una o más segundas moléculas huésped de cucurbiturilo, en donde la segunda molécula huésped junto con el cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped binario.

En una realización, el cucurbiturilo se selecciona de CB[8] y variantes y derivados del mismo.

En una realización, el cucurbiturilo forma un complejo ternario con moléculas huésped adecuadas, por ejemplo, con las moléculas huésped primera y segunda.

En una realización, la cápsula es una microcápsula.

En una realización, la cápsula encapsula un componente.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para la preparación de una cápsula que tiene una cubierta, tal como la cápsula del primer aspecto de la invención, comprendiendo el método la etapa de:

(i) poner en contacto un flujo de una primera fase y un flujo de una segunda fase en un canal, para generar en el canal una dispersión de regiones discretas, preferiblemente gotitas, de la segunda fase en la primera fase, en donde la segunda fase comprende cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción que tienen una funcionalidad huésped adecuada para cucurbiturilo que forma una red entrecruzada supramolecular, para formar así una cubierta de cápsula dentro de la región discreta, en donde las fases primera y segunda son inmiscibles.

En una realización, la segunda fase comprende (a) un cucurbiturilo y (1) o (2); o (b) una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente y (1), (2) o (3).

En una realización, una de la primera y segunda fases es una fase acuosa y la otra fase es una fase inmiscible con agua.

En una realización, la segunda fase es una fase acuosa. La primera fase es una fase inmiscible con agua, por ejemplo, una fase oleosa.

5 En una realización, la primera fase es una fase acuosa. La segunda fase es una fase inmiscible con agua, por ejemplo, una fase oleosa.

En una realización, el método comprende además la etapa de (ii) recoger el flujo de salida del canal, para obtener así una gota, que contiene una cápsula.

10 En una realización, el método comprende la etapa (ii) anterior y (iii) opcionalmente secar la cápsula obtenida en la etapa (ii).

En una realización, el canal es un canal para microfluidos.

En una realización, el flujo de la segunda fase se pone en contacto con el flujo de la primera fase sustancialmente perpendicular a la primera fase. En esta realización, la estructura del canal puede ser una geometría de unión en T.

15 En una realización, el flujo de la segunda fase comprende además un componente para la encapsulación, y la etapa (i) proporciona una cápsula que tiene una cubierta que encapsula el componente.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método no terapéutico para administrar un componente a una ubicación, comprendiendo el método los pasos de:

(i) proporcionar una cápsula que tiene una cubierta que encapsula un componente de acuerdo con el primer aspecto de la invención;

20 (ii) dirigir la cápsula a una ubicación objetivo;

(iii) liberar el componente de la cubierta.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una cápsula que encapsula un componente para usar como medicamento.

Resumen de las figuras

25 La Figura 1 (a) es una representación esquemática del proceso de generación de microgotitas utilizando un dispositivo de enfoque de flujo de microfluidos, que consiste en la fase continua de aceite, perpendicular a una combinación de soluciones acuosas de CB[8] 1, MV²⁺-AuNP 2 y Np-pol 3 como la fase dispersa. (b) Imagen microscópica y representación esquemática de la región de enfoque de flujo, con un canal de mezcla corriente abajo que permite una mezcla completa de reactivos en línea. (c) La alta monodispersidad de las gotas de microfluidos se demuestra por su estrecha distribución de tamaños.

30

Figura 2 (a) Imágenes de campo claro de la etapa tardía del proceso de formación de la cápsula a medida que el agua se evapora, produciendo una microcápsula colapsada. Barra de escala = 5 μm . (b) Imagen de microscopio óptico de las cápsulas explotadas que muestran las unidades estructurales de la cubierta de la cápsula. Barra de escala = 10 μm . (c) Imagen SEM de una cápsula seca y al menos parcialmente colapsada. Barra de escala = 2 μm . (d) Imagen TEM de la cubierta de la microcápsula, que muestra AuNP de 5 nm dispersos en una malla de polímero. Barra de escala = 10 nm. (e) Representación esquemática del proceso de formación de microcápsulas propuesto desde la gota inicial (con diámetro d) hasta la cápsula estable deshidratada (con diámetro d'). También se propone la estructura de entrecruzamiento de 1 y 2 para el material de la cápsula.

35

Figura 3 (a) Estructura química y representación esquemática de NP-RD-pol 4. (b) Imagen LSCM de gotas que contienen soluciones acuosas de Np-RD-pol, CB[8] y MV-AuNP, y el perfil de intensidad de fluorescencia. Barra de escala = 40 μm . (c) Imagen LSCM de una gota (46 μm de diámetro) que contiene soluciones acuosas de Np-RD-pol, CB[8], MV-AuNP y FITC-dextrano y el perfil de intensidad de fluorescencia correspondiente. Barra de escala = 7.5 μm . (d) Imagen LSCM de una gota (23 μm de diámetro) que contiene soluciones acuosas de Np-Rd-pol, CB[8], MV-AuNP y FITC-dextrano y el perfil de intensidad de fluorescencia correspondiente. Barra de escala = 10 μm .

40

45

La Figura 4 son las imágenes de campo claro y de fluorescencia de microcápsulas secas que contienen FITC-dextrano antes y después de la rehidratación, mostrando (a) la expansión de la pared de la microcápsula acompañada por la fuga de FITC-dextrano (10 kDa), (b) la retención del FITC-dextrano (500 kDa). Barras de escala = 20 μm .

Figura 5 (a) Representación esquemática del efecto propuesto de la reducción de MV^{2+} en el complejo ternario $\text{CB}[8]:\text{MV}^{2+}\text{-AuNP}$: Np-pol , y la formación resultante de $2:1 (\text{MV}^{2+}\text{-AuNP})_2\text{-CB}[8]$ complejo. (b) Las imágenes de fluorescencia del proceso de desintegración del material de la pared de la microcápsula en una solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y en H_2O durante 12 h en un entorno de N_2 a 25°C . Barras de escala = 5 μm .

Figura 6 (a) Representaciones esquemáticas de las microcápsulas con y sin $\text{MV}^{2+}\text{-AuNPs}$ (5 nm y 30 nm). Para el control negativo, se usó $\text{MV}^{2+}\text{-pol}$ 5 en lugar de AuNP . (b) Espectros SERS de microcápsulas vacías que consisten en $\text{MV}^{2+}\text{-pol}$, 5 nm $\text{MV}^{2+}\text{-AuNP}$ y 20 nm $\text{MV}^{2+}\text{-AuNP}$, que muestran picos característicos para $\text{CB}[8]$ y MV^{2+} (indicado con flechas). (c) Espectros SERS de microcápsulas encapsuladas con FITC-dextrano que consisten en $\text{MV}^{2+}\text{-pol}$ y 20 nm $\text{MV}^{2+}\text{-AuNP}$, que muestran picos característicos para FITC (indicado con flechas) además de los materiales de la cubierta de la cápsula. Todos los espectros se obtuvieron utilizando una línea de láser de excitación de 633 nm. (d) Mapeo SERS de la microcápsula, que muestra la localización de la señal SERS para $\text{CB}[8]$ y MV^{2+} .

La Figura 7 es el espectro de excitación de Np-RD-pol y espectros de emisión excitados a 514 nm y 544 nm.

La Figura 8 muestra la variación en el diámetro medio de las gotas en función de la relación de $Q_{\text{aceite}}/Q_{\text{ac}}$, de diversas corrientes acuosas de $Q_{\text{ac}} = 80 \mu\text{L/h}$, $100 \mu\text{L/h}$, $120 \mu\text{L/h}$ utilizando la unión en T y un canal $40 \mu\text{m}$ de ancho (línea continua), y de varias corrientes acuosas de $Q_{\text{ac}} = 40 \mu\text{L/h}$, $60 \mu\text{L/h}$, $80 \mu\text{L/h}$ utilizando unión en T y un canal de $20 \mu\text{m}$ de ancho (línea discontinua).

La Figura 9 muestra la variación en el diámetro medio de las gotas en función de la relación del aceite y la corriente acuosa, y en función de la relación de las tasas de flujo de la corriente acuosa individual.

La Figura 10 es la imagen LSCM de una gota que contiene soluciones acuosas de células *E. coli* que expresan Np-RD-pol , $\text{CB}[8]$, MV-AuNP y GFP y el perfil de intensidad de fluorescencia correspondiente.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han establecido que las cápsulas se pueden preparar con una cubierta que se puede obtener a partir de la complejación supramolecular de cucurbiturilo con bloques de construcción unidos covalentemente a las moléculas huésped de cucurbiturilo apropiadas.

Las cápsulas se forman usando técnicas de generación de gotas de fluido, entre otras. La capacidad del cucurbiturilo y los bloques de construcción para formar una cubierta es sorprendente dado el comportamiento previamente informado de dichos materiales.

El trabajo anterior de uno de los presentes inventores ha encontrado que el cucurbiturilo puede usarse para formar una red entrecruzada supramolecular a través de la complejación hospedero-huésped (véase Appel et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 14251). La red se basa en el ensamblaje supramolecular de un complejo ternario de $\text{CB}[8]$ junto con un polímero funcionalizado con viológeno de metilo (MV) y un polímero funcionalizado con naftol (Np). Sin embargo, las redes descritas aquí están en forma de hidrogeles supramoleculares. No se describen ni se sugieren las cápsulas.

Los hidrogeles se preparan mediante sonicación del polímero funcionalizado con MV junto con $\text{CB}[8]$, seguido de la adición del polímero funcionalizado con Np, con una etapa de mezcla corta posterior.

El hallazgo por los presentes inventores de que el cucurbiturilo se puede mezclar con bloques de construcción conectados a moléculas huésped apropiadas para producir una cubierta de material, por lo tanto, fue inesperado. La cápsula se puede obtener mediante el uso de técnicas de preparación de gotas fluidas y técnicas de generación de gotas a granel. El primero es particularmente beneficioso porque genera gotas que tienen una distribución de tamaños muy baja, lo que da como resultado cápsulas que tienen una distribución de tamaños muy baja. Además, los métodos de la invención permiten un control estrecho sobre la formación de la cápsula del producto. Se pueden usar cambios simples en la técnica de preparación de gotitas fluidas, tales como cambios en las tasas de flujo, para controlar el tamaño de la cápsula obtenida, el tamaño de los poros en la cubierta y el grosor de la cubierta, entre otros.

Se ha demostrado que las cápsulas de la invención son robustas y son capaces de soportar temperaturas de al menos 100°C . Las cápsulas también mantienen su integridad a presión reducida.

Las cápsulas de la invención son adecuadas para encapsular un componente. Usando las técnicas de preparación de gotas de fluido descritas en este documento, se puede construir una cubierta de cápsula en presencia del componente

que se va a encapsular. Por lo tanto, en un procedimiento, se puede formar la cubierta y encapsular el componente. Ventajosamente, por lo tanto, la cápsula puede construirse sin la necesidad de una etapa de difusión pasiva posterior después de la construcción de la cápsula. Además, el método de encapsulación permite altas tasas de incorporación del material en la cápsula y, por lo tanto, se minimiza el desperdicio de material.

5 La invención se describe ahora con más detalle con referencia a cada característica de la invención.

Cápsulas

Una cápsula de la invención comprende una cubierta de material. El material es el complejo supramolecular que se forma a partir de la formación de complejos de cucurbiturilo con bloques de construcción unidos covalentemente a la molécula huésped de cucurbiturilo apropiada. La cubierta define un espacio interno, que puede denominarse como un
10 espacio hueco, que es adecuado para contener un componente. Por lo tanto, en una realización, las cápsulas de la invención se extienden a aquellas cápsulas que encapsulan un componente dentro de la cubierta. La cubierta puede formar una barrera que limita o impide la liberación de material encapsulado dentro.

El componente puede ser liberable de la cápsula, a través de los poros que están presentes en la cubierta. En algunas realizaciones, los poros son suficientemente pequeños para evitar que se libere el componente. Por lo tanto, la red
15 que forma la cubierta se puede desmontar al menos parcialmente, permitiendo así la liberación de material desde el interior de la cubierta. Se pueden generar poros adicionales mediante la aplicación de un estímulo externo a la cubierta. En este caso, los poros pueden generarse a través de una interrupción del complejo huésped cucurbiturilo. Tal descomplejamiento, por lo tanto, crea poros a través de los cuales se pueden liberar componentes encapsulados desde dentro de la cubierta. En algunas realizaciones de la invención, el material de la cubierta puede reformarse
20 posteriormente mediante el reensamblaje de los componentes de la cubierta.

En una realización, la cápsula retiene agua dentro de la cubierta. El agua puede ser una solución acuosa que comprende uno o más de los reactivos que se usan en la preparación de la cubierta supramolecular, es decir, reactivos
25 sin reaccionar. En una realización, la solución acuosa comprende cucurbiturilo y/o (1) o (2) o (b) una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente y/o (1), (2) o (3). Dentro de la cubierta también puede estar presente una red que se forma a partir de la complejación de los reactivos que se han utilizado para generar la cubierta.

Dentro de la cubierta se puede proporcionar un material encapsulado, que se puede proporcionar además del agua y los reactivos que se usan en el ensamblaje supramolecular de la cubierta.

Cuando se dice que la cápsula encapsula un componente, se entiende que este componente encapsulado puede estar presente dentro del espacio interno definido por la cubierta. En una realización, el encapsulante también está presente,
30 al menos parcialmente, dentro de los poros de la cubierta.

La presencia de un componente dentro de la cubierta y/o dentro de los poros de la cubierta puede determinarse usando técnicas analíticas adecuadas que sean capaces de distinguir el material de la cubierta y el encapsulante. Por ejemplo, cada uno de los materiales de la cubierta y el componente pueden tener una etiqueta detectable o una funcionalidad
35 adecuada que sea independientemente detectable (ortogonal) a la etiqueta o funcionalidad del otro. En una realización, cada uno de la cubierta y el componente tiene una etiqueta fluorescente ortogonal. Por ejemplo, una tiene una etiqueta de rodamina y el otro tiene una etiqueta de fluoresceína. Las técnicas de microscopía confocal de escaneo con láser se pueden usar para detectar independientemente la fluorescencia de cada etiqueta, ubicando así cada una de las capas y encapsulantes. Cuando las señales del componente se ubican en el mismo punto que las señales de la cubierta, se entiende que el componente reside dentro de un poro de la cubierta.

La forma general de la cubierta, y por lo tanto la forma de la cápsula, no está particularmente limitada. Sin embargo, en la práctica, la forma de la cápsula puede ser dictada por su método de preparación. En los métodos de preparación descritos en este documento, se puede preparar una cubierta de cápsula usando técnicas de formación de gotitas fluidas. Típicamente, el material de la cubierta se forma en el límite de una fase discreta (o discontinua) en una fase
40 continua. Por ejemplo, una fase puede ser una fase acuosa, y la otra puede ser una fase inmiscible con agua. La región discreta puede ser una gotita, que tiene una forma sustancialmente esférica. La cubierta formada es, por lo tanto, también sustancialmente esférica.

En ciertas realizaciones, se puede obtener una cápsula cuando la cubierta tiene una forma sustancialmente esférica. Esta cápsula puede someterse a una etapa de secado, que reduce la cantidad de disolvente (por ejemplo, agua) dentro y alrededor de la cápsula. Como resultado de este paso, la cápsula se encoge de tamaño. Al principio, la
50 cubierta mantiene una forma sustancialmente esférica. Después de un secado adicional, la esfera de la cápsula puede colapsar parcialmente o por completo sobre sí misma. La integridad estructural de la cápsula se mantiene y la cubierta simplemente se distorsiona para acomodar los cambios en el volumen interno. Por lo tanto, las cápsulas de la invención incluyen aquellas cápsulas donde la cubierta es una esfera al menos parcialmente colapsada.

Dada la formación de la cubierta de la cápsula en el límite de la región discreta (por ejemplo, una gotita), las referencias a las dimensiones de una gotita también pueden tomarse como referencias a la dimensión de la cápsula. La cubierta de la cápsula puede formarse antes de una etapa de secado.

5 Los inventores han establecido que las cápsulas que se han encogido, por ejemplo, por desolvatación, pueden volver posteriormente a su forma sustancialmente esférica original, por ejemplo, resolviendo la cápsula.

10 La forma de una cápsula puede determinarse mediante simple observación de la cápsula formada usando microscopía, tal como microscopía de campo claro, microscopía electrónica de barrido o microscopía electrónica de transmisión. Cuando el material de la cubierta comprende una etiqueta, la detección de la etiqueta a través de la cubierta revelará la forma de la cápsula. Por ejemplo, cuando la etiqueta es una etiqueta fluorescente, se puede usar microscopía confocal de escaneo con láser para localizar el material de la cubierta y su forma.

El tamaño de la cápsula no está particularmente limitado. En una realización, la cápsula es una microcápsula y/o una nanocápsula.

En una realización, cada cápsula tiene un tamaño promedio de al menos 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 o 200 μm de diámetro.

15 En una realización, cada cápsula tiene un tamaño promedio de como máximo 400, 200, 100, 75 o 50 μm de diámetro.

En una realización, el tamaño de la cápsula está en un rango donde los diámetros mínimo y máximo se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, el tamaño de la cápsula está en el rango de 10 a 100 μm de diámetro.

20 El tamaño promedio se refiere al promedio numérico de diámetros medidos para una muestra de cápsulas. Típicamente, se miden al menos 5 cápsulas en la muestra. Se toma una medida de la sección transversal desde los bordes exteriores de la cubierta.

La sección transversal de una cápsula se puede determinar usando un análisis microscópico simple de las cápsulas formadas. Por ejemplo, las cápsulas formadas se pueden colocar en un portaobjetos de microscopio y analizar las cápsulas. Alternativamente, el tamaño de la cápsula se puede medir durante el proceso de preparación, por ejemplo, a medida que las cápsulas se forman en un canal de un dispositivo para fluidos (es decir, en línea).

25 La medición de la sección transversal también se puede lograr usando técnicas relacionadas con la detección de una etiqueta o funcionalidad detectable presente dentro del material de la cubierta. Como se mencionó anteriormente en relación con la detección y ubicación del componente encapsulado, el material de la cubierta puede comprender una etiqueta fluorescente que puede detectarse mediante técnicas de microscopía confocal de escaneo con láser. La presencia de múltiples etiquetas dentro y alrededor de la cubierta de la cápsula permite determinar la forma de la sección transversal y medir la sección transversal más grande.

30 En el método de preparación descrito en el presente documento, se prepara una cápsula usando una técnica de generación de gotas de fluido. La cubierta de la cápsula se forma en una gotita, que se crea en un canal de un dispositivo generador de gotitas de fluido, en el límite de la fase acuosa de la gotita con la fase continua. Por lo tanto, el tamaño de la cápsula es sustancialmente el mismo que el de la gota.

35 Los presentes inventores han establecido que las cápsulas de la invención pueden prepararse con una distribución de tamaño bajo. Esto es particularmente ventajoso, ya que se puede preparar una gran cantidad de cápsulas, cada una con características físicas y químicas predecibles.

40 En una realización, el diámetro de la cápsula tiene una desviación estándar relativa (RSD) de como máximo 0.5%, como máximo 1%, como máximo 1.5%, como máximo 2%, como máximo 4%, como máximo 5%, como mínimo más 7%, o como máximo 10%.

La desviación estándar relativa se calcula a partir de la desviación estándar dividida por el promedio numérico y multiplicada por 100. El tamaño de la cápsula se refiere a la sección transversal más grande de la cápsula, en cualquier sección. La sección transversal de una cápsula sustancialmente esférica es el diámetro.

45 La cubierta define una cavidad interna que es adecuada para encapsular un componente. El tamaño del espacio interno generalmente corresponderá al tamaño de la cápsula misma. Por lo tanto, la dimensión, por ejemplo, el diámetro, del espacio interno puede seleccionarse de cualquiera de los valores de diámetro dados anteriormente para la propia cubierta.

Cuando se mide el tamaño de la cápsula, el diámetro se refiere a la distancia desde el borde más externo al borde más externo del material de la cubierta de dos puntos opuestos, como se mencionó anteriormente. Cuando se mide

el tamaño del espacio interno, el diámetro se refiere a la distancia desde el borde más interno al borde más interno del material de la cubierta de dos puntos opuestos.

5 Los inventores han establecido técnicas que permiten determinar los bordes exterior e interior de la cubierta. Por ejemplo, la presencia de una etiqueta detectable dentro del material de la cubierta permite determinar los bordes más externo e interno de la cubierta. Si se pueden detectar estos bordes, se puede determinar el grosor de la cubierta.

Por lo general, el diámetro medido desde el borde más externo al más externo no es significativamente diferente del diámetro medido desde el borde más interno al más interno. La diferencia es el grosor de la cubierta en los dos puntos opuestos.

10 En una realización, la cubierta tiene un espesor de al menos 0.02, al menos 0.05, al menos 0.1, al menos 0.5, al menos 1.0, al menos 2.0 o al menos 5.0 μm .

15 Como se señaló anteriormente, la cubierta tiene poros. En una realización, los poros pueden ser de un tamaño que permita el paso de material a su través. Por ejemplo, los componentes encapsulados dentro de la cápsula pueden pasar a través de los poros de la cubierta para ser liberados de la cápsula. Por el contrario, los poros pueden ser de tamaño suficiente para permitir que los componentes pasen al espacio interno de la cubierta y, por lo tanto, se encapsulen. Tal puede ser referido como un paso de encapsulación de difusión pasiva. Tal técnica puede usarse para proporcionar una cápsula que tiene un encapsulante dentro. Como se describe en el presente documento, los presentes inventores han proporcionado métodos alternativos para la encapsulación de material en la etapa de preparación de la cubierta. Tales métodos permiten una carga más eficiente de la cápsula con material, ya que el material está completamente encapsulado dentro de la cubierta.

20 En una realización, los poros pueden ser de un tamaño que es demasiado pequeño para permitir el paso de material a través de ellos. Por ejemplo, se puede evitar que los componentes encapsulados dentro de la cápsula pasen a través de los poros de la cubierta y, por lo tanto, no se pueden liberar de la cápsula. Tal material puede ser liberado de la cápsula, por ejemplo, interrumpiendo los complejos de cucurbiturilo que mantienen unida la cubierta. La ruptura de la cubierta de esta manera crea poros más grandes a través de los cuales puede pasar el material.

25 Se cree que el tamaño de poro puede aumentarse con la solvatación de una cápsula previamente desolvatada. A medida que la cápsula se contrae, la porosidad de la cápsula puede disminuir a medida que el material de la cubierta se pliega, bloqueando al menos parcialmente algunos de los poros.

30 El tamaño de un poro puede medirse experimentalmente usando un rango de componentes encapsulados que tienen cada uno una sección transversal diferente, tal como un diámetro diferente. La sección transversal puede conocerse o predecirse en base a una comprensión de la configuración probable del componente. El tamaño de poro puede determinarse en función de cuáles componentes se liberan de la cápsula y cuáles no.

35 La sección transversal, típicamente el diámetro, de un componente puede predecirse basándose en el radio de giro calculado para cada componente encapsulado. Tales cálculos son más adecuados para determinar el tamaño de pequeñas partículas globulares, y pueden usarse en relación con sistemas poliméricos, tales como polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los métodos para el cálculo del radio de giro se describen en Andrieux et al. *Analytical Chemistry* 2002, 74, 5217, que se incorpora aquí como referencia.

40 Se puede preparar una cápsula que comprende un componente encapsulado usando los métodos descritos en este documento. Una vez que se prepara la cápsula (con encapsulante), la cápsula y su entorno acuoso pueden analizarse para detectar la pérdida de material desde el interior de la cubierta hasta la fase acuosa externa. Los compuestos encapsulados pueden tener una etiqueta analítica para ayudar a la detección. Los marcadores adecuados incluyen marcadores fluorescentes que son detectables usando técnicas estándar de microscopía de fluorescencia.

En una realización, los compuestos de dextrano de diferente peso molecular pueden usarse como compuestos de prueba para determinar el tamaño de poro de una cápsula formada. El dextrano puede estar marcado, y preferiblemente con una etiqueta fluorescente.

45 Los compuestos de dextrano de diferente peso molecular están fácilmente disponibles de fuentes comerciales, que incluyen, por ejemplo, Sigma Aldrich. Los dextranos que tienen un peso molecular promedio de 1.000 a 500.000 están disponibles. El dextrano con un peso molecular de 70 kDa tiene un radio de giro de aprox. 8 nm, mientras que el dextrano con un peso molecular de 150 kDa tiene un radio de giro de aprox. 11 nm (véase Granath *Journal of Colloid Science* 1958, 13, 308). Los compuestos de dextrano que tienen un marcador fluorescente, como el isotiocianato de fluoresceína, también están disponibles en fuentes comerciales, que incluyen, de nuevo, Sigma Aldrich.

50 En una realización, el tamaño de poro es como máximo 20, como máximo 15, como máximo 10, como máximo 5, como máximo 1 o como máximo 0.5 μm .

En una realización, el tamaño de poro es como máximo 500, como máximo 200, como máximo 100, como máximo 50 o como máximo 20 nm.

En una realización, el tamaño de poro es de al menos 0.5, al menos 1 o al menos 5 nm.

5 En una realización, el tamaño de poro está en un rango donde los tamaños de poro mínimo y máximo se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, el tamaño de poro está en el rango de 1 a 20 nm.

Como alternativa al dextrano, se pueden usar patrones de proteínas en su lugar. Como alternativa a los compuestos marcados descritos anteriormente, también es posible detectar el compuesto liberado de la cápsula mediante espectroscopía de masas o electroforesis en gel de proteínas (para estándares de proteínas).

10 El área superficial, la porosidad y el tamaño de poro también se pueden determinar experimentalmente usando técnicas de absorción de gas BET.

15 Como se esperaba, el tamaño de poro de la cubierta está influenciado por la cantidad de cucurbiturilo presente en la composición complejable a partir de la cual se puede preparar la cápsula. Se cree que el aumento de la cantidad de cucurbiturilo presente en la composición complejable aumenta la cantidad de entrecruzamiento con la red, reduciendo así el tamaño de los poros en el material de cubierta formado. La cubierta de la cápsula puede comprender una o más capas de material. Las capas del material pueden estar unidas, por ejemplo, mediante un complejo supramolecular ternario de cucurbiturilo con una primera molécula huésped presente en una capa y una segunda molécula huésped presente en una segunda capa. Además, o alternativamente, las capas del material pueden estar unidas por un primer bloque de construcción que tiene una pluralidad de moléculas huésped, donde una molécula huésped forma un complejo ternario con un cucurbiturilo y otra molécula huésped presente en una primera capa, y otra molécula huésped forma un complejo ternario con un cucurbiturilo y otra molécula huésped presente en una segunda capa. En estas realizaciones, la cubierta puede verse como una malla que se extiende en tres dimensiones. Aunque la cubierta puede tener una profundidad de material, como el grosor descrito en este documento, se entiende que la formación de la cubierta proporcionará un espacio interno en donde puede residir un componente. Por lo tanto, la presente invención no pretende abarcar partículas que no tienen espacio interno.

25 Como alternativa, la cubierta de la cápsula puede comprender una pluralidad de capas concéntricas de material de red que no están interconectadas. En cualquiera de tales realizaciones, la referencia al tamaño de la cápsula se refiere a la sección transversal de la cubierta más externa.

Como se discutió anteriormente, el material de la cubierta puede incluir etiquetas detectables o funcionalidades detectables.

30 Una funcionalidad detectable es la funcionalidad de un componente de cubierta de cápsula que tiene una característica que es detectable por encima de las características que están presentes en otros componentes de la cápsula, o incluso otras funcionalidades del mismo componente. La funcionalidad detectable puede referirse a un grupo químico particular que da lugar a una señal única en, por ejemplo, análisis IR, UV-VIS, RMN o Raman. La funcionalidad puede ser un elemento radiactivo.

35 Normalmente, una parte del material de la cubierta o el encapsulante se proporciona con una etiqueta detectable, ya que la introducción de una etiqueta elegida permite el uso de técnicas que son más apropiadas para la propiedad que se va a medir. Aquí se describen bloques de construcción que tienen marcadores fluorescentes detectables. También se describen en este documento los bloques de construcción que son capaces de proporcionar un efecto de resonancia mejorado en la superficie.

40 La cubierta puede tener una funcionalidad adicional en sus superficies internas y/o externas. Aquí se describen bloques de construcción que tienen funcionalidad para mejorar la solubilidad, para ayudar a la detección, funcionalidad reactiva para la posterior elaboración de la cubierta y catalizadores, entre otros.

45 La cubierta de la cápsula de la invención es estable y puede almacenarse sin pérdida de la estructura de la cubierta. Por lo tanto, la integridad de la cubierta permite que la cápsula se use como recipiente de almacenamiento para un encapsulante. Las cápsulas de la invención son térmicamente estables y se sabe que la cubierta mantiene su integridad al menos hasta 100°C. Las cápsulas de la invención también son estables a presiones reducidas (es decir, por debajo de la presión ambiente). Se sabe que la cubierta mantiene su integridad hasta al menos 20 Pa.

Las cápsulas de la invención tienen una larga vida útil. Los presentes inventores han confirmado que la integridad estructural se mantiene durante al menos 10 meses.

50 La integridad estructural de la cubierta se debe en parte a la resistencia del complejo hospedero-huésped cucurbiturilo, que se describe con más detalle a continuación.

Características adicionales o alternativas de la cápsula

5 La cubierta de la cápsula tiene poros. La porosidad es ajustable mediante cambios apropiados en la estequiometría de los reactivos utilizados para formar la cápsula. El aumento del entrecruzamiento entre los bloques de construcción disminuirá el tamaño de los poros en la cápsula. Alternativamente, los bloques de construcción pueden seleccionarse para proporcionar un material de cubierta que ha aumentado o disminuido la porosidad. Cuando se va a encapsular un encapsulante o un tamaño relativamente pequeño, la cápsula se prepara con poros de diámetro relativamente pequeño, para limitar o evitar la pérdida del encapsulante fuera de la cubierta. Cuando se va a encapsular un encapsulante relativamente grande, el tamaño de poro puede ser mayor.

10 Como se indicó anteriormente, la cubierta puede tener una funcionalidad adicional en sus superficies internas y/o externas. En algunas realizaciones, se proporciona la funcionalidad para la posterior funcionalización química de la cubierta de la cápsula, por ejemplo, como un sitio de reacción para unir a un compuesto que tiene una reactividad particularmente deseable.

15 En una realización, la cubierta tiene un grupo funcional químico disponible para reacción en la superficie externa y/o interna de la cápsula. El grupo funcional químico se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, amina (preferiblemente amina primaria y secundaria), carboxi, tiol, éster, tioéster, carbonato, uretano y tiourea.

En una realización, la cubierta está unida a un compuesto funcional.

En una realización, el compuesto funcional es un marcador analítico para ayudar a la detección y cuantificación de la cápsula. Tal se describe en la sección anterior.

El compuesto funcional puede ser catalítico (incluyendo enzimático), antifúngico, herbicida o antigénico.

20 El compuesto funcional puede tener propiedades de adhesión superficial. Dicha funcionalidad puede usarse para unir la cápsula a una superficie, ya sea covalentemente o no covalentemente.

Los compuestos funcionales pueden ser capaces de unirse a (o secuestrar) un compuesto o ion. Dicha funcionalidad puede ser de ayuda en la purificación, como el filtrado, y para la captura de elementos y compuestos tóxicos y no tóxicos.

25 En una realización, el compuesto funcional es una biomolécula.

En una realización, el compuesto funcional es un polipéptido, un polisacárido, un polinucleótido o un lípido.

Ejemplos de polipéptidos incluyen enzimas, anticuerpos, hormonas y receptores.

30 La funcionalidad se puede introducir en la cubierta mediante la elección apropiada del material de los bloques de construcción. Por lo tanto, cuando el bloque de construcción es un polímero, se puede incorporar una funcionalidad adecuada en los monómeros del polímero, cuyo monómero puede estar presente dentro de la cadena principal del polímero, o en una cadena lateral. Cuando el bloque de construcción es una partícula, la superficie de esa partícula puede funcionalizarse adecuadamente.

35 Cuando una molécula funcional está presente en una superficie de la cubierta, esta molécula se puede agregar después de que se forma la cápsula. Las moléculas funcionales se pueden unir a la cubierta utilizando un grupo químico funcional que se ha introducido para este propósito.

En principio, el cucurbiturilo puede tener una funcionalidad que está disponible para la reacción. Sin embargo, esto es menos preferido.

40 Cuando sea necesario, se pueden usar grupos protectores apropiados para proteger la funcionalidad durante el procedimiento de preparación de la cápsula. Los grupos protectores pueden eliminarse posteriormente, cuando sea necesario.

Complejo

45 La cubierta de la cápsula comprende una red que se mantiene unida mediante unas esposas supramoleculares. El complejo que forma estas esposas supramoleculares se basa en un cucurbiturilo que aloja un huésped (complejo binario) o dos huéspedes (complejo ternario). El cucurbiturilo forma un enlace no covalente con cada huésped. Los presentes inventores han establecido que los complejos de cucurbiturilo se forman fácilmente y proporcionan enlaces robustos no covalentes entre bloques de construcción. La formación del complejo es tolerante a muchas funcionalidades dentro de los bloques de construcción. Uno de los presentes inventores ha demostrado que las redes

de polímeros pueden prepararse usando unas esposas de cucurbiturilo. Sin embargo, hasta ahora, no se ha descrito la formación de estructuras poliméricas precisas, como cápsulas, usando cucurbiturilo.

5 En una realización, la cubierta es una red que tiene una pluralidad de complejos, en donde cada complejo comprende cucurbiturilo que aloja una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped. Las moléculas huésped primera y segunda están unidas covalentemente a un primer bloque de construcción, o a un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción.

10 Cuando el complejo comprende dos huéspedes dentro de la cavidad de cucurbiturilo, la constante de asociación, K_a , para ese complejo es al menos $10^3 M^{-2}$, al menos $10^4 M^{-2}$, al menos $10^5 M^{-2}$, al menos $10^6 M^{-2}$, al menos $10^7 M^{-2}$, al menos $10^8 M^{-2}$, al menos $10^9 M^{-2}$, al menos $10^{10} M^{-2}$, al menos $10^{11} M^{-2}$, o al menos $10^{12} M^{-2}$. Cuando un cucurbiturilo alberga dos moléculas huésped, las moléculas huésped pueden ser iguales o diferentes. Un cucurbiturilo que es capaz de albergar dos moléculas huésped también puede ser capaz de formar un complejo binario estable con un solo huésped. Se cree que la formación de un complejo hospedero-huésped ternario se realiza a través de un complejo binario intermedio. Dentro de la cubierta, puede estar presente un complejo binario formado entre una molécula huésped y un cucurbiturilo. El complejo binario puede considerarse como un complejo ternario parcialmente formado que aún no ha formado un enlace no covalente con otra molécula huésped.

En una realización, la cubierta es una red que tiene una pluralidad de complejos, en donde cada complejo comprende cucurbiturilo que aloja una molécula huésped, y cada cucurbiturilo está unido covalentemente a al menos otro cucurbiturilo. Las moléculas huésped están unidas covalentemente a un primer bloque de construcción, o a un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción.

20 Cuando el complejo comprende un huésped dentro de la cavidad de cucurbiturilo, la constante de asociación, K_a , para ese complejo es al menos $10^3 M^{-1}$, de al menos $10^4 M^{-1}$, de al menos $10^5 M^{-1}$, de al menos $10^6 M^{-1}$, de al menos $10^7 M^{-1}$, de al menos $10^8 M^{-1}$, de al menos $10^9 M^{-1}$, de al menos $10^{10} M^{-1}$, de al menos $10^{11} M^{-1}$, o de al menos $10^{12} M^{-1}$.

En una realización, el huésped es un compuesto capaz de formar un complejo que tiene una constante de asociación en el intervalo de 10^4 a $10^7 M^{-1}$.

25 En una realización, la formación del complejo es reversible. La descomplejación del complejo para separar al huésped o huéspedes puede ocurrir en respuesta a un estímulo externo, que incluye, por ejemplo, un compuesto huésped de la competencia. Tal descomplejamiento puede inducirse para proporcionar poros adicionales o más grandes en la cápsula a través de los cuales puede pasar un material encapsulado.

30 Como se señaló anteriormente en relación con la cubierta de la cápsula, el complejo de cucurbiturilo con uno o dos huéspedes es el enlace no covalente que une y/o entrelaza los bloques de construcción desde una red de material supramolecular. El complejo es térmicamente estable y no se separa a presión reducida, como se explica para la cubierta.

Red

35 La formación de un complejo supramolecular sirve para unir y/o entrelazar bloques de construcción, formando así una red de material. Esta es la cubierta de la cápsula.

40 Se proporcionan dos tipos de red. El primer tipo se basa en la formación de una pluralidad de complejos ternarios, cada complejo comprende un huésped cucurbiturilo con una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped. El segundo tipo se basa en la formación de una pluralidad de complejos binarios, cada complejo que comprende un huésped cucurbiturilo con una primera molécula huésped. En este segundo tipo, cada cucurbiturilo está unido covalentemente a al menos otro cucurbiturilo. Estos tipos de red pueden combinarse con una cubierta.

45 Cuando se proporciona un bloque de construcción con una pluralidad de moléculas huésped, no es necesario que todas las moléculas huésped participen en un complejo con cucurbiturilo. Cuando la red se basa en la vinculación entre estructuras ternarias, una molécula huésped de un bloque de construcción puede estar en un complejo binario con un cucurbiturilo. El complejo binario puede considerarse como un complejo ternario parcialmente formado que aún no se ha combinado con una molécula huésped adicional para generar la forma ternaria.

50 A lo largo de la descripción se hacen referencias a un bloque de construcción, un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción. Se entiende que una referencia a tal es una referencia a una colección de moléculas individuales, partículas, polímeros, etc. que son los bloques de construcción. Cuando una referencia está destinada a una molécula, partícula, etc., de un bloque de construcción individual, el término individual se usa en referencia a los bloques de construcción, por ejemplo, un solo primer bloque de construcción.

Las redes descritas a continuación son las redes básicas que se pueden obtener a partir de las composiciones descritas. Se entiende que la presente invención se extiende a redes más complejas que se pueden obtener de composiciones que comprenden bloques de construcción adicionales.

Red de complejos ternarios basados en cucurbiturilo

5 Esta red se puede obtener del ensamblaje de una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped junto con un huésped cucurbiturilo. Las moléculas huésped pueden proporcionarse en uno o dos (o más) bloques de construcción como se describe a continuación.

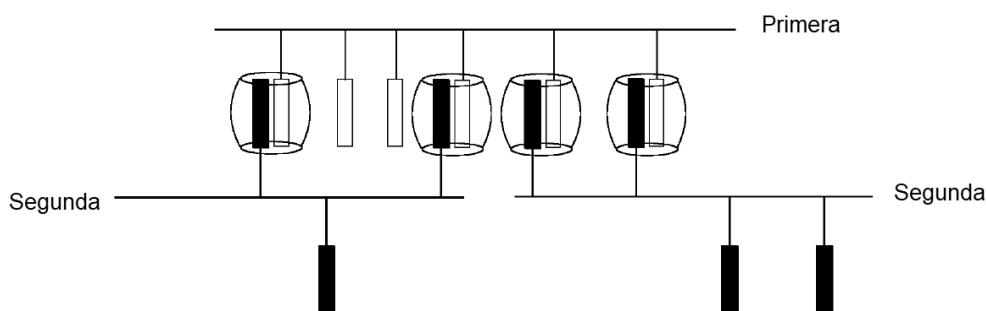
10 En una realización, una red es un complejo de una composición que comprende un cucurbiturilo, un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped de cucurbiturilo y un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de segundas moléculas huésped de cucurbiturilo, en donde una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario.

15 El complejo ternario sirve para unir de forma no covalente los bloques de construcción primero y segundo. Un primer bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes a una pluralidad de segundos bloques de construcción. De manera similar, un segundo bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes a una pluralidad de primeros bloques de construcción. De esta manera, se establece una red de material.

20 Se observa que, en algunas realizaciones, la primera y segunda moléculas huésped pueden ser idénticas. Por lo tanto, el primer y el segundo bloque de construcción pueden diferir en sus composiciones. En algunas realizaciones, los bloques de construcción primero y segundo pueden ser idénticos. En este caso, las moléculas huésped primera y segunda son diferentes.

25 A continuación se muestra una estructura esquemática de una red básica formada entre cucurbiturilo, un solo primer bloque de construcción y dos segundos bloques de construcción. En los esquemas incluidos en este texto, las moléculas huésped se representan como rectángulos que están unidos covalentemente (línea vertical) a un bloque de construcción (línea horizontal). La línea vertical puede representar un enlace covalente directo o un enlazador al bloque de construcción. El bloque de construcción puede ser una molécula polimérica, una partícula o similar, como se describe en este documento.

30 En el siguiente esquema, algunas de las primeras moléculas huésped (rectángulos sin sombread) del primer bloque de construcción están en complejo con los huéspedes cucurbiturilo (barriles) y las segundas moléculas huésped (rectángulos sombreados) de los segundos bloques de construcción.



35 Es evidente que no todas las moléculas huésped presentes participan en un complejo en la red final. Cada uno de los bloques de construcción primero y segundo puede formar complejos con otros bloques de construcción segundo y primer respectivamente. Las moléculas huésped están sombreadas para facilitar su comprensión. Sin embargo, como se explica aquí, las moléculas huésped del primer y segundo bloque de construcción pueden ser las mismas.

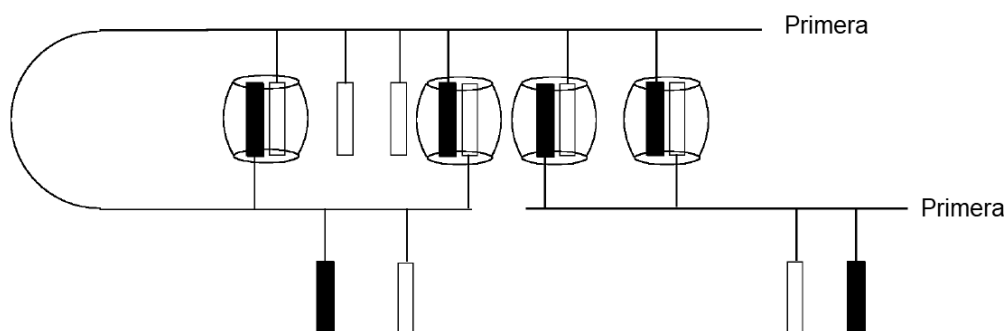
En una realización alternativa, una red es un complejo de una composición que comprende un cucurbiturilo y un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped cucurbiturilo y una pluralidad de segundas moléculas huésped cucurbiturilo, en donde una primera y una segunda molécula huésped junto con el cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario.

El complejo ternario sirve para unir y/o interrelacionar no covalentemente el primer bloque de construcción. Un primer bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes a una pluralidad de otros primeros bloques de construcción. Además, o alternativamente, un primer bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes consigo mismo, para así reticular el primer bloque de construcción único.

5 Como antes, las moléculas huésped primera y segunda pueden ser idénticas.

A continuación se muestra una estructura esquemática de una red básica formada entre cucurbiturilo y dos primeros bloques de construcción individuales que tienen cada uno una pluralidad de moléculas huésped primera y segunda. Algunas de las primeras moléculas huésped (rectángulos no sombreados) del primer bloque de construcción están en complejo con los huéspedes cucurbiturilo (barriles) y las segundas moléculas huésped (rectángulos sombreados) de otro primer bloque de construcción. Se puede ver en la red ilustrada que un primer bloque de construcción puede formar complejos intramoleculares, entrecruzando así un solo primer bloque de construcción.

10



Es evidente que no todas las moléculas huésped presentes necesitan participar en un complejo en la red final. Cada uno de los primeros bloques de construcción puede formar complejos con otros primeros bloques de construcción, o con otras partes del mismo bloque de construcción. Como se explica aquí, la primera y la segunda molécula huésped pueden ser las mismas.

15

Opcionalmente, la composición comprende además un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una o más moléculas del tercer huésped cucurbiturilo, una o más moléculas del cuarto huésped cucurbiturilo o ambas, en donde una tercera y una cuarta molécula junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un ternario el complejo hospedero-huésped, o las moléculas huésped primera y cuarta junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario, o las moléculas huésped segunda y tercera junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario.

20

Cuando el segundo bloque de construcción está provisto de una pluralidad de moléculas huésped tercera y cuarta, el complejo ternario sirve para unir y/o interconectar no covalentemente el segundo bloque de construcción. Un segundo bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes a una pluralidad de otros segundos bloques de construcción. Además, o alternativamente, un segundo bloque de construcción único puede formar uno o más enlaces no covalentes consigo mismo, para así reticular el segundo bloque de construcción único.

25

Las moléculas huésped tercera y cuarta pueden ser adecuadas para formar complejos con las moléculas huésped primera y segunda del primer bloque de construcción. En una realización, las moléculas huésped primera y tercera son iguales. En una realización, las moléculas huésped segunda y cuarta son iguales. Aquí, el complejo ternario sirve para unir de forma no covalente los bloques de construcción primero y segundo, por ejemplo, a través de un complejo de las moléculas huésped primera y cuarta y/o a través de un complejo de las moléculas huésped segunda y tercera.

30

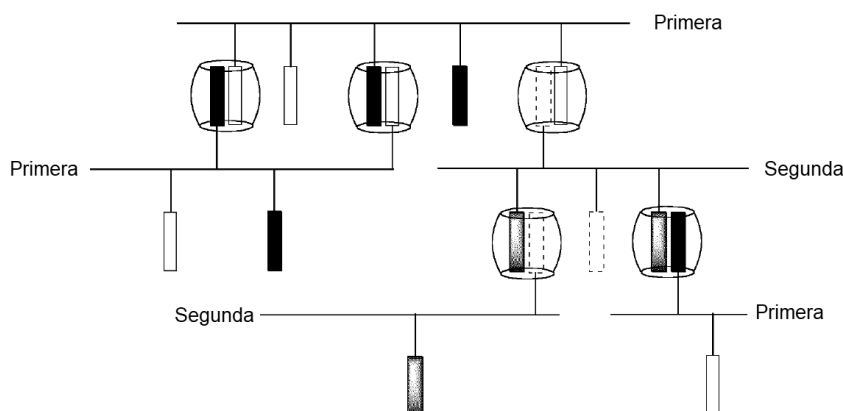
Por lo tanto, un primer bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes a una pluralidad de segundos bloques de construcción. De manera similar, un segundo bloque de construcción único puede formar una pluralidad de enlaces no covalentes a una pluralidad de primeros bloques de construcción. De esta manera, se establece una red de material. Los bloques de construcción también pueden formar enlaces intermoleculares no covalentes como se describió anteriormente.

35

Cuando un segundo bloque de construcción está unido covalentemente a una o más moléculas de tercer huésped o una o más moléculas de cuarto huésped, las moléculas primera y cuarta junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario, y las moléculas segunda y tercera junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario. Por lo tanto, el complejo ternario sirve para unir no covalentemente el segundo bloque de construcción al primer bloque de construcción.

40

5 A continuación, se muestra una estructura esquemática de una red básica formada entre cucurbiturilo, tres primeros bloques de construcción individuales, cada uno con una pluralidad de moléculas huésped primera y segunda, y dos segundos bloques de construcción, cada uno con una pluralidad de moléculas huésped tercera y cuarta. Algunas de las primeras moléculas huésped (rectángulos no sombreados) del primer bloque de construcción están en complejo con los huéspedes cucurbiturilo (barriles) y las segundas moléculas huésped (rectángulos sombreados) de otro primer bloque de construcción. Algunas de las terceras moléculas huésped (rectángulos parcialmente sombreados) del segundo bloque de construcción están en complejo con los huéspedes cucurbiturilo (barriles) y las cuartas moléculas huésped (rectángulos discontinuos) de otro segundo bloque de construcción. La primera molécula huésped del primer bloque de construcción está en complejo con un huésped cucurbiturilo y una cuarta molécula huésped (rectángulos discontinuos) de un segundo bloque de construcción. Una segunda molécula huésped del primer bloque de construcción está en complejo con un huésped cucurbiturilo y una tercera molécula huésped de un segundo bloque de construcción.

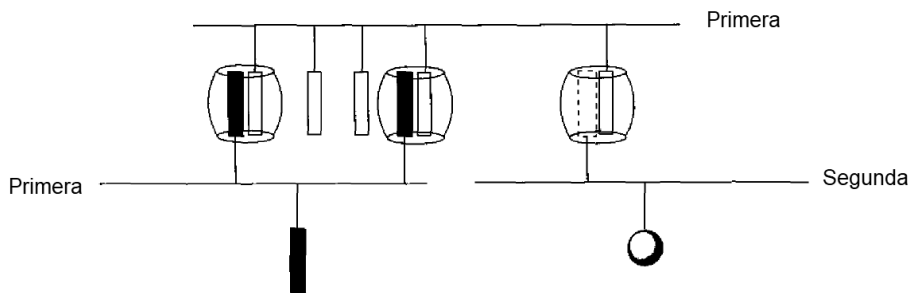


15 Las moléculas huésped primera y tercera pueden ser iguales. Las moléculas huésped segunda y cuarta pueden ser iguales.

20 Un segundo bloque de construcción puede estar unido covalentemente a una molécula huésped (que puede ser una tercera o cuarta molécula huésped). En esta realización, el segundo bloque de construcción no es capaz de formar una pluralidad de enlaces a otros bloques de construcción. Como tal, el bloque de construcción no contribuiría a la formación de enlaces cruzados dentro de la red. Sin embargo, el segundo bloque de construcción puede proporcionarse para introducir en la red una característica física o química particular que posee el segundo bloque de construcción. Por ejemplo, el segundo bloque de construcción puede comprender una etiqueta detectable o un grupo funcional, tal como un grupo solubilizante. La incorporación del segundo bloque de construcción en la red, por lo tanto, permite la modificación de las características físicas o químicas de la red en general.

25 A continuación se muestra una estructura esquemática de una red básica formada entre cucurbiturilo, dos primeros bloques de construcción individuales, cada uno con una pluralidad de moléculas huésped primera y segunda, y que también incluye un segundo bloque de construcción único, que está unido covalentemente a un cuarto huésped molécula, y una etiqueta detectable. Algunas de las primeras moléculas huésped (rectángulos no sombreados) del primer bloque de construcción están en complejo con los huéspedes cucurbiturilo (barriles) y las segundas moléculas huésped (rectángulos sombreados) de otro primer bloque de construcción. Una primera molécula huésped del primer bloque de construcción está en complejo con un huésped cucurbiturilo y una cuarta molécula huésped. La etiqueta detectable (círculo parcialmente sombreado) puede proporcionarse para permitir la identificación de la red resultante.

30

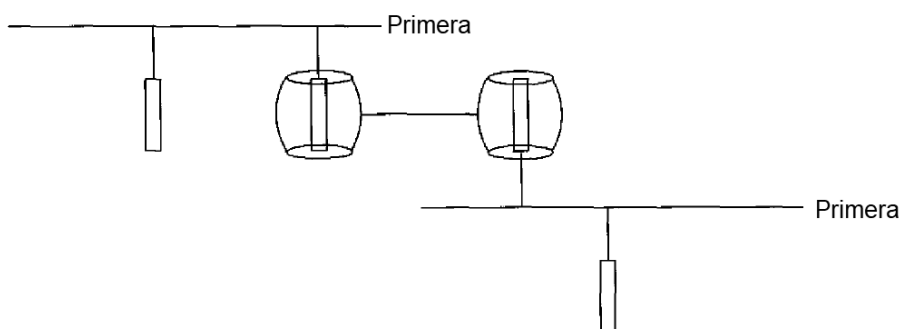


Red de complejos binarios basada en una pluralidad de cucurbiturilos covalentemente unidos

5 Esta red se puede obtener del ensamblaje de una primera molécula huésped junto con un huésped cucurbiturilo, que está unido covalentemente a uno o más cucurbiturilos. Las moléculas huésped pueden proporcionarse en uno o dos (o más) bloques de construcción como se describe en el presente documento.

Los cucurbiturilos unidos covalentemente sirven para unir moléculas de bloques de construcción a través de la pluralidad de complejos que se forman dentro de cada uno de los cucurbiturilos unidos covalentemente.

10 A continuación, se muestra una estructura esquemática de una red básica formada entre una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente y dos primeros bloques de construcción individuales que tienen cada uno una pluralidad de primeras moléculas huésped. Algunas de las primeras moléculas huésped (rectángulos sin sombrear) de cada uno de los primeros bloques de construcción están en un complejo binario con huéspedes cucurbiturilo (barril). Los cucurbiturilos están unidos, formando así un enlace entre cada uno de los primeros bloques de construcción.



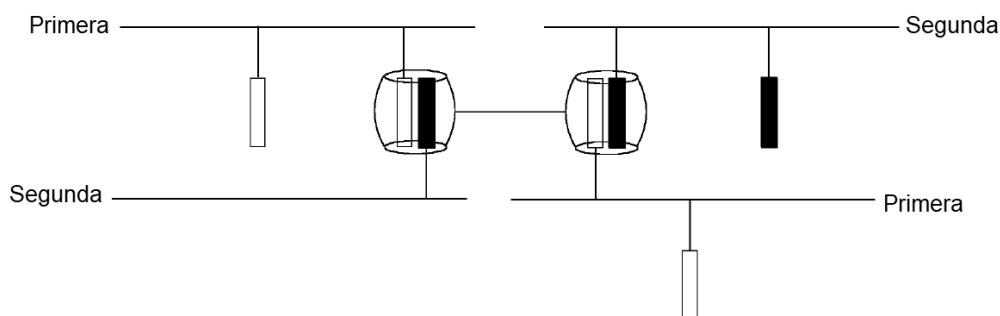
15 Es evidente que no todas las moléculas huésped presentes necesitan participar en un complejo en la red final. Cada uno de los primeros bloques de construcción individuales puede formar complejos con otros primeros bloques de construcción respectivamente, o puede formar una entrecruzamiento intramolecular con otra porción del mismo bloque de construcción. Como se explica aquí, las moléculas huésped del primer y segundo bloque de construcción pueden ser las mismas. En el esquema anterior, uno de los primeros bloques de construcción puede reemplazarse con un segundo bloque de construcción que está unido covalentemente a una segunda molécula huésped. La segunda molécula huésped es una que es capaz de formar un complejo binario con el cucurbiturilo. La segunda molécula huésped puede ser la misma que la primera molécula huésped.

20 En el esquema se muestran dos cucurbiturilos unidos entre sí. La presente invención abarca el uso de sistemas en los que más de dos cucurbiturilos están unidos entre sí. Por ejemplo, múltiples cucurbiturilos pueden estar pendientes de una molécula polimérica.

25 Red de complejos ternarios basados en una pluralidad de cucurbiturilos covalentemente unidos

Será evidente a partir de la descripción de las redes anteriores, que cada uno de los huéspedes cucurbiturilo en la pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente puede ser adecuado para formar complejos ternarios. Por lo tanto, la pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente puede usarse en lugar del cucurbiturilo descrito para su uso en la red de complejos ternarios basados en cucurbiturilo.

5 A continuación, se muestra un esquema estructural de una red básica formada entre una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente, dos primeros bloques de construcción individuales que tienen una pluralidad de primeras moléculas huésped y dos segundos bloques de construcción individuales que tienen una pluralidad de segundas moléculas huésped. Algunas de las primeras moléculas huésped (rectángulos sin sombreadar) del primer bloque de construcción están en un complejo terciario con un huésped cucurbiturilo (barril) y las segundas moléculas huésped (rectángulos sombreadados) del segundo bloque de construcción. Los cucurbiturilos están unidos, para formar así un enlace entre cada uno de los primeros y segundos bloques de construcción.



10 Como antes, la primera y la segunda molécula huésped pueden ser las mismas. Cada uno de los bloques de construcción primero y segundo puede formar complejos con otros bloques de construcción segundo y primer respectivamente. Son posibles otras permutaciones, por ejemplo, donde la pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente tiene más de dos cucurbiturilos.

Otras redes

15 Se describieron más arriba las redes básicas de la invención que se obtienen o son obtenibles a partir de las composiciones descritas. Para un experto en la materia, será claro que las composiciones descritas pueden incluir bloques de construcción adicionales, por ejemplo, bloques de construcción tercero y cuarto, cada uno unido a una o más moléculas huésped de cucurbiturilo. La presente invención también cubre cápsulas en las que la cubierta comprende una mezcla de cualquiera de las redes descritas anteriormente. Estos se pueden obtener a partir de composiciones que comprenden una selección apropiada de cucurbiturilo, cucurbiturilos unidos covalentemente, primer bloque de construcción y segundo bloque de construcción según sea apropiado.

20 La invención también se refiere a una cápsula que tiene una cubierta que es una red que comprende diferentes cucurbiturilos. Se pueden elegir diferentes cucurbiturilos para obtener una red basada en complejos ternarios y binarios. Se pueden elegir diferentes cucurbiturilos para generar redes que resulten de la complejación selectiva de cada cucurbiturilo para diferentes moléculas huésped, que pueden estar presentes en el mismo en diferentes bloques de construcción.

Cucurbiturilo

30 La presente invención proporciona el uso de cucurbiturilo como esposas supramoleculares para unir y/o reticular bloques de construcción. El cucurbiturilo puede usarse para formar complejos ternarios con la primera y segunda moléculas huésped presentes en uno o más bloques de construcción. La formación de tales complejos une los bloques de construcción individuales para formar una red de material. Esta red es la cubierta de la cápsula.

Además, o alternativamente, se proporciona una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente y cada cucurbiturilo se puede usar para formar complejos binarios con una molécula huésped presente en uno o más bloques de construcción. La formación de un complejo binario con cada uno de los cucurbiturilos unidos covalentemente forma una red de material. Esta red es la cubierta de la cápsula.

35 En una realización, el cucurbiturilo es capaz de formar un complejo ternario. Por ejemplo, CB[8], es capaz de formar un complejo ternario.

En una realización, el cucurbiturilo es capaz de formar un complejo binario. Por ejemplo, CB[7], es capaz de formar un complejo binario.

40 En una realización, el cucurbiturilo es capaz de formar complejos ternarios y binarios. Por ejemplo, CB[8], es capaz de formar un complejo ternario o binario, dependiendo de la naturaleza del huésped.

En una realización, el cucurbiturilo es un compuesto CB[5], CB[6], CB[7], CB[8], CB[9], CB[10], CB[11] o CB[12].

En una realización, el cucurbiturilo es un compuesto CB[6], CB[7] o CB[8].

En una realización, el cucurbiturilo es un compuesto CB[8].

En una realización, las referencias a un compuesto de cucurbiturilo son referencias a variantes y derivados del mismo.

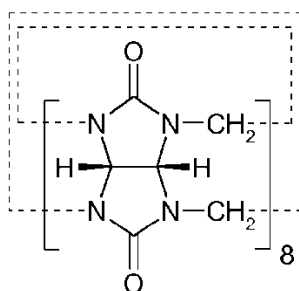
- 5 Los compuestos de cucurbiturilo difieren en su solubilidad en agua. Los métodos de preparación de cápsulas pueden adaptarse para tener en cuenta esta solubilidad, como se describe más adelante. Por lo tanto, la elección del compuesto de cucurbiturilo no está limitada por su solubilidad acuosa.

En una realización, el compuesto de cucurbiturilo tiene una solubilidad de al menos 0.01 mg/ml, al menos 0.02 mg/ml, al menos 0.05 mg/ml, o al menos 0.10 mg/ml.

- 10 En una realización, la solubilidad se refiere a la solubilidad acuosa (es decir, una fase acuosa).

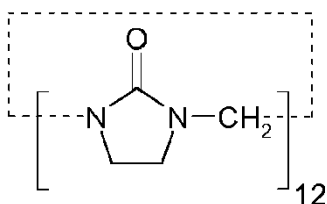
En una realización, la solubilidad se refiere a la solubilidad en una fase inmiscible con agua, tal como una fase oleosa o una fase orgánica.

- 15 Cucurbit[8]urilo (CB[8]; CAS 259886-51-6) es una molécula contenedora en forma de barril que tiene ocho unidades de glicolurilo repetidas y un tamaño de cavidad interna de 479Å³ (véase estructura a continuación). El CB[8] se sintetiza fácilmente utilizando técnicas estándar y está disponible comercialmente (por ejemplo, Sigma-Aldrich, MO Estados Unidos).

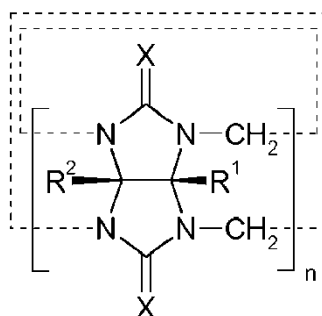


En otros aspectos de la invención, se proporcionan variantes de CB[8] y encuentran uso en los métodos descritos en este documento.

- 20 Una variante de CB[8] puede incluir una estructura que tiene una o más unidades repetidas que son estructuralmente análogas al glicolurilo. La unidad de repetición puede incluir una unidad de etilurea. Cuando todas las unidades son unidades de etilurea, la variante es un hemicucurbiturilo. La variante puede ser una urinaria de hemicucurbiturilo[12] (que se muestra a continuación, véase también Lagona et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4844).



- 25 En otros aspectos de la invención, se proporcionan derivados de cucurbiturilo y encuentran uso en los métodos descritos en este documento. Un derivado de un cucurbiturilo es una estructura que tiene una, dos, tres, cuatro o más unidades de glicolurilo sustituidas. Un compuesto de cucurbiturilo sustituido puede estar representado por la siguiente estructura:



en donde:

n es un entero de al menos 5;

y para cada unidad de glicolurilo

5 cada X es O, S o NR³, y

-R¹ y -R² se seleccionan cada uno independientemente de -H y los siguientes grupos opcionalmente sustituidos: -R³, -OH, -OR³, -COOH, -COOR³, -NH₂, -NHR³ y -N(R³)₂ donde -R³ es seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₂₀, carboarilo C₆₋₂₀ y heteroarilo C₅₋₂₀, o donde -R¹ y/o -R² es -N(R³)₂, ambos -R³ juntos forman un anillo heterocíclico C₅₋₇; o juntos -R¹ y -R² son alquileno C₄₋₆ que forman un anillo carbocíclico C₆₋₈ junto con el marco de uracilo.

10 En una realización, una de las unidades de glicolurilo es una unidad de glicolurilo sustituido. Por lo tanto, -R¹ y -R² son cada uno independientemente -H para n-1 de las unidades de glicolurilo

En una realización, n es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

En una realización, n es 5, 6, 7, 8, 10 o 12.

En una realización, n es 8.

15 En una realización, cada X es O.

En una realización, cada X es S.

En una realización, R¹ y R² son cada uno independientemente H.

En una realización, para cada unidad uno de R¹ y R² es H y el otro se selecciona independientemente de -H y los siguientes grupos opcionalmente sustituidos: -R³, -OH, -OR³, -COOH, -COOR³, -NH₂, -NHR³ y -N(R³)₂. En una
 20 realización, para una unidad, uno de R¹ y R² es H y el otro se selecciona independientemente de -H y los siguientes grupos opcionalmente sustituidos: -R³, -OH, -OR³, -COOH, -COOR³, -NH₂, -NHR³ y -N(R³)₂. En esta realización, las unidades de glicolurilo restantes son tales que R¹ y R² son cada uno independientemente H.

Preferiblemente -R³ es alquilo C₁₋₂₀, lo más preferiblemente alquilo C₁₋₆. El grupo alquilo C₁₋₂₀ puede ser lineal y/o saturado. Cada grupo -R³ puede estar independientemente sin sustituir o sustituido. Los sustituyentes preferidos se
 25 seleccionan de: -R⁴, -OH, -OR⁴, -SH, -SR⁴, -COOH, -COOR⁴, -NH₂, -NHR⁴ y -N(R⁴)₂, en donde -R⁴ se selecciona de alquilo C₁₋₂₀, carboarilo C₆₋₂₀ y heteroarilo C₅₋₂₀. Los sustituyentes pueden seleccionarse independientemente de -COOH y -COOR⁴.

En algunas realizaciones, -R⁴ no es lo mismo que -R³. En algunas realizaciones, -R⁴ está preferiblemente sin sustituir.

30 Donde -R¹ y/o -R² es -OR³, -NHR³ o -N(R³)₂, entonces -R³ es preferiblemente alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, -R³ está sustituido con un sustituyente -OR⁴, -NHR⁴ o -N(R⁴)₂. Cada -R⁴ es alquilo C₁₋₆ y en sí mismo está preferiblemente sustituido.

En algunas realizaciones de la invención, se proporciona el uso de una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente. Tales cucurbiturilos unidos covalentemente son adecuados para formar redes basadas en la complejación del cucurbiturilo con moléculas huésped de un bloque de construcción. Los complejos formados pueden
 35 ser complejos ternarios o binarios.

Un cucurbiturilo puede estar unido covalentemente a otro cucurbiturilo a través de un grupo enlazador que es un sustituyente en la posición R¹ o R² en una de las unidades de glicolurilo en el cucurbiturilo como se representa en la estructura mostrada anteriormente. No existen limitaciones particulares en el enlace covalente entre los cucurbiturilos.

El enlazador puede estar en forma de un grupo alquileo simple, un grupo polioxialquileo o un polímero, tal como una molécula polimérica descrita en el presente documento para uso en el bloque de construcción. Cuando el conector es una molécula polimérica, los cucurbiturilos pueden pender de ese polímero.

Bloque de construcción

5 El cucurbiturilo se usa como esposas supramoleculares para unir uno o más bloques de construcción. La formación de un complejo de cucurbiturilo con componentes huéspedes adecuados que están unidos a los bloques de construcción forma una red de material. Este material es la cubierta de la cápsula. El complejo se entrecruza no covalentemente con el bloque de construcción o une no covalentemente el bloque de construcción a otro bloque de construcción.

10 Se entiende a partir de lo anterior que un bloque de construcción es una entidad que sirve para proporcionar estructura a la red formada. El bloque de construcción también sirve como el enlace entre una pluralidad de moléculas huésped, y por lo tanto también se puede denominar como un enlazador. En algunas realizaciones, se proporciona un bloque de construcción con el fin de introducir una característica física o química deseable en la red formada. Como se mencionó anteriormente en relación con la red, un bloque de construcción puede incluir una funcionalidad para ayudar a la detección y caracterización de la cubierta. Tales bloques de construcción no necesariamente tienen que participar en un enlace cruzado.

15 Un bloque de construcción, tal como un primer bloque de construcción, puede estar unido covalentemente a una pluralidad de moléculas huésped de cucurbiturilo. Por lo tanto, un bloque de construcción se unirá de forma no covalente a una pluralidad de cucurbiturilos, que se unirán de forma no covalente a otros bloques de construcción, generando así una red de material.

20 Un bloque de construcción, tal como un primer bloque de construcción o un segundo bloque de construcción, puede estar unido covalentemente a una pluralidad de moléculas huésped de cucurbiturilo. En una realización, un bloque de construcción está unido covalentemente a al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, al menos 2.000, al menos 5.000 o al menos 10.000 moléculas huésped cucurbiturilo.

25 En ciertas realizaciones, se pueden usar bloques de construcción unidos covalentemente a una o más moléculas huésped de cucurbiturilo. Sin embargo, dichos bloques de construcción se usan solo en combinación con otros bloques de construcción que están unidos covalentemente a al menos dos moléculas huésped de cucurbiturilo.

30 En una realización, se proporciona un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped y un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de segundas moléculas huésped. Cada uno de los bloques de construcción primero y segundo puede estar unido covalentemente a al menos el número de moléculas huésped descritas anteriormente.

35 En una realización, se proporciona un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped y unido covalentemente a una pluralidad de segundas moléculas huésped.

40 El primer bloque de construcción puede estar unido covalentemente a al menos el número de moléculas huésped descritas anteriormente, cuyos números pueden referirse independientemente al número de primeras moléculas huésped y al número de segundas moléculas huésped.

45 En una realización, se proporciona un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una o más terceras moléculas huésped y/o unido covalentemente a una o más cuartas moléculas huésped. En una realización, el segundo bloque de construcción está unido covalentemente al menos al número de moléculas huésped descritas anteriormente, números que pueden referirse independientemente al número de terceras moléculas huésped y al número de cuartas moléculas huésped. Tal segundo bloque de construcción puede usarse junto con el primer bloque de construcción descrito en el párrafo anterior.

50 A lo largo de la descripción, se hacen referencias al primer y segundo bloque de construcción. En algunas realizaciones, los bloques de construcción primero y segundo pueden distinguirse entre sí debido a diferencias, al menos, en la estructura de los propios bloques de construcción. En algunas realizaciones, las estructuras del primer y segundo bloque de construcción son las mismas. En este caso, los bloques de construcción se pueden distinguir entre sí debido a diferencias, al menos, en las moléculas huésped que están unidas covalentemente a cada una de las moléculas huésped primera y segunda. Así, los términos primero y segundo pretenden transmitir una diferencia entre el primer bloque de construcción junto con sus moléculas huésped y el segundo bloque de construcción junto con sus moléculas huésped.

Los bloques de construcción no están particularmente limitados, y el bloque de construcción incluye compuestos y partículas, y puede abarcar conjuntos de cualquiera de estos. Las moléculas huésped están unidas covalentemente a alguna parte del bloque de construcción.

En su forma más simple, un bloque de construcción es un conector para la conexión de moléculas huésped.

- 5 En una realización, el bloque de construcción es una molécula polimérica o una partícula.

Ventajosamente, un bloque de construcción puede estar provisto de cierta funcionalidad para ayudar a la formación de la cubierta de la cápsula, o para mejorar sus propiedades físicas o químicas.

- 10 En una realización, el bloque de construcción está provisto de funcionalidad para alterar, o preferiblemente mejorar, la solubilidad en agua. La funcionalidad puede tomar la forma de un grupo solubilizante, tal como un grupo que comprende la funcionalidad de polietilenglicol. Otros ejemplos incluyen grupos que comprenden la funcionalidad amino, hidroxilo, tiol y carboxilo.

- 15 En una realización, el bloque de construcción está provisto de funcionalidad para ayudar a la detección o análisis del bloque de construcción, y para ayudar a la detección o análisis de la cubierta formada. Ventajosamente, dicha funcionalidad también puede ayudar a la detección de material encapsulado dentro de la cubierta. La funcionalidad puede tomar la forma de una etiqueta detectable, como una etiqueta fluorescente.

En una realización, el bloque de construcción está provisto de funcionalidad reactiva para su uso en la elaboración posterior del material de la cubierta. La funcionalidad reactiva puede protegerse para las reacciones de formación de cubierta, luego desprotegerse para revelar la funcionalidad. La funcionalidad puede ser un grupo que comprende la funcionalidad amino, hidroxilo, tiol y carboxilo.

- 20 Cuando el bloque de construcción está provisto de funcionalidad reactiva, esta funcionalidad puede ser adecuada para unir el bloque de construcción (y por lo tanto la cápsula formada) a una superficie.

En una realización, el bloque de construcción está provisto de un catalizador para su uso posterior en la catálisis de una reacción en o cerca de la superficie de la cubierta. El catalizador se puede proporcionar en los bordes interno o externo de la cubierta para catalizar reacciones internas y/o externas.

- 25 En una realización, el bloque de construcción se elige por su capacidad de influir en las propiedades optoelectrónicas del encapsulante. Además, o alternativamente, el bloque de construcción puede elegirse por su capacidad de ser influenciado por el encapsulante. El bloque de construcción puede ser adecuado para transferir señales desde el encapsulante al entorno exterior.

- 30 En una realización, un bloque de construcción es capaz de proporcionar un efecto de resonancia mejorado en la superficie.

Cuando se proporciona funcionalidad, se puede ubicar en el lado externo, en el lado interno y/o dentro de la cubierta. Por lo tanto, la funcionalidad puede proporcionarse en relación con las mejoras relacionadas con el entorno fuera de la cubierta, dentro del espacio interno (el espacio para contener un encapsulante) de la cubierta y/o dentro de la cubierta (dentro de la red de material de la cubierta).

- 35 Para los fines de los métodos descritos en este documento, el bloque de construcción, junto con las moléculas huésped a las que está unido covalentemente, debe ser soluble, por ejemplo, en la segunda fase.

En una realización, el bloque de construcción tiene una solubilidad de al menos 0.01 mg/ml, al menos 0.02 mg/ml, al menos 0.05 mg/ml o al menos 0.10 mg/ml.

En una realización, la solubilidad se refiere a la solubilidad acuosa (es decir, una fase acuosa).

- 40 En una realización, la solubilidad se refiere a la solubilidad en una fase inmiscible con agua, tal como una fase oleosa o una fase orgánica.

Un bloque de construcción está vinculado a una molécula huésped de cucurbiturilo o moléculas huésped por enlaces covalentes. El enlace covalente puede ser un enlace carbono-carbono, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-oxígeno. El enlace puede ser parte de un grupo de enlace tal como un éster o una amida, y/o parte de un grupo que comprende una funcionalidad alquileo o alcoxi.

- 45 Cada molécula huésped puede estar unida al bloque de construcción utilizando técnicas de enlace químico de rutina. Por ejemplo, las moléculas huésped se pueden unir al bloque de construcción mediante: alquilación de un bloque de construcción que tenga un grupo saliente apropiado; reacciones de esterificación; reacciones de amidación;

reacciones formadoras de éter; metátesis cruzada de olefinas; o reacciones iniciadas por una molécula huésped pequeña en las que una cadena de polímero se desarrolla fuera de una molécula huésped iniciadora.

En una realización, el peso molecular promedio de un bloque de construcción, opcionalmente junto con cualquier molécula huésped, es al menos 1.000, al menos 5.000, al menos 10.000, o al menos 20.000.

- 5 En una realización, el peso molecular promedio de un bloque de construcción, opcionalmente junto con cualquier molécula huésped, es como máximo 30.000, como máximo 50.000, como máximo 100.000, como máximo 200.000, como máximo 500.000, como máximo 1.000.000, o como mínimo la mayoría de 2.000.000.

El peso molecular promedio puede referirse al número de peso molecular promedio o al peso molecular promedio en peso.

- 10 En una realización, el peso molecular promedio de un bloque de construcción está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, el peso molecular promedio está en el rango de 1.000 a 100.000.

- 15 En una realización, un bloque de construcción es capaz de proporcionar un efecto de resonancia mejorada en la superficie. Típicamente, dicha capacidad es proporcionada por una partícula, y más particularmente una partícula que contiene metal. Las partículas adecuadas son las descritas en el presente documento. Las más adecuadas son aquellas partículas que son capaces de proporcionar un efecto de superficie mejorada para la espectroscopía Raman de superficie mejorada.

A continuación se describen bloques de construcción que se basan en moléculas y partículas poliméricas, que incluyen nanopartículas.

- 20 En una realización, donde la red se puede obtener de una composición que comprende el primer y el segundo bloque de construcción, el primer bloque de construcción es una molécula polimérica y el segundo bloque de construcción es una partícula o una molécula polimérica. En una realización, donde la red se puede obtener de una composición que comprende el primer y el segundo bloque de construcción, el primer bloque de construcción es una molécula polimérica y el segundo bloque de construcción es una partícula.

25 Molécula Polimérica

El primer bloque de construcción es una molécula polimérica, preferiblemente la molécula polimérica es o comprende un poli(met)acrilato, un poliestireno y/o un polímero de poli(met)acrilamida, y opcionalmente la molécula polimérica comprende un marcador detectable.

- 30 Compuestos poliméricos que están unidos covalentemente a las moléculas huésped de cucurbiturilo se conocen del documento WO 2009/071899.

- 35 Las moléculas poliméricas comprenden una pluralidad de unidades estructurales repetitivas (monómeros) que están conectadas por enlaces covalentes. Las moléculas poliméricas pueden comprender un solo tipo de monómero (homopolímeros), o más de un tipo de monómero (copolímeros). Las moléculas poliméricas pueden ser lineales o ramificadas. Cuando la molécula polimérica es un copolímero, puede ser un polímero aleatorio, alterno, periódico, estadístico o de bloque, o una mezcla de los mismos. El copolímero también puede ser un polímero de injerto.

En una realización, la molécula polimérica tiene 2, 3, 4 o 5 unidades repetidas. Por conveniencia, dicho polímero puede denominarse oligómero.

En otras realizaciones, la molécula polimérica tiene al menos 4, al menos 8, al menos 15, al menos 100, o al menos 1.000 unidades de monómero. El número de unidades puede ser un número promedio de unidades.

- 40 En otra realización, la molécula polimérica tiene un número promedio de unidades de monómero en un intervalo seleccionado de 10-200, 50-200, 50-150 o 75-125.

- 45 El número de moléculas huésped por bloque de construcción de molécula polimérica es como se establece anteriormente. Alternativamente, el número de moléculas huésped puede expresarse como el porcentaje de monómeros presentes en el polímero que están unidos a las moléculas huésped como un total de todos los monómeros presentes en la molécula polimérica. Esto puede denominarse porcentaje de funcionalidad.

En una realización, la funcionalidad de una molécula polimérica es al menos 1%, al menos 2% o al menos 5%.

En una realización, la funcionalidad de una molécula polimérica es como máximo 50%, como máximo 40%, como máximo 20%, como máximo 15 o como máximo 10%.

En una realización, la funcionalidad está en un rango donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la funcionalidad está en el rango de 5 a 40%.

El porcentaje de funcionalidad puede determinarse a partir de mediciones de RMN de protón de una muestra de polímero.

5 En una realización, la molécula polimérica tiene un peso molecular (M_w) mayor que 500, mayor que 1000, mayor que 2000, mayor que 3000 o mayor que 4000. El peso molecular puede ser el peso molecular promedio en peso o el número promedio de peso molecular. Los pesos moleculares promedio en número y promedio en peso de un polímero pueden determinarse mediante técnicas convencionales.

10 En una realización, el polímero es un polímero polidisperso sintético. Un polímero polidisperso comprende moléculas poliméricas que tienen un rango de masas moleculares. El índice de polidispersidad (PDI) (peso molecular promedio en peso dividido por el peso molecular promedio en número) de un polímero polidisperso es mayor que 1, y puede estar en el rango de 5 a 20. La polidispersidad de una molécula polimérica puede determinarse mediante técnicas convencionales tales como la permeación en gel o la cromatografía de exclusión por tamaño.

15 Las moléculas poliméricas que tienen una polidispersidad relativamente baja son adecuadas para su uso en la presente invención. Dichas moléculas poliméricas pueden tener una polidispersidad en el intervalo seleccionado de 1 a 5, 1 a 3 o 1 a 2. Dichos polímeros pueden denominarse bajo- o monodispersos en vista de su dispersión relativamente baja.

20 El uso de moléculas poliméricas bajas o monodispersas es particularmente atractivo, ya que la reactividad de las moléculas individuales es relativamente uniforme, y los productos que resultan de su uso también pueden ser física y químicamente relativamente uniformes, y pueden ser relativamente bajos o monodispersos. Los métodos para la preparación de polímeros bajos o monodispersos son bien conocidos en la técnica e incluyen reacciones de polimerización basadas en la polimerización iniciada por radicales, incluida la polimerización RAFT (transferencia de cadena de fragmentación por adición reversible) (véase, por ejemplo, Chiefari et al. *Macromolecules* 1998, 31, 5559). En el presente documento también se proporciona una síntesis de ejemplo de un polímero que tiene una baja dispersión.

25 Muchas moléculas poliméricas son conocidas en la técnica y pueden usarse para producir material de cubierta como se describe en el presente documento. La elección de la molécula polimérica dependerá de la aplicación particular de la cápsula. Las moléculas poliméricas adecuadas incluyen polímeros naturales, tales como proteínas, oligopéptidos, ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos o polisacáridos (incluyendo celulosa y formas relacionadas como guar, quitosano, agarosa y alginato y sus derivados funcionalizados), o polímeros sintéticos, como polietilenglicol (PEG), cis-1,4-poliisopreno (PI), poli(met)acrilato, poliestireno, poli(acrilamida) y alcohol polivinílico. El polímero puede ser un homo o copolímero.

30 La molécula polimérica puede comprender dos o más polímeros naturales y/o sintéticos. Estos polímeros pueden disponerse en una arquitectura lineal, arquitectura cíclica, arquitectura en peine o injerto, arquitectura (hiper)ramificada o arquitectura en estrella.

35 Las moléculas poliméricas adecuadas incluyen aquellas moléculas poliméricas que tienen características hidrofílicas. Por lo tanto, una parte del polímero, que puede referirse, entre otros, a una unidad de monómero, la cadena principal, una cadena lateral o un polímero injertado, es hidrofílica. En una realización, la molécula polimérica es capaz de formar enlaces de hidrógeno en un disolvente polar, como el agua. La molécula polimérica es soluble en agua para formar una fase continua.

En una realización, la molécula polimérica es anfifílica.

40 Cuando se proporcionan dos o más bloques de construcción, tales como un primer y un segundo bloque de construcción, cada bloque de construcción puede seleccionarse independientemente de las moléculas poliméricas descritas anteriormente. En una realización, los bloques de construcción primero y segundo son diferentes. En una realización, los bloques de construcción primero y segundo son iguales. En este último caso, los bloques de construcción en sí difieren solo con respecto a las moléculas huésped que están unidas covalentemente a cada una.

En una realización, el polímero es o comprende un polímero de poli(met)acrilato, que puede ser o comprender un polímero de poli(acrilato). La funcionalidad acrilato del (met)acrilato puede ser el sitio para conectar la funcionalidad deseable, por ejemplo, para conectar un grupo solubilizante o un marcador detectable.

50 En una realización, la molécula polimérica se obtiene u obtiene de una composición polimerizable que comprende:

(i) monómero, tal como un (met)acrilato o un estireno, que está unido a una molécula huésped de cucurbiturilo;

y opcionalmente además comprende:

(ii) un monómero, tal como un (met)acrilato o un estireno, que está unido a una etiqueta detectable; y/o

(iii) un monómero, tal como un (met)acrilato o un estireno, que está unido a un grupo solubilizante, tal como un grupo solubilizante acuoso.

5 En una realización, cada monómero es un monómero de (met)acrilato.

En una realización, cada monómero es un monómero de estireno.

Cuando (i) está presente con otros componentes, tales como (ii) o (iii), está presente en la composición polimerizable en al menos 1, al menos 5, al menos 10 o al menos 20% molar.

10 Cuando (i) está presente con otros componentes, tales como (ii) o (iii), está presente en la composición polimerizable como máximo 90, como máximo 50, como máximo 40 o al menos 30% molar.

En una realización, la cantidad de (i) presente está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la cantidad presente en el rango de 10 a 50% molar.

En una realización, (i) está presente en un nivel suficiente para proporcionar una molécula polimérica que tiene una pluralidad de moléculas huésped cucurbiturilo unidas a cada molécula polimérica individual.

15 En una realización, (i) está presente en un nivel suficiente para proporcionar una molécula polimérica que tiene una sola molécula huésped de cucurbiturilo unida a cada molécula de polímero.

En una realización, (i) está presente en un nivel suficiente para proporcionar una molécula polimérica que tiene el % de funcionalidad descrito anteriormente.

20 Donde (ii) está presente, está presente en la composición polimerizable en al menos 0.5, al menos 1, o al menos 2% molar.

Donde (ii) está presente, está presente en la composición polimerizable como máximo 20, como máximo 10, o como máximo 5% molar.

En una realización, la cantidad de (ii) presente está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la cantidad presente en el rango de 1 a 5% molar.

25 Donde (iii) está presente, está presente en la composición polimerizable en al menos 0.5, al menos 1, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, o al menos 50% molar.

Donde (iii) está presente, está presente en la composición polimerizable como máximo 90, como máximo 80, o como máximo 70% molar.

30 En una realización, la cantidad de (iii) presente está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la cantidad presente en el rango de 10 a 80% molar.

Cuando se hace referencia al % molar, esta es una referencia a la cantidad de un componente presente con respecto a la cantidad total, en moles, de (i) y (ii) y (iii), cuando esté presente, y cualquier otro monómero polimerizable, donde esté presente. El componente mencionado puede ser uno de (i), (ii), (iii) o cualquier otro monómero polimerizable.

35 En una realización, la composición comprende además uno o más monómeros de (met) acrilato adicionales. Un monómero puede ser un monómero (met)acrilato. Uno o más monómeros pueden ser un monómero de (met)acrilato que está sustituido en el grupo éster.

40 Cuando se hace referencia al % molar, esta es una referencia a la cantidad de un componente presente con respecto a la cantidad total, en moles, de (i) y (ii) y (iii), donde esté presente, y cualquier otro monómero polimerizable, donde esté presente. El componente mencionado puede ser uno de (i), (ii), (iii) o cualquier otro monómero polimerizable. El componente al que se hace referencia puede ser un agente de transferencia de cadena o un iniciador radical, como se describe a continuación.

45 El término adjunto se refiere a la conexión del grupo acrilato (éster) o el grupo fenilo del estireno, directa o indirectamente al grupo especificado. Cuando hay una conexión indirecta, se entiende que un grupo enlazador puede formar la conexión entre el acrilato y el grupo especificado. En una realización, el conector puede comprender un grupo (poli)etilenglicol (PEG).

- En una realización, el marcador detectable es un marcador fluorescente. El marcador fluorescente puede ser un marcador de fluoresceína o rodamina. El "color" de la etiqueta no está particularmente restringido, y las etiquetas verde, roja, amarilla, cian y naranja son adecuadas para su uso.
- 5 En una realización, el grupo solubilizante acuoso es un grupo PEG. El grupo PEG puede tener al menos 2, 3, 4, 5 o 10 unidades repetidas de etilenglicol. El grupo PEG puede tener como máximo 50, 40, 20 o 15 unidades repetidas de etilenglicol.
- En una realización, el grupo solubilizante acuoso es o comprende amino, hidroxilo, carboxilo o ácido sulfónico.
- En una realización, el grupo amino es un grupo amino cuaternario, por ejemplo, un grupo trimetilamino.
- En una realización, la composición comprende además un agente de transferencia de cadena.
- 10 En una realización, el agente de transferencia de cadena es un compuesto de tiocarbonilo.
- Cuando está presente un agente de transferencia de cadena, está presente en la composición polimerizable en al menos 0.1, al menos 0.5, o al menos 1% molar.
- Cuando está presente un agente de transferencia de cadena, está presente en la composición polimerizable en como máximo 10, como máximo 5, o como máximo 2% molar.
- 15 En una realización, la cantidad de un agente de transferencia de cadena presente está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la cantidad presente en el rango de 0.5 a 2% molar.
- En una realización, la composición comprende además un iniciador radical.
- 20 Cuando está presente un iniciador radical, está presente en la composición polimerizable en al menos 0.01, al menos 0.05, al menos 0.1% molar.
- Cuando está presente un iniciador radical, está presente en la composición polimerizable como máximo 5, como máximo 2, como máximo 1 o como máximo 0.5% molar.
- 25 En una realización, la cantidad de un iniciador radical presente está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la cantidad presente en el rango de 0.1 a 0.5% molar.
- En una realización, el iniciador radical se selecciona del grupo que consiste en AIBN (azobisisobutironitrilo), ACPA (4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico)) y ACVA (4,4'-Azobis(ácido 4-cianovalérico)).
- 30 En una realización, la molécula polimérica se obtiene u obtiene de la polimerización de una composición que comprende (i) y opcionalmente (ii) y/o (iii) usando el agente de transferencia de cambio y/o el iniciador de radicales descrito.
- En una realización, la molécula polimérica se puede obtener o es obtenible a partir de una composición descrita en el presente documento usando un proceso de polimerización por radicales.
- 35 En una realización, la reacción de polimerización se realiza a temperatura elevada. La reacción puede realizarse a una temperatura de al menos 30°C, al menos 40°C o al menos 50°C.
- La reacción puede realizarse a una temperatura de como máximo 100, como máximo 90 o como máximo 80°C.
- En una realización, la reacción de polimerización se realiza en un disolvente orgánico. El disolvente original puede ser un disolvente de éter, por ejemplo, 1,4-dioxano, o un disolvente de alcohol alquílico, por ejemplo, etanol. La reacción de polimerización puede realizarse a temperatura de reflujo.
- 40 La concentración de la mezcla polimerizable en el disolvente orgánico puede ser como máximo 5.0, como máximo 2.0 o como máximo 1.5 M.
- La concentración de la mezcla polimerizable en el disolvente orgánico puede ser al menos 0.05, al menos 0.1, al menos 0.5 M, o al menos 1.0 M.
- En una realización, la concentración está en un intervalo en donde las cantidades mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la concentración está en el rango de 1.0 a 2.0 M.

En una realización, la reacción de polimerización se realiza durante al menos 1, al menos 5 o al menos 10 horas.

En una realización, la reacción de polimerización se realiza como máximo 72, o como máximo 48 horas.

La reacción de polimerización puede detenerse usando técnicas familiares para los expertos en la técnica. Los pasos pueden incluir la dilución de la mezcla de reacción y/o la reducción de la temperatura.

- 5 En una realización, la reacción de polimerización se realiza durante un tiempo suficiente para obtener una molécula polimérica que tiene un peso molecular como se describe en el presente documento.

En una realización, la reacción de polimerización se realiza durante un tiempo suficiente para obtener una molécula polimérica que tiene una pluralidad de moléculas huésped.

- 10 En una realización, la reacción de polimerización se realiza durante un tiempo suficiente para obtener una molécula polimérica que tiene una molécula huésped.

La concentración de la mezcla polimerizable se refiere a la cantidad total de monómero presente (que incluye (i), y (ii) y (iii), cuando esté presente, y cualquier otro monómero polimerizable, cuando está presente) en moles, en unidad volumen de disolvente orgánico (es decir, por litro).

En una realización, el polímero puede formarse como una partícula.

- 15 Partícula

En una realización, el bloque de construcción es una partícula. El tipo de partícula para uso en la presente invención no está particularmente limitado.

En una realización, la partícula es un primer bloque de construcción y la partícula está unida a una pluralidad de moléculas huésped cucurbiturilo.

- 20 En una realización, la partícula es un segundo bloque de construcción y la partícula está unida a una o más moléculas huésped de cucurbiturilo.

En una realización, la partícula es un segundo bloque de construcción y la partícula está unida a una pluralidad de moléculas huésped cucurbiturilo.

- 25 Típicamente, la partícula tiene un tamaño que es una, dos, tres o cuatro magnitudes más pequeñas que el tamaño de la cápsula.

En una realización, la partícula es una nanopartícula. Una nanopartícula tiene un tamaño promedio de al menos 1, al menos 5 o al menos 10 nm de diámetro. Una nanopartícula tiene un tamaño promedio de como máximo 900, como máximo 500, como máximo 200 o como máximo 100 nm de diámetro.

En una realización, la nanopartícula tiene un tamaño medio en el intervalo de 1-100 nm o 5-60 nm de diámetro.

- 30 El promedio se refiere al promedio numérico. El diámetro de una partícula puede medirse utilizando técnicas microscópicas, que incluyen TEM.

En una realización, las partículas tienen una desviación estándar relativa (RSD) de como máximo 0.5%, como máximo 1%, como máximo 1.5%, como máximo 2%, como máximo 4%, como máximo 5%, como máximo 7%, como máximo 10%, como máximo 15%, como máximo 20% o como máximo 25%.

- 35 En una realización, la partícula tiene un diámetro hidrodinámico de al menos 1, al menos 5, o al menos 10 nM de diámetro.

En una realización, la partícula tiene un diámetro hidrodinámico de como máximo 900, como máximo 500, como máximo 200, o como máximo 100 nM de diámetro.

- 40 El diámetro hidrodinámico puede referirse al número promedio o al volumen promedio. El diámetro hidrodinámico puede determinarse a partir de mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) de una muestra de partículas.

En una realización, la partícula es una partícula metálica.

En una realización, la partícula es una partícula de metal de transición.

En una realización, la partícula es una partícula de metal noble.

En una realización, la partícula es o comprende cobre, rutenio, paladio, platino, titanio, óxido de zinc, oro o plata, o mezclas de los mismos.

En una realización, la partícula es o comprende partículas de oro, plata o una mezcla de las mismas.

En una realización, la partícula es una partícula de oro o plata, o una mezcla de las mismas.

- 5 En una realización, la partícula es una nanopartícula de oro (AuNP).

En una realización, la partícula es o comprende sílice o carbonato de calcio.

En una realización, la partícula es un punto cuántico.

En una realización, la partícula es o comprende un polímero. El polímero puede ser un polímero de poliestireno o poliacrilamida. El polímero puede ser un polímero biológico que incluye, por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido.

- 10 En una realización, la partícula comprende un material adecuado para uso en espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS). Las partículas de oro y/o plata y/u otros metales de transición son adecuadas para tal uso.

Las partículas de oro y plata se pueden preparar usando técnicas conocidas en la técnica. Ejemplos de preparaciones incluyen los descritos por Coulston et al. (Chem. Commun. 2011, 47, 164) Martin et al. (Martin et al. Langmuir 2010, 26, 7410) y Frens (Frens Nature Phys. Sci. 1973, 241, 20), que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

- 15 La partícula está unida a una o más moléculas huésped, según corresponda. Típicamente, cuando la partícula es un primer bloque de construcción, se le proporciona al menos una pluralidad de moléculas huésped. Cuando la partícula es un segundo bloque de construcción, se proporciona en una o más moléculas huésped.

- 20 En una realización, una molécula huésped puede unirse covalentemente a una partícula a través de un grupo de enlace. El grupo de enlace puede ser un elemento espaciador para proporcionar distancia entre la molécula huésped y el volumen de partículas. El enlazador puede incluir funcionalidad para mejorar la solubilidad en agua del bloque de construcción combinado y la construcción de la molécula huésped. El enlazador está provisto de funcionalidad para permitir la conexión a la superficie de la partícula. Por ejemplo, cuando la partícula es una partícula de oro, el conector tiene la funcionalidad tiol para la formación de un enlace de oro-azufre de conexión.

- 25 Alternativamente, una molécula huésped puede unirse directamente a la superficie de la partícula, a través de una funcionalidad adecuada. Por ejemplo, cuando la partícula es una partícula de oro, la molécula huésped puede unirse a la superficie de oro a través de una funcionalidad tiol de la molécula huésped.

En una realización, la partícula comprende grupos solubilizantes de modo que la partícula, junto con sus moléculas huésped, es soluble en agua o es soluble en una fase inmiscible con agua.

- 30 Los grupos solubilizantes están unidos a la superficie de la partícula. El grupo solubilizante puede unirse covalentemente a la partícula a través de una funcionalidad adecuada. Cuando la partícula es una partícula de oro, el grupo solubilizante se une a través de un enlace de azufre a la superficie de oro.

El grupo solubilizante puede ser, o comprender, funcionalidad de polietilenglicol o amina, hidroxilo, carboxilo o tiol.

En una realización, el bloque de construcción se obtiene u obtiene de una composición que comprende:

- (i) una partícula de oro;
- 35 (ii) una molécula huésped junto con un grupo de enlace que tiene funcionalidad tiol; y
- (iii) una molécula solubilizante que tiene funcionalidad tiol; y opcionalmente además comprende
- (iv) otra molécula huésped, junto con un grupo de enlace que tiene funcionalidad tiol.

En una realización, la cantidad de molécula huésped presente en la composición es al menos 1, al menos 5, al menos 10 o al menos 15% molar.

- 40 En una realización, la cantidad de molécula huésped presente en la composición es como máximo 80, como máximo 50 o como máximo 25% molar.

Una referencia al % molar es una referencia a la cantidad de molécula huésped presente como un porcentaje de la cantidad total de (ii) y (iii), y (iv) cuando está presente, en la composición.

La cantidad de (ii) presente en la composición puede ser tal que permita la preparación de un bloque de construcción de partículas que tenga una pluralidad de moléculas huésped.

Huésped cucurbiturilo

5 Como se señaló anteriormente, el huésped es un compuesto que es capaz de formar un complejo hospedero-huésped con un cucurbiturilo. El término complejación, por lo tanto, se refiere al establecimiento del complejo huésped-anfitrión.

En algunas realizaciones de la invención, el complejo huésped hospedero es un complejo ternario que comprende el huésped cucurbiturilo y una primera molécula huésped y una segunda molécula. Típicamente, tales complejos se basan en CB[8] y variantes y derivados de los mismos.

10 En algunas realizaciones de la invención, el complejo huésped hospedero es un complejo binario que comprende el huésped cucurbiturilo y una primera molécula huésped. Típicamente, tales complejos se basan en CB[5] o CB[7], y sus variantes y derivados. En la presente invención, los complejos binarios se pueden obtener de una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente. CB[8], y sus variantes y derivados, también pueden formar complejos binarios.

15 En principio, cualquier compuesto que tenga una afinidad de unión adecuada puede usarse en los métodos de la presente invención. El compuesto utilizado puede seleccionarse en función del tamaño de las unidades estructurales que se cree que interactúan con la cavidad del cucurbiturilo. El tamaño de estas unidades estructurales puede ser lo suficientemente grande como para permitir la complejación solo con formas de cucurbiturilo más grandes.

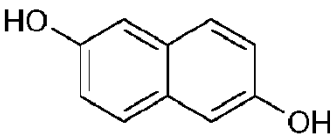
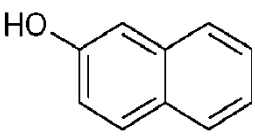
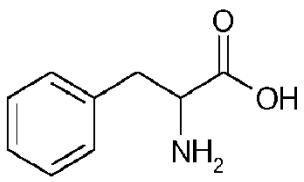
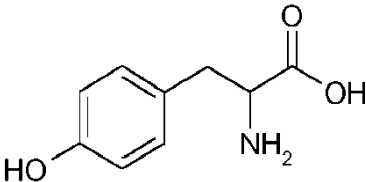
20 El término selectivo puede usarse para referirse a la cantidad de complejo hospedero-huésped formado. Donde el cucurbiturilo (el primer cucurbiturilo) y un segundo cucurbiturilo están presentes en una mezcla con una molécula huésped particular o moléculas huésped. El complejo hospedero-huésped formado entre el primer cucurbiturilo y el huésped (en un complejo binario) o huéspedes (en un complejo ternario) puede tener al menos 60% mol, al menos 70% mol, al menos 80% mol, al menos 90% mol, al menos 95% mol, al menos 97% mol, al menos 98% mol, o al menos 99% mol, de la cantidad total de complejo hospedero-huésped formado (por ejemplo, teniendo en cuenta la cantidad de huésped-complejo huésped-hospedero formado entre el segundo cucurbiturilo y el huésped o huéspedes, si los hay).

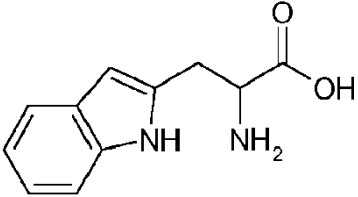
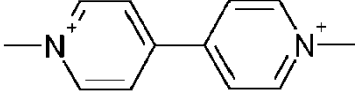
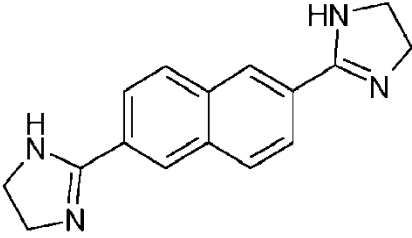
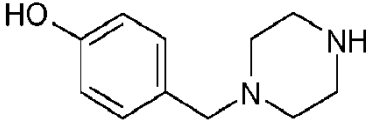
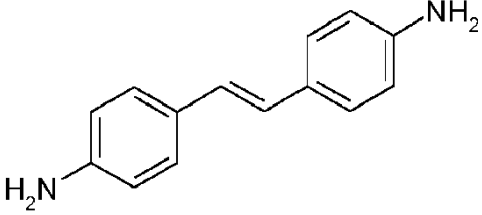
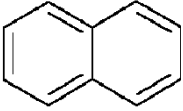
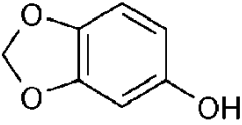
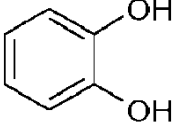
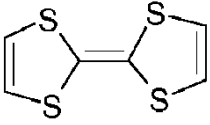
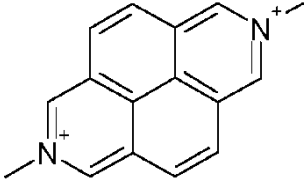
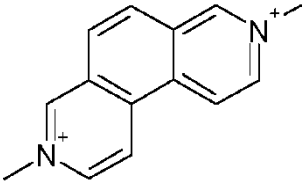
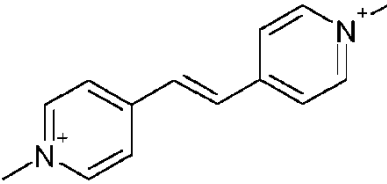
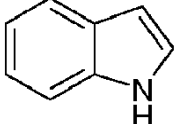
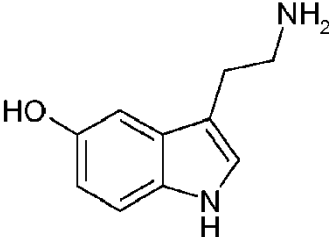
25 En una realización, el complejo hospedero-huésped formado a partir del (primer) cucurbiturilo y el huésped o huéspedes tiene una afinidad de unión que es al menos 100 veces mayor que la afinidad de unión de un complejo huésped hospedero formado a partir del segundo cucurbiturilo y el huésped o huéspedes. Preferiblemente, la afinidad de unión es al menos 10^3 , al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 o al menos 10^7 mayor.

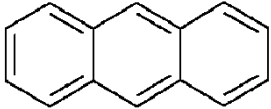
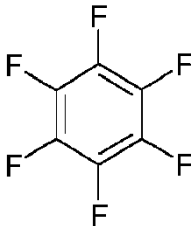
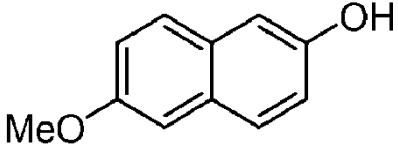
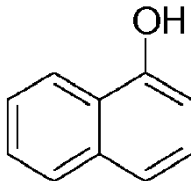
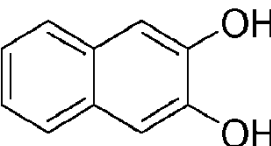
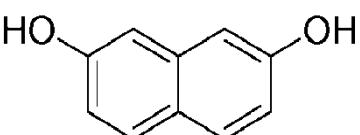
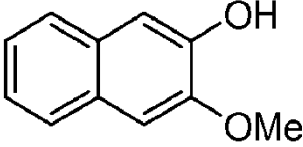
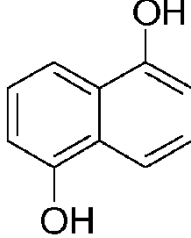
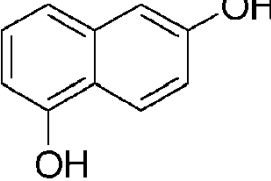
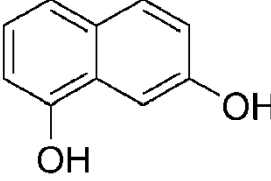
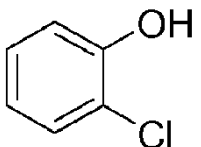
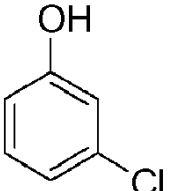
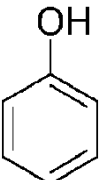
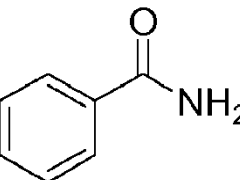
30 Las moléculas huésped de cucurbiturilo son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de compuestos huésped para su uso incluyen los descritos en WO 2009/071899, Jiao et al. (Jiao et al. Org. Lett. 2011, 13, 3044), Jiao et al. (Jiao et al. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 15734) y Rauwald et al. (Rauwald et al. J. Phys. Chem. 2010, 114, 8606).

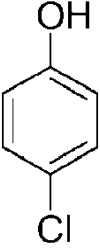
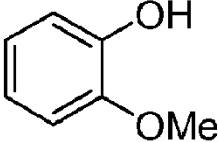
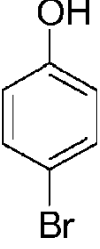
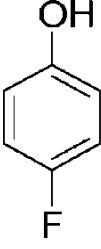
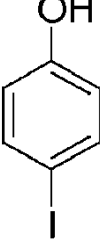
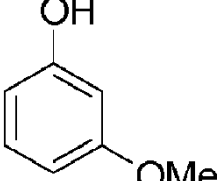
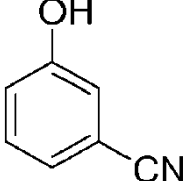
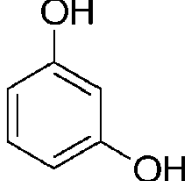
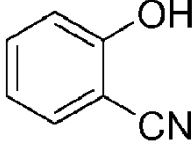
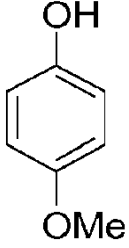
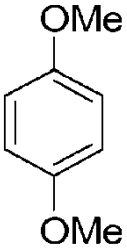
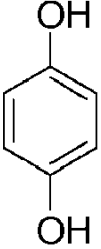
A continuación se describen moléculas huésped que son adecuadas para su uso en la formación de una cubierta de cápsula. Dichas moléculas huésped se pueden conectar a un bloque de construcción utilizando técnicas sintéticas estándar.

35 Una molécula huésped de cucurbiturilo puede derivarse de, o contener, una estructura de la tabla a continuación:

Moléculas huésped			
A1		A2	
A3		A4	

Moléculas huésped			
A5		B1	
A6		A7	
A8		A9	
A10		A11	
A12		B2	
B3		B4	
A13		A14	

Moléculas huésped			
A15		A16	
A17		A18	
A19		A20	
A21		A22	
A23		A24	
A25		A26	
A27		A28	

Moléculas huésped			
A29		A30	
A31		A32	
A33		A34	
A35		A36	
A37		A38	
A39		A40	

Moléculas huésped			
A41		A42	
A43		A44	
A45		A46	

donde la estructura puede ser una sal, incluidas formas protonadas, cuando sea apropiado. En una realización, las moléculas huésped son moléculas huésped para CB[8].

5 En una realización, la molécula huésped es, o se deriva de, o contiene, la estructura A1-A43, A46 o B1-B4, en la tabla anterior.

En una realización, la molécula huésped es, o se deriva de, o contiene, la estructura A1, A2 o A13 en la tabla anterior.

En una realización, la molécula huésped es, o se deriva de, o contiene, la estructura B1.

Además, la molécula huésped es o se deriva de, o contiene, adamantano, ferroceno o ciclooctano (incluyendo biciclo[2.2.2]octano). Tales son descritos por Moghaddam et al. (véase J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 3570).

10 En algunas realizaciones, las moléculas huésped primera y segunda forman un par que puede interactuar dentro de la cavidad de cucurbiturilo para formar un complejo hospedero-huésped ternario estable. Se puede emplear cualquier par de huéspedes que se ajuste dentro de la cavidad del cucurbiturilo. En algunas realizaciones, el par de moléculas huésped puede formar un par de transferencia de carga que comprende un compuesto rico en electrones y un compuesto deficiente en electrones. Una de las moléculas huésped primera y segunda actúa como un receptor de electrones y la otra como un donante de electrones en el par CT. Por ejemplo, la primera molécula huésped puede ser una molécula deficiente en electrones que actúa como aceptor de electrones y la segunda molécula invitada puede ser una molécula rica en electrones que actúa como donante de electrones o viceversa. En una realización, el cucurbiturilo es CB[8].

20 Aceptores de electrones adecuados incluyen derivados de 4,4'-bipiridinio, por ejemplo, N,N'-dimetildipiridilioetileno y otros aceptores relacionados, tales como los basados en diazapirenos y diazafenantrenos. Los compuestos viológenos que incluyen alquil viológenos son particularmente adecuados para usar en la presente invención. Ejemplos de compuestos de alquil viológeno incluyen sales de N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinio (también conocido como Paraquat).

25 Los donantes de electrones adecuados incluyen moléculas aromáticas ricas en electrones, por ejemplo 1,2-dihidroxibenceno, 1,3-dihidroxibenceno, 1,4-dihidroxibenceno, tetraiafulvaleno, naftalenos tales como 2,6-dihidroxinaftaleno y 2-naftol, indol y sesamol (3,4-metilendioxi-fenol). Los compuestos aromáticos policíclicos en

general pueden encontrar uso como donadores de electrones adecuados en la presente invención. Ejemplos de tales compuestos incluyen antraceno y naftaceno.

5 Los aminoácidos, tales como triptófano, tirosina y fenilalanina pueden ser adecuados para usar como donantes de electrones. Se pueden usar secuencias peptídicas que comprenden estos aminoácidos en su término. Por ejemplo, se puede usar un donante que comprende una secuencia de aminoácidos N-WGG-C, N-GGW-C o N-GWG-C.

En algunas realizaciones, las moléculas huésped son un par de compuestos, por ejemplo, la primera y la segunda molécula huésped, donde uno de los pares es un compuesto A como se expone en la tabla anterior (por ejemplo, A1, A2, A3, etc.), y el otro del par es un compuesto B como se establece en la tabla anterior (por ejemplo, B1, B2, B3, etc.). En una realización, el compuesto A se selecciona de A1-A43 y A46. En un ejemplo, el compuesto B es B1.

10 Otras moléculas huésped adecuadas incluyen péptidos tales como WGG (Bush, M. E. et al. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 14511-14517).

Una molécula huésped rica en electrones puede emparejarse con cualquier molécula huésped CB[8] deficiente en electrones. Ejemplos de pares adecuados de moléculas huésped, por ejemplo, la primera y segunda moléculas huésped, para su uso como se describe en el presente documento pueden incluir:

15 viológeno y naftol;

viológeno y dihidroxibenceno;

viológeno y tetratíafulvaleno;

viológeno e indol;

metilviológeno y naftol;

20 metilviológeno y dihidroxibenceno;

metilviológeno y tetratíafulvaleno;

metilviológeno e indol;

N,N'-dimetildipiridilioetileno y naftol;

N,N'-dimetildipiridilioetileno y dihidroxibenceno;

25 N,N'-dimetildipiridilioetileno y tetratíafulvaleno;

N,N'-dimetildipiridilioetileno e indol;

2,7-dimetildiazapireno y naftol;

2,7-dimetildiazapireno y dihidroxibenceno;

2,7-dimetildiazapireno y tetratíafulvaleno; y

30 2,7-dimetildiazapireno e indol.

En particular, los pares adecuados de moléculas huésped para usar como se describe en el presente documento pueden incluir 2-naftol y metilviológeno, 2,6-dihidroxinaftaleno y metilviológeno y tetratíafulvaleno y metilviológeno.

En una realización, el par huésped es 2-naftol y metilviológeno.

35 En una realización, el par huésped es una referencia a un par de moléculas huésped adecuadas para formar un complejo ternario con CB[8].

En una realización, la molécula huésped es preferiblemente un líquido iónico. Típicamente, tales huéspedes son adecuados para formar un complejo con CB[7]. Sin embargo, también pueden formar complejos con CB[8] en un complejo binario o en un complejo ternario junto con otra pequeña molécula huésped o disolvente (véase Jiao et al. Org. Lett. 2011, 13, 3044).

40 El líquido iónico típicamente comprende un heterociclo de nitrógeno orgánico catiónico, que puede ser un heterociclo de nitrógeno aromático (un heteroarilo) o un heterociclo de nitrógeno no aromático. El líquido iónico también comprende típicamente un contraanión al heterociclo de nitrógeno orgánico catiónico. El grupo heteroarilo de nitrógeno

5 es preferiblemente un grupo heteroarilo C₅₋₁₀ de nitrógeno, lo más preferiblemente un grupo heteroarilo C₅₋₆ de nitrógeno, donde el subíndice se refiere al número total de átomos en el anillo o anillos, incluidos los átomos de carbono y nitrógeno. El heterociclo de nitrógeno no aromático es preferiblemente un heterociclo de nitrógeno C₅₋₆, donde el subíndice se refiere al número total de átomos en el anillo o anillos, incluidos los átomos de carbono y nitrógeno. Un átomo de nitrógeno en el anillo del heterociclo de nitrógeno se cuaterniza.

El contraanión puede ser un haluro, preferiblemente un bromuro. Otros contraaniones adecuados para su uso son aquellos que dan como resultado un complejo que es soluble en agua.

10 El huésped es preferiblemente un compuesto, que incluye una sal, que comprende uno de los siguientes grupos seleccionados de la lista que consiste en: unidad estructural imidazolio; unidad estructural piridinio; unidad estructural quinolinio; unidad estructural pirimidinio; unidad estructural pirrolio; y unidad estructural pirrolidina cuaternaria.

Preferiblemente, el huésped comprende una unidad estructural imidazolio. Un huésped especialmente preferido es 1-alkil-3-alkylimidazolio, donde los grupos alquilo están opcionalmente sustituidos.

Los compuestos de 1-alkil-3-alkylimidazolio, donde los grupos alquilo no están sustituidos, son especialmente adecuados para formar un complejo con CB[7].

15 Los compuestos de 1-alkil-3-alkylimidazolio, donde los grupos alquilo no están sustituidos, son especialmente adecuados para formar un complejo con CB[6].

Los compuestos de 1-alkil-3-alkylimidazolio, donde un grupo alquilo está sustituido con arilo (preferiblemente naftilo), son especialmente adecuados para formar un complejo con CB[8].

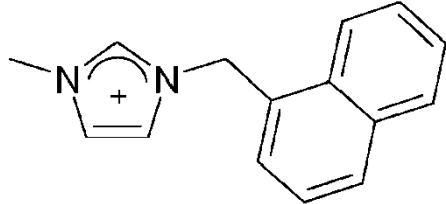
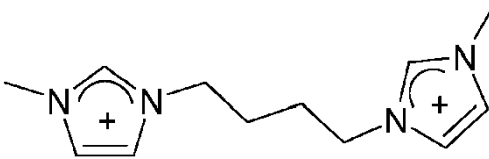
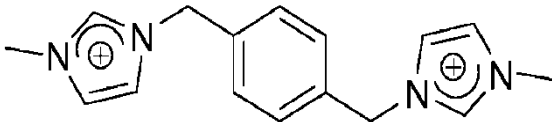
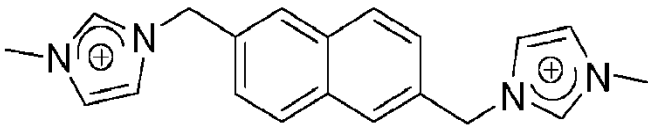
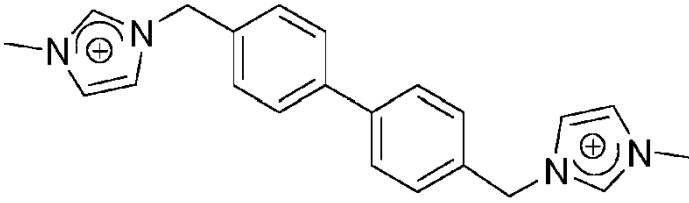
Los sustituyentes 1-alkilo y 3-alkilo pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, son diferentes.

20 En una realización, el sustituyente 3-alkilo es metilo, y preferiblemente no está sustituido.

En una realización, el sustituyente 1-alkilo es etilo o butilo, y cada uno está preferiblemente sin sustituir.

En una realización, el sustituyente opcional es arilo, preferiblemente arilo C₅₋₁₀. Arilo incluye carboarilo y heteroarilo. Los grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y quinolinilo.

Catión	Estructura
A	
B	
C	
D	

Catión	Estructura
E	
F	
G	
H	
I	

En una realización, los grupos alquilo descritos aquí son grupos alquilo lineales.

Cada grupo alquilo es independientemente un grupo alquilo C₁₋₆, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₄.

5 El sustituyente arilo puede ser otra unidad estructural imidazolio 1-alquil-3-sustituido (donde el grupo alquilo está unido a la posición 3 del anillo).

En otra realización, el compuesto comprende preferiblemente una unidad estructural piridinio.

Las moléculas líquidas iónicas descritas anteriormente son particularmente útiles para formar complejos binarios hospedero-huésped. La presente invención también abarca complejos que comprenden dos moléculas líquidas iónicas como huéspedes dentro de un huésped cucurbiturilo.

10 Un cucurbiturilo puede ser capaz de formar complejos binarios y ternarios. Por ejemplo, se ha observado previamente que los compuestos CB[6] forman complejos ternarios con moléculas huésped de cadena corta de 1-alquil-3-metilimidazolio, mientras que las moléculas huésped de cadena más larga de 1-alquil-3-metilimidazolio forman complejos binarios con el huésped cucurbiturilo.

15 Los huéspedes preferidos para usar en la presente invención son de la forma H⁺X⁻, donde H⁺ es uno de los siguientes cationes,

y X⁻ es un contraanión adecuado, como se definió anteriormente. Un contraanión preferido es un anión haluro, preferiblemente Br⁻.

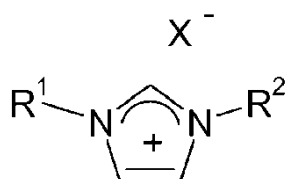
En una realización preferida, el catión A o el catión B pueden usarse para formar un complejo con CB[7] o CB[6].

En una realización preferida, el catión D o el catión E pueden usarse para formar un complejo con CB[8].

- 5 Los cationes A y B pueden denominarse 1-etil-3-metilimidazolio y 1-butil-3-metilimidazolio, respectivamente.

Los cationes D y E pueden denominarse 1-naftalenilmetil-3-metilimidazolio, donde D es 1-naftalen-2-ilmetil-3-metilimidazolio y E es 1-naftalen-1-ilmetil-3-metilimidazolio.

Alternativa o adicionalmente, los compuestos huésped pueden ser una sal de imidazolio de fórmula (I)



- 10 en donde X⁻ es un contraanión;

R¹ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁₋₆ saturado;

R² es independientemente alquilo C₁₋₁₀ que puede contener opcionalmente uno o más enlaces dobles o triples, y puede estar opcionalmente interrumpido por un heteroátomo seleccionado de -O-, -S-, -NH- y -B-, y puede estar opcionalmente sustituido.

- 15 En una realización, X⁻ se selecciona independientemente del grupo que consiste en Cl⁻, Br⁻, I⁻, BF₄⁻, PF₆⁻, OH⁻, SH⁻, HSO₄⁻, HCO₃⁻, NTf₂⁻, C₂N₅O₄⁻, AlCl₄⁻, Fe₃Cl₁₂⁻, NO₃⁻, NMeS₂⁻, MeSO₃⁻, SbF₆⁻, PrCB₁₁H₁₁⁻, AuCl₄⁻, HF₂⁻, NO₂⁻, Ag(CN)₂⁻, y NiCl₄⁻. En una realización, X⁻ se selecciona de Cl⁻, Br⁻ e I⁻.

En una realización, R¹ se selecciona de H y alquilo C₁₋₆ lineal saturado.

- 20 En una realización, R² es alquilo lineal C₁₋₁₀, que puede contener opcionalmente uno o más dobles enlaces, y puede estar opcionalmente interrumpido por un heteroátomo seleccionado de -O-, -S-, -N- y -B-, y puede estar opcionalmente sustituido.

En una realización, R² es alquilo lineal C₁₋₁₀, que opcionalmente puede contener uno o más dobles enlaces, y puede estar opcionalmente sustituido.

- 25 En una realización, cuando esté presente un enlace doble o triple, puede conjugarse con la unidad estructural imidazolio. Alternativamente, el enlace doble o triple no puede conjugarse con la unidad estructural imidazolio.

En una realización, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halo, arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido, -OR³, -OCOR³, =O, -SR³, =S, -BR³, -NR³R⁴, -NR³COR³, -N(R³)CONR³R⁴, -COOR³, -C(O)R³, -C(=O)SR³, -CONR³R⁴, -C(S)R³, -C(=S)SR³, y -C(=S)NR³R⁴,

- 30 donde cada uno de R³ y R⁴ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁₋₆ saturado opcionalmente sustituido, arilo C₅₋₂₀ y alquileno C₁₋₆-arilo C₅₋₂₀

o R³ y R⁴ juntos pueden formar un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros opcionalmente saturado que está opcionalmente sustituido con un grupo -R³.

- 35 En una realización, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halo, arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido, -OR³, -OCOR³, -NR³R⁴, -NR³COR³, -N(R³)CONR³R⁴, -COOR³, -C(O)R³, y -CONR³R⁴, donde R³ y R⁴ se definen como se indicó anteriormente.

Cada grupo arilo C₅₋₂₀ puede seleccionarse independientemente de un grupo carboarilo C₆₋₂₀ o un grupo heteroarilo C₅₋₂₀.

Ejemplos de grupos carboarilo C₆₋₂₀ incluyen fenilo y naftilo.

Ejemplos de grupos heteroarilo C₅₋₂₀ incluyen pirrol (azol) (C₅), piridina (azina) (C₆), furano (oxole) (C₅), tiofeno (tiole) (C₅), oxazol (C₅), tiazol (C₅), imidazol (1,3-diazol) (C₅), pirazol (1,2-diazol) (C₅), piridazina (1,2-diazina) (C₆) y pirimidina (1,3-diazina) (C₆) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo).

Cada arilo C₅₋₂₀ se selecciona preferiblemente de fenilo, naftilo e imidazolio opcionalmente sustituidos.

- 5 Cada grupo arilo C₅₋₂₀ está opcionalmente sustituido. Los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, -OR³, -OCOR³, -NR³R⁴, -NR³COR³, -N(R³)CONR³R⁴, -COOR³, -C(O)R³, y -CONR³R⁴, donde R³ y R⁴ se definen como se indicó anteriormente.

En una realización, cada grupo arilo C₅₋₂₀ está opcionalmente sustituido con alquilo C₁₋₆.

- 10 Cuando el grupo arilo C₅₋₂₀ es un imidazolio, tal está preferiblemente sustituido en nitrógeno con un grupo R¹ (formando así un nitrógeno cuaternario).

El compuesto de fórmula (I) comprende una unidad estructural imidazolio que tiene un sustituyente R² en la posición 1 y un sustituyente R¹ en la posición 3. En un aspecto adicional de la invención, el compuesto de fórmula (I) puede estar opcionalmente sustituido adicionalmente en la posición 2-, 4- o 5- con un grupo R^A, en donde R^A tiene el mismo significado que R¹.

- 15 Las realizaciones anteriores son combinables en cualquier combinación, según sea apropiado.

Encapsulante

La cápsula de la invención puede usarse para encapsular un componente (el encapsulante). En una realización, se proporciona una cápsula que comprende un encapsulante. La cápsula es adecuada para almacenar un componente, y este componente puede liberarse más tarde según sea necesario en la ubicación elegida.

- 20 Se entiende que una referencia a un componente encapsulado no es una referencia a una molécula de disolvente. Por ejemplo, el componente encapsulado no es agua o no es un aceite o un solvente orgánico. También se entiende que una referencia a un componente encapsulado no es una referencia a un cucurbiturilo o un bloque de construcción para usar en la preparación de la cubierta de la cápsula. De lo contrario, el componente no está particularmente limitado.

- 25 Por lo tanto, el encapsulante es un componente de la cápsula que se proporciona además del disolvente que puede estar presente dentro de la cubierta.

- 30 En los métodos de la invención, la cubierta de la cápsula se prepara a partir de una composición que comprende un cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción, según sea apropiado. No todo el cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción pueden reaccionar para formar material de concha. Además, el cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción pueden reaccionar para formar una red, pero esta red puede no estar incluida en la cubierta que forma la cápsula. Estos reactivos y productos no reaccionados o parcialmente reaccionados pueden estar contenidos dentro de la cubierta, y pueden estar contenidos además del encapsulante. Por lo tanto, el encapsulante es un componente de la cápsula que se proporciona además de reactivos y productos no reaccionados o parcialmente reaccionados que pueden estar presentes dentro de la cubierta.

- 35 En una realización, el compuesto encapsulante tiene una solubilidad de al menos 0.01 mg/ml, al menos 0.02 mg/ml, al menos 0.05 mg/ml o al menos 0.10 mg/ml.

En una realización, la solubilidad se refiere a la solubilidad acuosa (es decir, una fase acuosa).

En una realización, la solubilidad se refiere a la solubilidad en una fase oleosa o una fase orgánica.

Las cápsulas de la invención pueden usarse para encapsular una amplia gama de componentes.

- 40 En una realización, el componente encapsulado tiene un peso molecular de al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 1.000, al menos 5.000 (1k), al menos 10.000 (10k), al menos 50.000 (50k), al menos 100.000 (100k) o al menos 200.000 (200k).

En una realización, el encapsulante es un compuesto terapéutico.

- 45 En una realización, el encapsulante es una molécula biológica, tal como un polinucleótido (por ejemplo, ADN y ARN), un polipéptido o un polisacárido.

En una realización, el encapsulante es una molécula polimérica, que incluye polímeros biológicos tales como los polímeros mencionados anteriormente.

En una realización, el encapsulante es una célula.

En una realización, el encapsulante es una tinta.

En una realización, el encapsulante es un nanotubo de carbono.

En una realización, el encapsulante es una partícula. La partícula puede ser una partícula metálica.

- 5 El tamaño de la cápsula se selecciona para acomodar el tamaño del encapsulante. Por lo tanto, el diámetro interno (la distancia desde la pared más interna a la pared más interna) es mayor que la mayor dimensión del encapsulante.

En una realización, el encapsulante tiene un marcador detectable. El marcador detectable puede usarse para cuantificar y/o localizar el encapsulante. La etiqueta puede usarse para determinar la cantidad de encapsulante contenido en la cápsula.

- 10 En una realización, el marcador detectable es un marcador luminiscente. En una realización, el marcador detectable es un marcador fluorescente o un marcador fosforescente.

En una realización, el marcador detectable es visible.

En una realización, el marcador fluorescente es un marcador de rodamina o fluoresceína.

- 15 En una realización, la cápsula de la invención es para usar como un reactor. El método de preparación de la cápsula como se describe en el presente documento reúne los reactivos, que se suministran en subflujos de la segunda fase separados, y se ponen en contacto sustancialmente al mismo tiempo que las segundas fases entran en contacto con la primera fase. Se forma una cubierta de material en la interfase de las regiones discretas que se forman, y está cubierta contiene los reactivos que pueden reaccionar. La localización de reactivos dentro de una región discreta permite controlar los tiempos de reacción.

- 20 Cuando la cápsula se usa como un microrreactor, se entiende que la composición del espacio interior de la cubierta cambiará con el tiempo a medida que los reactivos reaccionen para formar un producto, junto con los subproductos asociados, si los hay. Como será evidente, la cantidad de reactivo disminuirá a medida que avance la reacción.

Encapsulantes adicionales y alternativos

- 25 Además de, o como alternativas a, los encapsulantes mencionados anteriormente, el encapsulante puede seleccionarse de uno o más de los encapsulantes discutidos a continuación. En una realización, las preferencias de peso molecular dadas anteriormente se aplican a estos encapsulantes.

- 30 En una realización, el encapsulante se selecciona del grupo que consiste en moléculas tóxicas (como agentes nerviosos y metales pesados), hormonas, herbicidas, pesticidas, anticuerpos, patógenos (como virus), adyuvantes, geles, nanopartículas (que incluyen partículas metálicas o no metálicas), polímeros (incluidos los polímeros sintéticos y naturales), catalizadores (orgánicos, inorgánicos y organometálicos), adhesivos y selladores.

Un patógeno es un agente que es capaz de causar enfermedad en un huésped. El patógeno puede ser un virus, una bacteria, un hongo o un prión.

En una realización, el encapsulante es un virus.

- 35 El virus puede ser virus seleccionado de una familia seleccionada del grupo que consiste en Adenoviridae (por ejemplo, adenovirus), herpesviridae (por ejemplo, Herpes simplex, tipo 1 y tipo 2 y Epstein-barr), papillomaviridae (por ejemplo, virus del papiloma humano), hepadnaviridae (por ejemplo, hepatitis B), flaviviridae (por ejemplo, hepatitis C, fiebre amarilla, dengue, Nilo occidental), retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia (VIH)), orthomyxoviridae (por ejemplo, influenza), paramyxoviridae (por ejemplo, sarampión, paperas), rabdoviridae (por ejemplo, rabia) y reoviridae (por ejemplo, rotavirus).

- 40 En una realización, el encapsulante es un microorganismo.

Como se señaló anteriormente, en una realización, el encapsulante es una célula. La célula puede ser una célula procariota o eucariota.

- 45 La célula puede ser una célula de mamífero, tal como una célula humana, una célula de roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón) una célula lagomorfa (por ejemplo, un conejo), una célula aviar (por ejemplo, un pájaro), una célula canina (por ejemplo, un perro), una célula felina (por ejemplo, un gato), una célula equina (por ejemplo, un caballo), una célula porcina (por ejemplo, un cerdo), una célula ovina (por ejemplo, una oveja), una célula bovina (por ejemplo, una vaca), una célula de simio (por ejemplo, un mono o simio), una célula de mono (por ejemplo,

tití, babuino), una célula de simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón) o una célula de ornithorhynchidae (por ejemplo, ornitorrinco).

La célula puede ser una célula tumoral, que puede ser una célula tumoral benigna o maligna.

5 Ejemplos de células eucariotas incluyen células epiteliales, endoteriales, neurales, esqueléticas y fibroblásticas, entre otras.

En una realización, el encapsulante es una bacteria, tal como una bacteria gram positiva y una bacteria gram negativa.

Ejemplos de bacterias gram positivas incluyen *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* (como *S. aureus*), *Streptococcus* (como *S. pneumoniae*), *Enterococcus* (como *E. faecium*), *Bacillus*, *Clostridium* (como *C. diff.*) y *Listeria*.

10 Ejemplos de bacterias gram negativas incluyen *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Escherichia* (como *E. coli*), *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Helicobacter* (como *Helicobacter pylori*) y *Salmonella*.

En una realización, el encapsulante es un anticuerpo.

15 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Un antígeno objetivo generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de un objetivo de interés o parte del mismo, tales objetivos incluyen, pero no limitándose a, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie, incluido el origen humano, murino o de conejo.

20 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión al antígeno o la región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante complementaria) y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

35 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma, o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago.

40 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que la unidad estructural de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

50 En una realización, el anticuerpo es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

- El anticuerpo puede marcarse adecuadamente para detección y análisis, ya sea mientras se mantiene en la cápsula, o para uso posterior, cuando se libera el anticuerpo.
- 5 En una realización, el encapsulante es una hormona. La hormona puede ser una hormona peptídica, como la insulina o la hormona de crecimiento, o una hormona lipídica, como la hormona esteroide, por ejemplo, la prostaglandina y el estrógeno.
- En una realización, el encapsulante es un polipéptido. En una realización, el polipéptido es una proteína. En una realización, la proteína tiene actividad catalítica, por ejemplo, actividad de ligasa, isomerasa, liasa, hidrolasa, transferasa u oxidoreductasa.
- 10 En una realización, el encapsulante es un polímero. En algunas realizaciones, la cubierta de la cápsula de la presente invención incluye un bloque de construcción que es un polímero funcionalizado. Donde tal bloque de construcción está presente, un polímero que es un encapsulante difiere del bloque de construcción. En una realización, el polímero encapsulante no es adecuado para formar un enlace no covalente con un cucurbiturilo.
- En una realización, el encapsulante es una partícula metálica.
- En una realización, la nanopartícula es o comprende un metal noble.
- 15 En una realización, la nanopartícula es o comprende un metal de transición.
- En algunas realizaciones, la cubierta de la cápsula de la presente invención incluye un bloque de construcción que es una partícula funcionalizada. Donde tal bloque de construcción está presente, una partícula que es un encapsulante difiere del bloque de construcción. En una realización, la partícula encapsulante no es adecuada para formar un enlace no covalente con un cucurbiturilo.
- 20 En una realización, la nanopartícula es una nanopartícula de oro (AuNP) o una nanopartícula de plata (AgNP), o una nanopartícula que comprende plata y oro.
- Generalmente, la partícula es sustancialmente esférica. Sin embargo, pueden usarse partículas que tengan otras formas, si es apropiado o deseable.
- 25 En una realización, la nanopartícula tiene un diámetro de como máximo 500 nm, como máximo 200 nm, como máximo 150 nm, como máximo 100 nm, como máximo 80 nm o como máximo 70 nm.
- En una realización, la nanopartícula tiene un diámetro de al menos 1 nm, al menos 2 nm, al menos 5 nm, al menos 10 nm, al menos 15 nm, al menos 20 nm, al menos 30 nm o a al menos 40 nm.
- 30 En una realización, el diámetro de la partícula está en un intervalo en donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, el diámetro está en el rango de 1 a 100 nm, o por ejemplo en el rango de 10 a 100 nm. Por ejemplo, el diámetro está en el rango de 2 a 500 nm.
- En una realización, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm.
- El promedio se refiere al promedio numérico. El diámetro de una partícula puede medirse utilizando técnicas microscópicas, que incluyen TEM.
- 35 Las partículas utilizadas en la presente invención son monodispersas de forma sostenible o tienen una dispersión muy baja. En una realización, las partículas tienen una desviación estándar relativa (RSD) de como máximo 0.5%, como máximo 1%, como máximo 1.5%, como máximo 2%, como máximo 4%, como máximo 5%, como máximo 7%, como máximo 10%, como máximo 15%, como máximo 20% o como máximo 25%.
- En una realización, la partícula tiene un diámetro hidrodinámico de al menos 5 nm, al menos 10 nm, al menos 15 nm, al menos 20 nm, al menos 30 nm, al menos 40 nm.
- 40 En una realización, la partícula tiene un diámetro hidrodinámico de como máximo 500 nm, como máximo 200 nm, como máximo 150 nm, como máximo 100 nm, como máximo 80 nm o como máximo 70 nm.
- El diámetro hidrodinámico puede referirse al número promedio o al volumen promedio. El diámetro hidrodinámico puede determinarse a partir de mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) de una muestra de partículas.
- 45 El tamaño de la partícula y la composición de la partícula pueden seleccionarse para proporcionar el efecto mejorado de superficie más apropiado o beneficioso.

Las partículas de oro y plata pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica. Ejemplos de preparaciones incluyen los descritos por Coulston (Coulston et al. Chem. Commun. 2011, 47, 164) y Martin (Martin et al. Langmuir 2010, 26, 7410) y Frens (Frens Nature Phys. Sci. 1973, 241, 20), que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

- 5 En una realización, el encapsulante es un polímero. En una realización, el polímero no es un polímero que está presente como bloque de construcción en la cubierta de la cápsula. De lo contrario, el polímero no está particularmente limitado.

Otros encapsulantes adicionales y alternativos

- 10 Además de, o como alternativas a, los encapsulantes mencionados anteriormente y los encapsulantes adicionales y alternativos mencionados anteriormente, el encapsulante puede seleccionarse de uno o más de los encapsulantes adicionales discutidos a continuación. En una realización, las preferencias de peso molecular dadas anteriormente se aplican a estos encapsulantes.

En una realización, el encapsulante es un compuesto de fragancia o una composición de fragancia. Un compuesto o composición de fragancia tiene propiedades odorantes adecuadas para usar en un perfume.

- 15 En una realización, el encapsulante es un compuesto aromatizante o una composición aromatizante. Un aromatizante puede ser o incluir un potenciador del sabor, como un edulcorante.

En una realización, el encapsulante es un aceite, tal como un aceite esencial. Ejemplos de aceites esenciales incluyen los obtenidos u obtenibles de naranja dulce, menta, limón y clavo, entre otros.

- 20 En una realización, el encapsulante es en sí mismo un vehículo para contener un encapsulante dentro. Por ejemplo, el encapsulante puede ser un liposoma, micela o vesícula. El liposoma, la micela o la vesícula pueden contener un encapsulante, como uno de los encapsulantes descritos en este documento. Los liposomas, micelas o vesículas cargados adecuadamente pueden prepararse usando técnicas estándar conocidas en la técnica. El liposoma, la micela o la vesícula cargados se pueden encapsular en las cápsulas supramoleculares de la invención usando los métodos descritos en este documento.

- 25 Métodos para la preparación de cápsulas.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para la preparación de una cápsula que tiene una cubierta, tal como la cápsula del primer aspecto de la invención, comprendiendo el método los pasos de:

- 30 (i) poner en contacto un flujo de una primera fase y un flujo de una segunda fase en un canal, para generar en el canal una dispersión de regiones discretas, preferiblemente gotitas, de la segunda fase en la primera fase, en donde la segunda fase comprende cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción que tienen una funcionalidad adecuada de huésped cucurbiturilo adecuada para formar una red entrecruzada supramolecular, para formar así una cubierta de cápsula dentro de la región discreta, en donde las fases primera y segunda son inmiscibles.

- 35 En una realización, la segunda fase comprende (a) un cucurbiturilo y (1) o (2); o (b) una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente y (1), (2) o (3), para formar así una cubierta de cápsula dentro de la región discreta, en donde la primera y la segunda fase son inmiscibles.

En una realización, la segunda fase comprende un cucurbiturilo y (1) o (2).

En una realización, la segunda fase comprende un cucurbiturilo y (1).

En el método de la invención, se crea una dispersión de la segunda fase dentro de la primera fase continua. En una realización, una de la primera y segunda fases es una fase acuosa y la otra fase es una fase inmiscible con agua.

- 40 En una realización, la segunda fase es una fase acuosa. La primera fase es una fase inmiscible con agua, por ejemplo, una fase oleosa.

En una realización, la primera fase es una fase acuosa. La segunda fase es una fase inmiscible con agua, por ejemplo, una fase oleosa.

- 45 En una realización, el método comprende además la etapa de (ii) recoger el flujo de salida del canal, para obtener así una gota, dentro de la cual hay una cápsula.

En una realización, el método comprende el paso (ii) anterior y (iii) opcionalmente secar la cápsula obtenida en el paso (ii). La etapa de secado se refiere a la desolvatación de la gota y la cápsula. Cuando la segunda fase es una fase acuosa, la etapa de secado es una deshidratación.

5 En una realización, el flujo de la segunda fase (dispersa) es un flujo generado por la combinación de una pluralidad de subflujos, donde cada subflujo comprende un reactivo para su uso en la preparación de la cubierta. Por lo tanto, un subflujo puede comprender un cucurbiturilo (como en el caso (a)) o una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente (como en el caso (b)). Subflujos adicionales pueden comprender un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción (como con la composición (1)). Los bloques de construcción primero y segundo pueden estar contenidos dentro de los mismos o subflujos diferentes.

10 En una realización, el cucurbiturilo y el bloque de construcción (o bloques) se proporcionan en subflujos separados.

En una realización, se proporciona un subflujo para cada reactivo para su uso en la preparación de la cubierta. En esta realización, es posible alterar independientemente la rata de flujo de cada subflujo, alterando independientemente la concentración final de un reactivo particular en la región discreta formada. La capacidad de alterar independientemente la rata de flujo y, por lo tanto, la concentración de reactivo permite el control sobre la estructura de la cubierta formada. Por lo tanto, el tamaño de poro y el grosor de la cubierta pueden controlarse mediante cambios apropiados en las ratas de subflujo.

15

Los subflujos pueden ponerse en contacto antes del contacto con el flujo de la primera fase. En esta disposición, múltiples subflujos pueden ponerse en contacto al mismo tiempo, o pueden ponerse en contacto en una secuencia. Alternativamente, los subflujos pueden ponerse en contacto sustancialmente al mismo tiempo que las segundas fases se ponen en contacto con el flujo de la primera fase.

20

Para minimizar la formación de una agregación no estructurada, que incluye, por ejemplo, un hidrogel, dentro de la segunda fase, el cucurbiturilo o la pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente se ponen en contacto con los bloques de construcción inmediatamente antes o sustancialmente al mismo tiempo a medida que las segundas fases se ponen en contacto con el flujo de la primera fase.

25 En una realización, el flujo de la segunda fase se pone en contacto con el flujo de la primera fase sustancialmente perpendicular a la primera fase. En esta realización, la estructura del canal puede ser una geometría de unión en T. La ruta del canal puede seguir la ruta del flujo de la primera fase, en cuyo caso el segundo flujo será sustancialmente perpendicular al flujo combinado resultante en el canal. Alternativamente, la ruta del canal puede seguir la ruta del flujo de la segunda fase, en cuyo caso el flujo de la primera fase será sustancialmente perpendicular al flujo combinado resultante en el canal.

30

Los métodos que utilizan una geometría de unión en T proporcionan regiones discretas, típicamente gotitas, de la fase acuosa en la fase de aceite como resultado de fuerzas de corte inducidas dentro del sistema de dos fases.

En una realización, se proporciona un flujo adicional de la primera fase. Los flujos de la primera fase se ponen en contacto con cada lado del flujo de la segunda fase en un canal, y el flujo de fases se pasa a través de una región del canal de sección transversal reducida (un orificio) para generar una región discreta, preferiblemente una gota, de la segunda fase en el canal. Dichos métodos, que tienen un flujo interno de segunda fase y dos flujos externos de primera fase, se denominan configuraciones de enfoque de flujo.

35

Los métodos que usan técnicas de enfoque de flujo proporcionan regiones discretas, típicamente gotas, de la segunda fase en la primera fase como resultado de la primera fase externa que aplica presión y tensiones viscosas a la segunda fase interna, generando así un flujo estrecho de esa fase. Este flujo reducido luego se separa en regiones discretas, típicamente gotitas, en el orificio o poco después de que el flujo combinado haya pasado a través del orificio.

40

En una realización, la región discreta es una gotita.

En una realización, la región discreta es un anillo.

Después de que se forma la región discreta en el canal, la región discreta se puede pasar a lo largo del canal a un área de recolección. El tiempo de residencia de la región discreta en el canal no está particularmente limitado. En una realización, el tiempo de residencia es suficiente para permitir que se forme la cubierta.

45

A medida que la región discreta pasa a lo largo del canal, puede someterse a una etapa de mezcla en donde los componentes de la región discreta se distribuyen más uniformemente alrededor de esa región discreta. En una realización, el canal comprende una región de devanado. La región de devanado puede tomar la forma de un camino sustancialmente sigmoide a través del cual se pasa la región discreta.

50

- En una realización, la segunda fase comprende además un componente para la encapsulación, y la etapa (i) proporciona una cápsula que encapsula el componente.
- La primera fase y la segunda fase pueden ponerse en contacto en una unión en T simple. La segunda fase puede formarse a partir de la combinación de flujos separados de cucurbiturilo y (1), (2) o (3) según corresponda. Cuando hay más de dos componentes, estos componentes pueden ponerse en contacto de forma simultánea o secuencial.
- Estos flujos pueden contactarse antes del contacto con la primera fase. Alternativamente, pueden ponerse en contacto simultáneamente en contacto con la primera fase.
- Se generan regiones discretas de la segunda fase en el canal a medida que la primera fase inmisible corta la segunda fase. La frecuencia de cizallamiento depende de la relación de rata de flujo de las dos fases.
- En una realización, la rata de flujo se selecciona para proporcionar un número establecido de gotas por unidad de tiempo (gotas por segundo).
- Las gotas pueden prepararse a una rata de como máximo 10.000, como máximo, 5.000, como máximo 1.000 o como máximo 500 Hz.
- Las gotas pueden prepararse a una rata de al menos 1, al menos 10, al menos 50, al menos 100, o al menos 200 Hz.
- En una realización, las gotas pueden prepararse a una rata que está en un intervalo en donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la tasa está en el rango de 100 a 500 Hz.
- En una realización, el método comprende la etapa de (iii) secar la cápsula. La etapa de secado elimina al menos parcialmente el disolvente (que puede ser agua o disolvente orgánico) de la cápsula y puede denominarse desolvatación.
- No hay limitaciones particulares puestas en el método para secar las cápsulas. En una realización, las cápsulas obtenidas pueden simplemente dejarse en reposo en condiciones ambientales, y el disolvente puede evaporarse.
- En una realización, el método comprende los pasos (ii) y (iii) y opcionalmente el paso (iv), paso que es un paso de lavado, mediante el cual las cápsulas obtenidas se lavan con un disolvente. El propósito de la etapa de lavado puede ser eliminar el tensioactivo (cuando se usa) o cualquier otro componente usado en la etapa de formación de la cubierta. El paso (iv) puede realizarse como un paso intermedio entre los pasos (ii) y (iii).
- En una realización, el método comprende la etapa de (iii) secar la cápsula y (v) posteriormente resolvatar la cápsula. El paso de resolución puede realizarse minutos, horas, días, semanas o meses después de completar el paso (iii).
- En una realización, una referencia al tamaño de una gota también es una referencia directa al tamaño de una cápsula. La gotita es una gotita formada en un canal de un dispositivo para fluidos o una gotita que se recoge del canal de dicho dispositivo. El tamaño se refiere a una gota que no ha sido sometida a una etapa de desolvatación.
- Las cápsulas pueden desolvatarse para almacenamiento y posteriormente resolvatarse para su uso. En la etapa de resolución, la cápsula se pone en contacto con el disolvente para resolvatar la cápsula.
- Una cápsula formada directamente después de la preparación es sustancialmente esférica. La desolvatación de la cápsula puede provocar el colapso de la cápsula a medida que el borde esférico se distorsiona. El material de la cubierta parece doblarse de manera aleatoria.
- En el método de preparación descrito en este documento, se forma una gota y la cubierta de una cápsula se forma en la interfase de la gota. La gota formada puede someterse a una etapa de desolvatación, dando como resultado la contracción de la cubierta de la cápsula. En una realización, el tamaño de la cápsula se refiere al tamaño de una cápsula que ha sido sometida a una etapa de deshidratación.
- La cubierta de la cápsula puede tener poros. Dichos poros pueden tener un tamaño adecuado para permitir que una molécula encapsulada pase a través de la cubierta para ser liberada de la cápsula.
- La rata de flujo de la primera fase y/o la segunda fase puede variarse para permitir la preparación de gotas, y por lo tanto cápsulas, de un tamaño deseado. A medida que aumenta la rata de flujo de la primera fase con respecto a la segunda fase, el tamaño promedio de la gota disminuye, y el tamaño de la cápsula formada también disminuye.
- Típicamente, la rata de flujo de la primera fase es al menos 1,5, 2, 3, 4, 5 o 10 veces mayor que el de la segunda fase.
- En una realización, las ratas de flujo de la primera y la segunda fases se seleccionan para proporcionar gotas que tengan un diámetro medio deseado.

El tamaño medio de partícula puede determinarse a partir de mediciones de una muestra de gotitas recogidas del canal de flujo usando técnicas de microscopía simples.

En una realización, cada gotita es una microgotita.

En una realización, cada gotita es una nanogotita.

5 En una realización, el tamaño medio de la gota es de al menos 1, 5, 10, 20, 30 o 40 μm de diámetro.

En una realización, el tamaño medio de la gota como máximo 400, 200, 100, 75 o 50 μm de diámetro.

En una realización, el tamaño medio de la gotita está en un intervalo en donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, el tamaño promedio está en el rango de 1 a 100 μm .

10 La gotita formada a partir de la preparación fluida tiene una distribución de tamaño estrecha. Esto puede medirse empíricamente mediante la observación del empaque de las gotas recolectadas. Una disposición de empaque cerrado hexagonal de las gotitas recolectadas es indicativa de un bajo valor de monodispersidad (véase, por ejemplo, L.J. De Cock et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6954).

En una realización, las gotitas tienen una desviación estándar relativa (RSD) de como máximo 1.5%, como máximo 2%, como máximo 4%, como máximo 5%, como máximo 7% o como máximo 10%.

15 La concentración de uno o más de los componentes en la segunda fase puede alterarse. Los cambios en la concentración pueden alterar las propiedades físicas y químicas del material de la cubierta que se forma posteriormente.

20 En una realización, la concentración de cucurbiturilo puede alterarse para alterar el grado de unión y/o entrecruzamiento en la red formada. Un aumento en la unión o entrecruzamiento se asocia con una disminución en el tamaño de poro en el material.

En una realización, la concentración de cucurbiturilo y el bloque de construcción presente en la segunda fase puede alterarse para alterar el grosor de la cubierta.

En una realización, la concentración de cucurbiturilo en la segunda fase es al menos 0.05, al menos 0.1, al menos 0.2, al menos 0.3, al menos 0.5, al menos 1.0, al menos 5.0 o al menos 10 μM .

25 En una realización, la concentración del cucurbiturilo en la segunda fase es como máximo 500, como máximo 200, como máximo 100, como máximo 75, como máximo 50 μM .

En una realización, la concentración del cucurbiturilo en la segunda fase está en un intervalo en donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la concentración del cucurbiturilo en la segunda fase está en el rango de 0.1 a 100 μM .

30 En una realización, la concentración de un bloque de construcción en la segunda fase es al menos 0.05, al menos 0.1, al menos 0.2, al menos 0.3, al menos 0.5, al menos 1.0, al menos 5.0 o al menos 10 μM .

En una realización, la concentración de un bloque de construcción en la segunda fase es como máximo 500, como máximo 200, como máximo 100, como máximo 75, como máximo 50 μM .

35 En una realización, la concentración de un bloque de construcción en la segunda fase está en un rango donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la concentración de un bloque de construcción en la segunda fase está en el rango de 0.1 a 100 μM .

La referencia a un bloque de construcción puede referirse a un primer bloque de construcción o un segundo bloque de construcción como se describe aquí.

40 En una realización, la relación de concentración de cucurbiturilo a concentración de bloque de construcción en la segunda fase se selecciona del grupo que consiste en: 1:1, 1:2, 2:3, 1:3, 15:85, 7.5:92.5 y 5:95. Cuando hay dos o más bloques de construcción, la concentración de bloques de construcción puede referirse a la concentración combinada de todos los bloques de construcción presentes.

En una realización, la concentración del cucurbiturilo y el bloque de construcción se refiere a la concentración en la segunda fase después de que se hayan reunido todos los subflujos, cuando están presentes.

45 Alternativamente, la concentración del cucurbiturilo y el bloque de construcción se refiere a la concentración dentro de un subflujo, antes de unir los subflujos para hacer la segunda fase. En esta realización, se apreciará que la

concentración final de un reactivo particular en la segunda fase será menor que la concentración de ese reactivo en el subflujo. La concentración final de un reactivo particular en la segunda fase combinada final está determinada por la rata de flujo del subflujo en relación con la rata de flujo del uno o más subflujos con los que se combina. Por lo tanto, la relación de ratas de flujo influirá en la concentración final de un reactivo.

- 5 En una realización, la concentración de un componente en la segunda fase puede ser 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 70%, 75%, 80%, 85% 90% o 95% de la concentración de ese componente en el subflujo.

- 10 En una realización, la segunda fase se genera a partir de la combinación de tres subflujos separados. Estos flujos comprenden cada uno independientemente un cucurbiturilo, un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción. Cuando las ratas de flujo sean iguales, se apreciará que la concentración de cada uno de los cucurbiturilos, el primer bloque de construcción y el segundo bloque de construcción en la fase acuosa combinada será un tercio de la concentración de cada uno de los reactivos dentro de los respectivos subflujos.

- 15 En una realización, la relación de ratas de flujo para los subflujos de cucurbiturilo, primer bloque de construcción y segundo bloque de construcción se selecciona del grupo que consiste en: 1:1:1, 2:2:1, 1:1:2, 15:15:70, 7.5:7.5: 85 y 5:5:90.

En esta realización, el primer bloque de construcción puede comprender una molécula polimérica y el segundo bloque de construcción puede comprender una partícula.

En una realización, los métodos de la invención se realizan a temperatura ambiente.

En una realización, los métodos de la invención se realizan a aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o más de 25°C.

- 20 Aparato

Los métodos de la presente invención requieren un flujo de una segunda fase y un flujo de una primera fase, que es inmisible con la segunda fase, para unirse en un canal, generando así una dispersión de la segunda fase en la primera fase. Los métodos para la generación de un flujo de una primera fase y una segunda fase son bien conocidos en la técnica.

- 25 En una realización, cada flujo (ya sea un flujo o un subflujo) puede generarse a partir de una jeringa bajo el control de una bomba de jeringa programable. Cada jeringa se carga con una solución acuosa apropiada o fase inmisible con agua.

En el método de la invención, las gotas pueden recogerse solo cuando los flujos están a la rata de flujo requerido. El canal en donde se ponen en contacto los flujos de la segunda fase y la primera fase no está particularmente limitado.

- 30 En una realización, el canal es un canal para microfluidos.

En una realización, el canal tiene una sección transversal más grande de como máximo 1.000, como máximo 500, como máximo 200, como máximo 100 o como máximo 50 μm .

En una realización, el canal tiene una sección transversal más grande de al menos 0.1, al menos 1, al menos 10 o al menos 20 μm .

- 35 El canal puede proporcionarse en un sustrato apropiado. El sustrato es uno que no reaccionará con los componentes de la composición complejable.

El sustrato puede ser un sustrato basado en PDMS.

- 40 La preparación de sustratos para su uso en técnicas de flujo de fluido es bien conocida por los expertos en la materia. Ejemplos en la técnica incluyen la preparación descrita por Yang et al. (Yang et al. Lab Chip 2009, 9, 961), que se incorpora aquí.

Segunda fase

La segunda fase es inmisible con la primera fase. La segunda fase puede denominarse una fase dispersa, particularmente una vez que ha contactado con la primera fase y se separa en regiones discretas, tales como gotas.

- 45 En una realización, una de la primera o segunda fase es una fase acuosa. Por lo tanto, la otra de la primera o segunda fase es inmisible con agua.

Sin embargo, no es esencial que una de las fases sea una fase acuosa, y aquellos familiarizados con las técnicas de fluidos reconocerán que pueden usarse otras combinaciones de fases inmiscibles. Por ejemplo, se ha descrito el uso de una fase orgánica de cloroformo junto con una fase de alcohol polivinílico (véase Yang et al. Lab Chip 2009, 9, 961).

- 5 Típicamente, la segunda fase es una fase que es adecuada para contener, por ejemplo, disolviendo, uno o más del cucurbiturilo y los bloques de construcción, y el encapsulante, donde esté presente.

En una realización, la segunda fase se elige por su capacidad para disolver el cucurbiturilo.

- 10 Los compuestos de cucurbiturilo difieren en su solubilidad en agua. Los métodos de preparación pueden adaptarse para tener en cuenta esta solubilidad. Como se describe en este documento, los métodos de la invención requieren el uso de una segunda fase que comprende el cucurbiturilo. La segunda fase puede seleccionarse como una fase que sea adecuada para disolver el cucurbiturilo. Cuando el compuesto de cucurbiturilo es soluble en agua, la segunda fase puede ser una fase acuosa. Cuando el compuesto de cucurbiturilo tiene baja o nula solubilidad en agua, la segunda fase puede ser una fase inmiscible con agua, como una fase oleosa o una fase orgánica.

- 15 En una realización, la rata de flujo de la segunda fase es como máximo 1.000, como máximo 500, como máximo 250, o como máximo 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En una realización, la rata de flujo de la segunda fase es al menos 0.05, al menos 0.1, al menos 0.5, al menos 1, al menos 5, al menos 10 o al menos 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

- 20 En una realización, la rata de flujo de la segunda fase está en un rango donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la rata de flujo de la segunda fase en el rango de 0.1 a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La rata de flujo de la segunda fase se refiere a la rata de flujo de esa fase antes de que la fase entre en contacto con la primera fase.

- 25 Cuando el segundo flujo es una combinación de dos o más subflujos que se ponen en contacto, la rata de flujo de la segunda fase se refiere a la suma numérica de las ratas de flujo de cada uno de los subflujos. La rata de flujo se refiere a la rata de flujo combinada de los subflujos cuando se ponen en contacto, que puede ser antes, o sustancialmente al mismo tiempo que, los flujos entran en contacto con la primera fase.

Primera fase

La primera fase comprende un componente que es inmiscible con la segunda fase. La primera fase puede denominarse una fase continua o portadora.

- 30 En una realización, la rata de flujo de la primera fase es como máximo 1.000, como máximo 500, o como máximo 250 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En una realización, la rata de flujo de la primera fase es al menos 10, al menos 50, o al menos 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En una realización, la rata de flujo de la primera fase está en un rango donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la rata de flujo de la primera fase en el rango de 100 a 250 $\mu\text{L}/\text{min}$.

- 35 La rata de flujo de la primera fase se refiere a la rata de flujo de esa fase antes de que la fase entre en contacto con la segunda fase.

Cuando se utiliza una técnica de enfoque de flujo para desarrollar regiones discretas de una segunda fase, las ratas de flujo de las dos primeras fases pueden ser los mismos.

- 40 La primera fase puede comprender adicionalmente un tensioactivo. El tensioactivo se proporciona en la primera fase para estabilizar la macroemulsión que se forma en los métodos de preparación fluida. El paso de formar la región discreta (como una gota) puede requerir la presencia de un tensioactivo. Además, la presencia de un tensioactivo es útil para limitar o prevenir la coalescencia de las gotas recogidas.

El tensioactivo elegido no está particularmente limitado, y abarca cualquier tensioactivo que sea capaz de promover y/o estabilizar la formación de regiones discretas, tales como gotas, de la segunda fase en la primera fase.

- 45 Los tensioactivos adecuados para usar en la presente invención incluyen los descritos por Holtze et al. Lab Chip 2008, 8, 1632. Típicamente, tales tensioactivos comprenden un poliéter perfluorado oligomérico (PFPE) unido a un

polietilenglicol. Tales tensioactivos son especialmente útiles para estabilizar emulsiones de agua en aceite de fluorocarbono.

El tensioactivo está presente como máximo 0.1%, como máximo 0.2%, como máximo 0.5%, como máximo 0.75%, como máximo 1%, como máximo 2%, como máximo 5% p/p en la fase total.

- 5 El tensioactivo está presente al menos 0.05% o al menos 0.07% p/p en la fase total.

Cuando la primera fase es una fase acuosa, el tensioactivo puede ser alcohol polivinílico.

En una realización, la primera fase tiene una solubilidad en la segunda fase de como máximo 50, como máximo 20, como máximo 10 o como máximo 5 ppm en peso.

- 10 En una realización, la segunda fase tiene una solubilidad en la primera fase de como máximo 50, como máximo 20, como máximo 10 o como máximo 5 ppm en peso.

Fase acuosa

La presente invención requiere el uso de una fase acuosa ya sea como la fase continua o dispersa en los métodos de la invención. Los métodos para la preparación de soluciones acuosas adecuadas que comprenden los componentes apropiados serán evidentes para los expertos en la materia.

- 15 Fase inmisible con agua

La presente invención requiere el uso de una fase que es inmisible con agua. Esa fase puede ser una fase a base de aceite (fase oleosa) o una fase a base de solvente orgánico (fase orgánica), o una combinación de las dos.

En una realización, la fase inmisible con agua es una fase líquida.

- 20 En otra realización, la fase inmisible con agua es una fase gaseosa. Típicamente, esta realización es apropiada cuando la fase inmisible con agua es la primera fase.

La fase de aceite tiene como componente principal un aceite. El aceite es un líquido a temperatura ambiente.

El aceite es inerte. Es decir, no reacciona con el cucurbiturilo para formar un complejo o cualquier otro producto. El aceite no reacciona con ningún bloque de construcción presente. El aceite no reacciona con la cubierta.

En una realización, el aceite es un aceite basado en hidrocarburos.

- 25 En una realización, el aceite es un aceite mineral.

En una realización, el aceite es un aceite de hidrocarburo fluorado.

En una realización, el aceite es un aceite perfluorado. Un ejemplo de un perfluorado para uso en la invención es FC-40 (Fluorinert disponible desde 3M).

En una realización, el aceite es un aceite de silicona.

- 30 En una realización, la fase inmisible con agua tiene como componente principal un disolvente orgánico. Por ejemplo, el disolvente orgánico se selecciona de cloroformo y octano.

Cápsula con encapsulante

Los métodos de la invención son adecuados para la incorporación de un material en una cápsula. La cápsula producida, por lo tanto, comprende un material encapsulado (un encapsulante).

- 35 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la preparación de una cápsula que tiene una cubierta, en donde la cápsula encapsula un componente, el método comprende los pasos de:

- 40 (i) contactar un flujo de una primera fase y un flujo de una segunda fase en un canal, para generar así una región discreta, preferiblemente una gotita, de la segunda fase en el canal, en donde la segunda fase comprende (a) un cucurbiturilo, un componente y (1) o (2); o (b) una pluralidad de cucurbiturilos unidos covalentemente, un componente y (1), (2) o (3), para formar una cubierta de cápsula dentro de la región discreta, en donde la cápsula encapsula el componente y la primera y segunda fases son inmiscibles.

El método de la invención es particularmente atractivo ya que permite que todos los componentes presentes en el flujo de la segunda fase se encapsulen dentro de la cubierta de la cápsula. La formación de la cubierta de la cápsula ocurre

en el límite de la gota en la interfase con la primera fase. Todo el componente, por lo tanto, está encapsulado dentro de la cubierta formada. Por lo tanto, el presente método proporciona un método eficiente para la incorporación del componente en una cápsula.

5 En una realización, el componente que se va a encapsular se proporciona en un subflujo. Este subflujo se pone en contacto con uno o más subflujos que comprenden los reactivos para la preparación de la cubierta, por ejemplo, cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción. El subflujo que comprende el componente que se va a encapsular puede ponerse en contacto con otro subflujo antes del contacto con el flujo de la primera fase. Alternativamente, el subflujo que comprende el componente que se va a encapsular puede ponerse en contacto con otro subflujo sustancialmente al mismo tiempo que las primeras fases se ponen en contacto con el flujo de la segunda fase.

10 Proporcionar un subflujo para el componente que se va a encapsular que está separado de un subflujo que comprende un material para la cubierta de la cápsula permite que se controle la concentración del componente en la región discreta formada (tal como una gotita), y la cantidad final de encapsulante presente dentro de la cubierta que se controlará igualmente.

15 En una realización, el método es un método para la preparación de una cápsula que encapsula una pluralidad de componentes. En esta realización, la fase acuosa comprende al menos un primer componente que se va a encapsular y un segundo componente que se va a encapsular. La pluralidad de componentes puede proporcionarse en subflujos separados que se ponen en contacto antes del contacto con la primera fase o sustancialmente al mismo tiempo que las segundas fases se ponen en contacto con el flujo de la primera fase.

20 En una realización, la concentración de un componente que se va a encapsular en la segunda fase es al menos 0.01, al menos 0.02, al menos 0.05, al menos 0.1, al menos 0.2, al menos 0.3, al menos 0.5, al menos 1.0, o al menos 5.0 μM .

En una realización, la concentración de un componente que se va a encapsular en la segunda fase es como máximo 500, como máximo 200, como máximo 100, como máximo 75, como máximo 50, o como máximo 10 μM .

25 En una realización, la concentración de un componente que se va a encapsular en la segunda fase está en un intervalo en donde las ratas mínima y máxima se seleccionan de las realizaciones anteriores. Por ejemplo, la concentración de un componente que se va a encapsular en la segunda fase está en el rango de 0.02 a 50 μM .

En una realización, la concentración del componente que se va a encapsular se refiere a la concentración en la segunda fase después de que se hayan reunido todos los subflujos, donde estén presentes.

30 Alternativamente, cuando el flujo acuoso es una combinación de dos o más subflujos que se ponen en contacto, la concentración del componente que se va a encapsular se refiere a la concentración dentro de un subflujo, antes de unir el subflujos para hacer la segunda fase. En esta realización, se apreciará que la concentración final del encapsulante en la segunda fase será menor que la concentración de ese reactivo en el subflujo. La concentración final del encapsulante en la segunda fase combinada final está determinada por la rata de flujo del subflujo en relación con la rata de flujo del uno o más subflujos con los que se combina. Por lo tanto, la relación de ratas de flujo influirá en la concentración final de un reactivo.

35 En una realización, la concentración de un componente en la fase acuosa puede ser 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la concentración de ese componente en el subflujo.

40 Cuando se proporciona un subflujo de encapsulante adicional junto con los subflujos de cada uno de los cucurbiturilos y uno o más flujos de bloques de construcción, las ratas de flujo para cada uno de los cucurbiturilos y uno o más bloques de construcción pueden alterarse para tener en cuenta el efecto de dilución de proporcionar un subflujo adicional para el encapsulante.

45 La presente invención proporciona una cápsula que se obtiene u obtiene de cualquiera de los métodos descritos aquí. La cápsula puede comprender un componente encapsulado, que también se puede preparar usando los métodos descritos en este documento.

Análisis de cápsula

50 En las secciones anteriores, se describe el análisis del material de la cubierta, la forma de la cubierta y las dimensiones de la cubierta. Por ejemplo, la cápsula puede analizarse mediante una simple microscopía de campo claro para determinar la forma de la cubierta de la cápsula. Las imágenes obtenidas también pueden usarse para determinar la sección transversal, típicamente el diámetro, de la cubierta de la cápsula.

5 La cubierta de la cápsula también puede analizarse para determinar la forma, la sección transversal y su grosor usando microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión. Este último es particularmente útil para estudiar las composiciones de la red de cubierta. Por ejemplo, cuando la red comprende un bloque de construcción de compuesto polimérico y un bloque de construcción de nanopartículas, las nanopartículas pueden observarse como dispersas a través de un material polimérico. Esta dispersión es el resultado de la complejación e interconexión de nanopartículas y moléculas poliméricas con el cucurbiturilo.

Los presentes inventores han incorporado de forma útil una etiqueta detectable en el material de la cubierta y en el encapsulante, para permitir así que cada uno sea localizado y definido. Cuando esa etiqueta es fluorescente, puede detectarse mediante microscopía fluorescente de escaneo con láser, por ejemplo.

10 Los presentes inventores también han generado cápsulas que tienen bloques de construcción que son capaces de proporcionar un efecto de resonancia mejorada en la superficie. En particular, este efecto es proporcionado por partículas, como las nanopartículas metálicas, que se utilizan como bloques de construcción.

15 La presencia de bloques de construcción dentro de la cubierta que son capaces de proporcionar un efecto de resonancia mejorada en la superficie se puede usar ventajosamente para analizar la propia cubierta o el material encapsulado dentro. Se puede elegir un bloque de construcción para proporcionar la mayor mejora adecuada y útil. Por ejemplo, un bloque de construcción de nanopartículas más grande, por ejemplo, una nanopartícula de 5 nm de diámetro, puede proporcionar una mejora mayor que la de una nanopartícula de 2 nm de diámetro.

En una realización, la espectroscopía de superficie mejorada es la espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS).

20 En una realización, la espectroscopía de superficie mejorada es la espectroscopía Raman coherente anti-Stokes (CARS).

En una realización, la espectroscopía de superficie mejorada es espectroscopía de fotoluminiscencia.

En una realización, la espectroscopía de superficie mejorada es espectroscopía infrarroja.

25 Los presentes inventores han demostrado que la espectroscopía de resonancia mejorada en la superficie puede usarse para confirmar la presencia de un encapsulante dentro de la cápsula. Por ejemplo, SERS puede usarse para identificar la presencia de una molécula biológica, como el dextrano, mediante la identificación de las señales características en el espectro Raman para el dextrano.

La intensidad de los picos puede usarse para cuantificar la cantidad de encapsulante presente dentro de la cápsula.

30 Las técnicas espectroscópicas de superficie mejorada son bien conocidas por aquellos en el campo, y las técnicas adecuadas se describen en detalle aquí.

Uso de cápsulas

Las cápsulas descritas en el presente documento son adecuadas para su uso como encapsulantes para material. Este material puede almacenarse dentro de la cápsula y liberarse de la cápsula según sea necesario.

En una realización, se proporciona una cápsula de la invención que comprende un componente encapsulado.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para entregar un componente a una ubicación, comprendiendo el método los pasos de:

(i) proporcionar una cápsula de la invención, que comprende un componente encapsulado;

(ii) dirigir la cápsula a una ubicación; y

(iii) permitir la liberación del componente encapsulado de la cápsula en la ubicación.

40 En una realización, la ubicación es in vivo.

En una realización, la ubicación es ex vivo.

En una realización, la liberación del componente encapsulado es en respuesta a un estímulo externo.

En una realización, el estímulo externo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto huésped competidor, un agente oxidante ligero y un agente reductor.

En una realización, la liberación del componente encapsulado es en respuesta a un cambio en las condiciones locales.

En una realización, el cambio en las condiciones locales puede ser un cambio en el pH, un cambio en la temperatura, un cambio en el nivel de oxidación, un cambio en la concentración o la aparición de una entidad química reactiva.

5 En una realización, la liberación del encapsulante se consigue interrumpiendo el complejo formado entre el cucurbiturilo y la molécula o moléculas huésped. En una realización, se proporciona un compuesto unido covalentemente a una molécula huésped competidora en el lugar de liberación. La molécula huésped competidora desplaza una molécula huésped de un bloque de construcción para interrumpir la red que forma la cubierta de la cápsula. Dicha interrupción puede hacer que aparezcan poros en la cubierta, a través de los cuales el compuesto encapsulado puede pasar y liberarse. En una realización, la molécula huésped competidora provoca una interrupción
10 extensa de la cubierta de la cápsula.

En una realización, la liberación del encapsulante se consigue interrumpiendo el complejo usando luz, por ejemplo, una luz láser incidente. En sus experimentos para determinar las propiedades espectroscópicas mejoradas en la superficie de las cápsulas de la invención (por ejemplo, aquellas partículas que contienen cápsulas), los presentes inventores han descubierto que la exposición de la cápsula a una luz láser da como resultado una pérdida de integridad de la cápsula al menos parcial. Los inventores han descubierto que el análisis SERS todavía puede realizarse en las
15 cápsulas de las invenciones. Cuando aumenta la potencia de la luz láser incidente y/o aumenta el tiempo de exposición de las cápsulas a la luz láser, se ve que las cápsulas se degradan. El efecto degradante puede estar influenciado por los componentes de la cubierta, por ejemplo, la naturaleza de los bloques de construcción. Por ejemplo, se sabe que las nanopartículas pequeñas de oro (por ejemplo, 5 nm de diámetro) absorben en lugar de dispersar la luz láser
20 incidente. Esta luz absorbida puede irradiarse como calor, lo que puede tener el efecto de interrumpir la red local de complejos.

En una realización, la cápsula encapsula dos, o más, componentes.

Cuando hay dos o más componentes, los componentes pueden liberarse después simultánea o secuencialmente.

25 En una realización, un primer componente se libera primero. Se libera un segundo componente después del primer componente.

En una realización, la cápsula de la invención es adecuada para la conexión a una superficie. Por ejemplo, la cápsula puede estar provista de una funcionalidad adecuada para formar un enlace, tal como un enlace covalente, a la superficie. Esta funcionalidad puede estar contenida dentro de un bloque de construcción que es un componente de la cubierta. Las cápsulas pueden estar dispuestas en una superficie para proporcionar una matriz.

30 Complejos supramoleculares hospedero-huésped alternativos

En este documento se describen cápsulas que tienen una cubierta que se puede obtener a partir de la complejación supramolecular de cucurbiturilo con bloques de construcción unidos covalentemente a moléculas huésped de cucurbiturilo apropiadas.

35 Como se indicó anteriormente, el huésped puede ser cucurbiturilo y el huésped puede ser una molécula huésped de cucurbiturilo. Se pueden usar otros complejos hospedero-huésped, como alternativa al complejo hospedero-huésped cucurbiturilo o además del complejo hospedero-huésped cucurbiturilo.

Se prefiere el uso de cucurbiturilo debido a las altas constantes de unión disponibles y la facilidad a través de la cual se pueden ensamblar complejos y cápsulas.

40 Los inventores creen que los métodos y técnicas descritos aquí son generalmente aplicables a otros sistemas huésped-hospedero.

Aunque no de acuerdo con la invención, un huésped alternativo puede ser capaz de formar un complejo ternario. Cuando el complejo comprende dos huéspedes dentro de una cavidad del huésped, la constante de asociación, K_a , para ese complejo es al menos 10^3 M^{-2} , al menos 10^4 M^{-2} , al menos 10^5 M^{-2} , al menos 10^6 M^{-2} , al menos 10^7 M^{-2} , al menos 10^8 M^{-2} , al menos 10^9 M^{-2} , al menos 10^{10} M^{-2} , al menos 10^{11} M^{-2} , o al menos 10^{12} M^{-2} . En esta realización, la
45 cubierta es una red que tiene una pluralidad de complejos, en donde cada complejo comprende un huésped que aloja una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped. Las moléculas huésped primera y segunda están unidas covalentemente a un primer bloque de construcción, o a un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción.

50 Un huésped alternativo puede ser capaz de formar un complejo binario. Cuando el complejo comprende un huésped dentro de una cavidad del huésped, la constante de asociación, K_a , para ese complejo es al menos 10^3 M^{-1} , de al

- menos 10^4 M^{-1} , de al menos 10^5 M^{-1} , de al menos 10^6 M^{-1} , de al menos 10^7 M^{-1} , de al menos 10^8 M^{-1} , de al menos 10^9 M^{-1} , de al menos 10^{10} M^{-1} , de al menos 10^{11} M^{-1} , o de al menos 10^{12} M^{-1} . En esta realización, la cubierta es una red que tiene una pluralidad de complejos, en donde cada complejo comprende un huésped que aloja una molécula huésped, y cada huésped está unido covalentemente a al menos otro huésped. Las moléculas huésped están unidas covalentemente a un primer bloque de construcción, o a un primer bloque de construcción y un segundo bloque de construcción.
- Aunque no de acuerdo con la invención, el huésped puede seleccionarse de ciclodextrina, calix[n]areno y éter corona, y el uno o más bloques de construcción tienen una funcionalidad huésped hospedero adecuada para la ciclodextrina, calix[n]areno, o éter corona respectivamente.
- En una realización, el huésped es ciclodextrina y el uno o más bloques de construcción tienen una funcionalidad adecuada de huésped de ciclodextrina.
- El anfitrión puede formar un complejo binario con un huésped. En tales casos, el huésped estará vinculado covalentemente a una o más moléculas huésped para permitir la formación de enlaces cruzados entre los bloques de construcción.
- En una realización, el huésped es ciclodextrina. Los compuestos de ciclodextrina están fácilmente disponibles de fuentes comerciales. También se conocen muchos compuestos huésped para usar con ciclodextrina. La ciclodextrina es un oligómero cíclico no simétrico en forma de barril de D-glucopiranososa. Típicamente, la ciclodextrina es capaz de albergar huéspedes hidrofóbicos sin carga. Por ejemplo, los huéspedes incluyen aquellas moléculas que tienen funcionalidades hidrocarbonadas y aromáticas tales como adamantano, azobenceno y derivados de estilbena. Otras moléculas huésped para la ciclodextrina incluyen biomoléculas como xilosa, triptófano, estriol, esterona y estradiol.
- En una realización, la ciclodextrina es una α -, β - o γ -ciclodextrina. En una realización, la ciclodextrina es una β - o γ -ciclodextrina. Típicamente, los huéspedes más grandes se usan junto con una γ -ciclodextrina.
- La ciclodextrina tiene una geometría toroidal, con los grupos hidroxilo secundarios de la D-glucopiranososa ubicados en la abertura más grande, y los grupos hidroxilo primarios en la abertura más pequeña. Uno o más de los grupos hidroxilo, que pueden ser los grupos hidroxilo secundarios o primarios, pueden funcionalizarse. Típicamente, los grupos hidroxilo primarios están funcionalizados. En una realización, las referencias a un compuesto de ciclodextrina son referencias a derivados del mismo. Por ejemplo, uno o dos grupos hidroxilo primarios de la ciclodextrina se funcionalizan con un subsistente que contiene alquilamina. En otro ejemplo, uno, dos o tres de los grupos hidroxilo dentro de cada unidad de D-glucopiranososa se reemplazan con un grupo alquil éter, por ejemplo, un grupo metoxi. Se puede conectar una pluralidad de ciclodextrinas unidas covalentemente a través de los grupos hidroxilo.
- En el gráfico 1 de Rekharsky et al. se exponen ejemplos de ciclodextrinas no funcionalizadas y funcionalizadas. (Chem. Rev. 1998, 98, 1875), y ejemplos de compuestos para uso como huéspedes se exponen en las Tablas 1 a 3 y la Tabla 2. Rekharsky et al. se incorpora aquí como referencia.
- En los métodos de preparación, la ciclodextrina puede estar presente en la segunda fase, por ejemplo, en una fase acuosa, como se describe aquí.
- En una realización, el huésped es calix[n]areno. Los compuestos de calix[n]arenos están fácilmente disponibles de fuentes comerciales, o pueden prepararse por condensación de fenol, resorcinol y aldehídos de pirogalol, por ejemplo, formaldehído.
- Se conocen muchos compuestos huésped para usar con calix[n]arenos. Típicamente, el calix[n]areno es capaz de albergar moléculas que contienen aminoácidos. Los compuestos a base de piperidina y los compuestos ciclohexilo funcionalizados con amino pueden usarse como huéspedes. Otros ejemplos de huéspedes incluyen atropina, criptando, azul de fenol y azul de antrol, entre otros.
- En el gráfico 1 de Danil de Namor et al. se exponen ejemplos de calix[n]arenos no funcionalizados y funcionalizados. (Chem. Rev. 1998, 98, 2495-2525), que se incorpora aquí como referencia. Ejemplos de compuestos para uso como huéspedes se exponen en las Tablas 2, 3, 5 y 10 de Danil de Namor et al.
- En una realización, el calix[n]areno es un calix[4]areno, calix[5]areno o calix[6]areno. En una realización, el calix[n]areno es un calix[4]areno.
- Calix[n]arenos adecuadamente funcionalizados pueden prepararse mediante el uso de hidroxiarilaldehídos adecuadamente funcionalizados. Por ejemplo, el grupo hidroxilo puede reemplazarse con un grupo que contiene alquiléter o un grupo que contiene etilenglicol. Una pluralidad de calix[n]arenos unidos covalentemente se puede conectar a través de los grupos hidroxilo.

En los métodos de preparación, el calix[n]areno puede estar presente en la segunda fase, por ejemplo, en una fase acuosa o una fase inmiscible con agua, como se describe en el presente documento.

En una realización, el huésped es un éter corona. Los compuestos de éter corona están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden prepararse fácilmente.

- 5 También se conocen muchos compuestos huésped para usar con éter corona. Por ejemplo, los huéspedes catiónicos tales como las moléculas funcionalizadas con amino y piridinio pueden ser moléculas huésped adecuadas.

Ejemplos de éteres de corona no funcionalizados y funcionalizados se exponen a lo largo de Gokel et al. (Chem. Rev. 2004, 104, 2723-2750), que se incorpora aquí como referencia. Ejemplos de compuestos para usar como huéspedes se describen a lo largo del texto.

- 10 En una realización, el éter corona se selecciona de los grupos que consisten en 18-corona-6, dibenzo-18-corona-6, diaza-18-corona-6 y 21-corona-7. En la presente invención, se prefieren los éteres corona más grandes. Los éteres de corona más pequeños pueden ser capaces de unir iones metálicos pequeños solamente. Los éteres corona más grandes son capaces de unir grupos funcionales y moléculas.

- 15 En algunas realizaciones, el anfitrión es un huésped que tiene la funcionalidad éter corona y calix[n]areno. Dichos huéspedes se denominan coronas calix[n].

En los métodos de preparación, el éter corona puede estar presente en la segunda fase, por ejemplo, en una fase inmiscible con agua, como se describe en el presente documento.

- 20 Pueden usarse otras relaciones huésped-anfitrión como será evidente para una persona experta en la técnica. Otros complejos hospedero-huésped incluyen los destacados por Dsouza et al. (Chem. Rev. 2011, 111, 7941-7980) que se incorpora como referencia en el presente documento, y en particular los hospedadores establecidos en los Esquemas 6 y 7, que incluyen cucurbiturilo, ciclodextrina y calixerano, así como ciclofano AVCyc, calixpiridina C4P y Squarimida SQAM.

Se prefiere el uso de ciclodextrina sobre los hospedadores de éter corona y calix[n]areno.

Otras preferencias

- 25 Todas y cada una de las combinaciones compatibles de las realizaciones descritas anteriormente se describen explícitamente aquí, como si todas y cada una de las combinaciones se citaran individual y explícitamente.

Diversos aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación.

- 30 "y/o" donde se usa en el presente documento debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se definiera individualmente en este documento.

A menos que el contexto indique lo contrario, las descripciones y definiciones de las características establecidas anteriormente no se limitan a ningún aspecto particular o realización de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

- 35 Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

Experimentos y Resultados

- 40 Los espectros de ¹H RMN (400 MHz) se registraron usando un Bruker Avance QNP 400. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm (δ) en CDCl₃ con la referencia interna establecida en d 7.26 ppm o MeOD con la referencia interna establecida en d 3.31 ppm. Los cambios químicos se registran en ppm (δ) en CDCl₃ con la referencia interna establecida en d 77.16 ppm y d 49.00 ppm, respectivamente. La espectroscopía ATR FT-IR se realizó utilizando un espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer Spectrum 100 equipado con un accesorio de muestreo universal ATR. Los estudios UV-Visibles se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 4000 UV-Vis. Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un espectrómetro de masas Bruker BioASpex II 4.7e FT-ICR cromatografía líquida-espectrometría de masas Waters ZQ. Todos los materiales de partida se compraron de Alfa Aesar y Sigma Aldrich y se usaron tal como se recibieron a menos que se indique lo contrario. CB[8] fue preparado como fue documentado previamente por Kim (véase Kim et al. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 540). MV²⁺-AuNP (5 nm) y Np-pol se sintetizaron de acuerdo con los métodos de la literatura (véase Coulston et al. Chem. Commun. 2011, 47, 164), mientras que MV²⁺-pol se preparó como se informó anteriormente (véase Appel et al. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 14251). Toda la fase

acuosa se disolvió en agua desionizada tratada con un sistema de reactivo Milli-Q™ asegurando una resistividad de $>15 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$.

Estrategia general para la formación de cápsulas

5 A continuación se describe la estrategia general para la preparación de cápsulas. Los detalles experimentales detallados se proporcionan en secciones posteriores.

En un procedimiento típico de preparación de microcápsulas, se generaron primero microgotitas usando una geometría de unión en T simple (véase Xu et al. *AIChE Journal* 2006, 52, 3005 y Thorsen et al. *Phys. Rev. Lett.* 2001, 86, 4163) como se representa esquemáticamente en la Figura 1a. En este experimento, la primera fase es una fase oleosa que comprende un tensoactivo, y la segunda fase es una fase acuosa. La fase portadora de aceite se dirigió al dispositivo perpendicular a la fase acuosa dispersa, que comprende tres entradas para la solución de CB[8] 1, la solución de MV^{2+} -AuNP 2 y la solución de Np-pol 3. Se generan gotas ya que la fase de aceite inmiscible corta la fase acuosa a una frecuencia que depende de la relación de rata de flujo de las dos fases. Inmediatamente después de la generación, las gotas pasan a través de un canal sinuoso que está diseñado para mezclar completamente los tres reactivos en línea, como se muestra en la Figura 1b. Con una relación de rata de flujo de aceite:agua de 2:1 (donde la rata de flujo de la fase acuosa se refiere a la rata de flujo combinado de los tres subflujos), se generaron gotas a una frecuencia de 300 Hz y exhiben un alto nivel de monodispersidad cuando se recolecta en un portaobjetos de microscopio, como lo indica su distribución de tamaño estrecha y un bajo coeficiente de variación de 1.3% (Figura 1c).

La formación de microcápsulas se observó después de la deshidratación de las microgotitas. El proceso se capturó en la Figura 2a, donde en la etapa final de la reducción de las gotas, la formación de la microcápsula era visible a medida que la forma esférica de la gota se distorsionaba. Parecían estar dobladas en el borde de manera aleatoria, aparentemente colapsadas. La naturaleza de esta estructura tipo cápsula se verificó aún más cuando se observaron cápsulas explotadas después de inducir el mecanismo de fuerza osmótica de rehidratación (Figura 2b). También se obtuvo la imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 2c), que muestra una estructura altamente arrugada, plegada al azar, que se asemeja a una cápsula hueca que se ha colapsado debido a la falta de soporte interno. La cubierta de la cápsula consiste en una red de MV^{2+} -AuNPs y polímeros, como se muestra en la imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 2d), mediante la cual los MV^{2+} -AuNP individuales se interconectaron a través de una malla de presumiblemente polímeros Np. Es probable que las cubiertas de las cápsulas constaran de múltiples capas, ya que los MV^{2+} -AuNP parecían superponerse entre sí. El proceso de esta formación de microcápsulas supramoleculares se representa esquemáticamente como en la Figura 2e. Si bien la mezcla acuosa de CB[8], MV^{2+} -AuNP y Np-pol estaba confinada inicialmente en las gotitas, se cree que la deposición del compuesto supramolecular entrecruzado en la interfase aceite-agua no solo es asistida por la fuerza de empuje de la evaporación del agua, pero también la estabilización de la energía interfase a través de nanopartículas coloidales (véase Patra et al. *Chemistry - An Asian journal* 2010, 5, 2442). Una vez formadas, estas microcápsulas eran altamente resistentes al calor (100°C) y a una presión reducida, presumiblemente debido a la columna vertebral altamente estable de los complejos ternarios CB[8] 1:1:1. La formación de microcápsulas no se observó cuando CB[8] se reemplaza por CB[7], que no puede formar complejos ternarios, o cuando los AuNP no se funcionalizaron con el ligando MV^{2+} (véase más abajo).

El efecto de plantilla interfase se investigó adicionalmente incorporando un fluoróforo al polímero de modo que la distribución del polímero se pueda visualizar durante la formación de las cápsulas. Como se muestra en la Figura 3a, la funcionalidad rodamina-6G se incorporó al polímero que contiene la funcionalidad PEG y NP (NP-RD-pol 4) a través de la polimerización RAFT (Información complementaria). La solución acuosa NP-RD-pol se inyectó luego en el dispositivo de generación de gotas junto con la solución acuosa de los otros dos componentes de la microcápsula como se describió anteriormente. Las gotas fueron dirigidas y recogidas por un depósito de PDMS montado en un portaobjetos de vidrio y las imágenes de fluorescencia de las gotas acuosas en aceite se registraron usando un microscopio confocal de escaneo con láser (LSCM) con un objetivo de inmersión en aceite de 63 x.

La figura 3b muestra una capa claramente definida de fluorescencia de rodamina confinada a la interfase agua-aceite de una gotita, indicativa de la distribución del polímero durante la formación de la microcápsula. Esta observación se debe a la interacción hidrofóbica entre el aceite fluorado y el polímero, y es consistente con la síntesis de plantilla intercalada de microcápsulas poliméricas previamente reportada (véase Abraham et al. *Advanced Materials* 2008, 20, 2177 y Yang et al. *Lab Chip* 2009, 9, 961).

El hecho de que una cápsula hueca se pueda fabricar fácilmente a través de la encapsulación asistida por microgotitas a su vez conduce a la idea de que las cargas solubles en agua se pueden cargar en estas microcápsulas con un 100% de eficiencia, ya que la carga no depende de una síntesis postmicrocápsulas en difusión pasiva (véase Peyratout et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 3762; Abraham et al. *Advanced Materials* 2008, 20, 2177; An et al. *Biomacromolecules* 2006, 7, 580). La hipótesis se probó cargando dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextrano) en las cápsulas. Los dextranos, debido a su alta biocompatibilidad y versatilidad, han sido

ampliamente explotados para la administración de medicamentos, proteínas y agentes de imagen (véase Mehvar Journal of Controlled Release 2000, 69, 1). Usando el sistema de microfluidos actual, la carga del FITC-dextrano se logró simplemente incorporando una solución de FITC-dextrano en una de las entradas acuosas. Las microgotitas generadas de esta manera contenían 25% vlv de FITC-dextrano además de la mezcla de CB[8], MV^{2+} -AuNP y Np-RD-pol.

Las imágenes LSCM se registraron y analizaron como antes y se muestran en la Figura 3c. La gota inicial de 46 μm de diámetro exhibió una capa definida de fluorescencia de rodamina en la interfase agua-aceite, mientras que el centro de la cápsula se llenó uniformemente con fluorescencia FITC del FITC-dextrano. Al examinar el gráfico de intensidad de fluorescencia, se puede ver claramente que el exterior de rodamina se distribuye en el borde exterior del interior del FITC, lo que muestra que la "cubierta" se está formando fuera de la "carga". A medida que las gotas se deshidratan con el tiempo, el material se vuelve más concentrado y, por lo tanto, aumenta la intensidad de fluorescencia. La misma gota de 23 μm de diámetro, con su imagen LSCM y el perfil de intensidad de fluorescencia registrado (Figura 3d), mostró un límite menos claro entre el interior de FITC y el exterior de rodamina. De hecho, el interior del FITC parecía haber comenzado a formar parte de la pared de la cubierta, muy probablemente a través de los sitios intersticiales de la cubierta de la cápsula. Esta observación proporciona la base para el análisis SERS de este material, que se elaborará más adelante. En general, estos resultados de LSCM demostraron inequívocamente la naturaleza hueca de tales microcápsulas supramoleculares que exhiben una eficacia de carga cuantitativa con capas de cápsulas construidas supramolecularmente subjetivas para diversas funcionalidades.

Estrategia general para la formación de cápsulas que comprenden un encapsulante

La permeabilidad de las microcápsulas poliméricas generalmente se estudia utilizando FITC-dextranos disponibles comercialmente de diversos pesos moleculares como carga modelo, debido a su simplicidad en la composición química y la uniformidad en la forma (véase An et al. Biomacromolecules 2006, 7, 580; Hermanson et al., Physical Chemistry Chemical Physics 2007, 9, 6442). La permeabilidad de las microcápsulas presentes se estudió encapsulando una solución acuosa de FITC-dextrano seguido de una deshidratación completa, y luego rehidratando las cápsulas mientras se controlaba la distribución de FITC usando un microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 4a, las microcápsulas secas que contienen FITC-dextrano exhiben fluorescencia brillante a pesar de la superficie arrugada. La penetración de la carga fluorescente se inició redispersando las cápsulas en agua. Cuando se hidrataron las microcápsulas que contenían FITC-dextrano de 10 kDa, la pared de la cápsula se expandió para reanudar el contorno esférico inicial, mientras que la fluorescencia de FITC previamente confinada se había filtrado en la fase acuosa externa (Figura 4a). Por el contrario, cuando se encapsuló FITC-dextrano de 500 kDa en las cápsulas, tras la rehidratación, la fluorescencia se localizó estrictamente dentro de las cápsulas sin ninguna permeación (Figura 4b). Tal resultado revela la naturaleza porosa de la cubierta de la microcápsula, que tiene un cierto umbral para una carga de tamaño particular. Esto está de acuerdo con muchas microcápsulas poliméricas y polielectrolíticas previamente reportadas (véase An et al. Biomacromolecules 2006, 7, 580; Cavalieri et al. ACS Nano 2009, 3, 234; Ameloot et al. Nat. Chem. 2011, 3, 382). A pesar del hinchamiento y la expansión de la pared de la cápsula hasta cierto punto, estas cápsulas fueron estables en agua durante al menos 48 h.

Además de los FITC-dextranos mencionados anteriormente, otras sondas de fluorescencia de peso molecular también se probaron para dilucidar más la permeabilidad de las microcápsulas. Los resultados se resumen en la Tabla 1a, donde una permeabilidad "0" denota el bloqueo completo de los dextranos por la cubierta de la microcápsula, y un "100%" significa que las cápsulas son completamente permeables. Cada resultado se observó en más de 20 cápsulas. Para esta microcápsula particular fabricada a partir de una cierta proporción de los componentes, cualquier dextrano con un peso molecular de 70 kDa y menos puede difundirse fácilmente fuera de las cápsulas, mientras que cualquier dextrano con un peso molecular de 150 kDa o más queda completamente atrapado por la cubierta de la cápsula. Teniendo en cuenta que la conformación de la cadena de dextrano puede verse como una pequeña partícula globular en solución, el radio de giro (R_E) del FITC-dextrano puede proporcionar una buena evaluación del tamaño de poro (véase Andrieux et al. Analytical Chemistry 2002, 74, 5217). El FITC-dextrano con un peso molecular de 70 kDa tiene un radio de giro de aproximadamente 8 nm, mientras que su contraparte de 150 kDa tiene un radio de 11 nm (véase Granath Journal of Colloid Science 1958, 13, 308). Dada la variación de la permeabilidad en función del peso molecular del FITC-dextrano, esto indica que la microcápsula es permeable a las macromoléculas con un tamaño inferior a 11 nm.

La Tabla 1 tiene datos para la variación cualitativa de permeabilidad de (a) microcápsulas que contienen MV^{2+} -AuNP, CB[8] y Np-pol con una relación molar de 2:1:2 para MV^{2+} :CB[8]: Np, y (b) microcápsulas que contienen MV^{2+} -AuNP, CB[8] y Np-pol con una relación molar de 1:1:1 para MV^{2+} :CB[8]: Np, en función del peso molecular (MW) de la sonda de fluorescencia.

Tabla 1A - Permeabilidad al FITC-Dextrano

Sonda de fluorescencia	Permeabilidad
FITC-dextrano, MW 500 000	0
FITC-dextrano, MW 250 000	0
FITC-dextrano, MW 150 000	0
FITC-dextrano, MW 70 000	100
FITC-dextrano, MW 40 000	100
FITC-dextrano, MW 10 000	100
FITC, MW 376	100

Tabla 1B - Permeabilidad al FITC-Dextrano

Sonda de fluorescencia	Permeabilidad
FITC-dextrano, MW 150 000	0
FITC-dextrano, MW 70 000	0
FITC-dextrano, MW 40 000	100

5 También se investigó la relación entre este grado de permeabilidad de la cubierta de la cápsula y el grado de entrecruzamiento entre el MV²⁺-AuNP y el Np-pol a través de la CB[8]. Para este propósito, se fabricó una microcápsula diferente que contiene el doble de la cantidad de CB[8], simplemente variando la tasa de flujo de los reactivos y, por lo tanto, el porcentaje del componente. Se pensó que esto aumentaría el grado de entrecruzamiento en consecuencia a medida que se proporcionan más entrecruzadores antes de que todos los sitios de unión estén saturados. Los estudios de permeabilidad se realizaron encapsulando y difundiendo FITC-dextranos con diversos pesos moleculares en agua.

10 Los resultados se resumen en la Tabla 1b, que muestra que estas cápsulas son completamente permeables al FITC-dextrano con un peso molecular de 40 kDa y son impermeables a aquellas con un peso molecular de 70 kDa o más. En comparación con el límite de permeabilidad de su contraparte con solo el 50% del CB[8] en la mezcla, estas cápsulas son permeables para macromoléculas con un tamaño inferior a 8 nm. Esto demuestra la facilidad de ajustar el tamaño de poro de estas microcápsulas supramoleculares variando la proporción de componentes de la cubierta de la cápsula, proporcionando un potencial prometedor para personalizar el tamaño de poro dependiendo de las propiedades de la carga a liberar.

Comentarios adicionales sobre la estrategia general para la formación de cápsulas que comprenden un encapsulante

Los presentes inventores también han confirmado que los métodos de la presente invención pueden usarse para preparar una cápsula que encapsula un microorganismo, y en particular una célula. En los ejemplos descritos anteriormente para la preparación de una cápsula que contiene dextrano, la fase que contiene dextrano se adaptó de tal manera que se utilizó una suspensión de células bacterianas en lugar del dextrano. En este caso, se usó una suspensión de E. coli con expresión de proteína fluorescente verde (GFP). Se obtuvo una cápsula que contenía E. coli y se analizó por LSCM. La imagen LSCM y el perfil de intensidad se muestran en la Figura 10.

Métodos generales para determinar los efectos de resonancia mejorada de la superficie de la cápsula

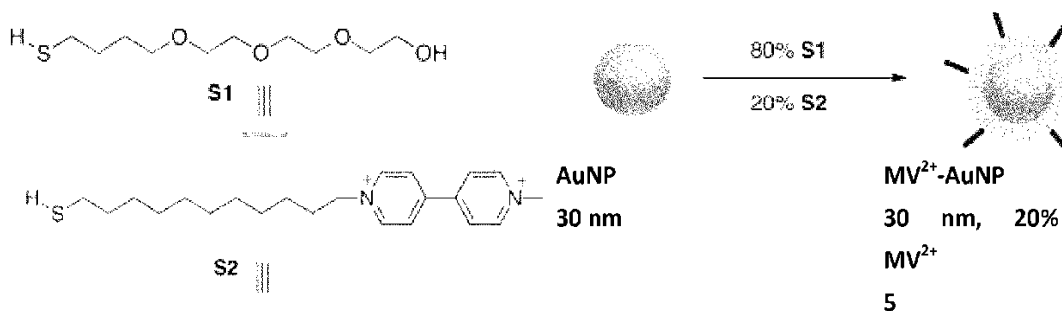
25 También se investigó el potencial de usar estas microcápsulas que contienen AuNP como un nuevo tipo de material plasmónico para la espectroscopía Raman de superficie mejorada. Dado que a medida que avanza la deshidratación

durante la formación de la cápsula, una pequeña cantidad del material encapsulado parece estar localizado en los poros de la cubierta, estas cápsulas tendrían el potencial de mejorar no solo las señales Raman del propio material de la cubierta de la cápsula, sino también posiblemente el de cualquier material que haya sido encapsulado por la microcápsula. Esta hipótesis se investigó mediante la preparación de diferentes microcápsulas que contienen MV²⁺-AuNP de 5 nm y 20 nm y con un polímero funcionalizado con metilviolólgeno multivalente (MV²⁺-pol 5) (Figura 6a). En ambos ejemplos de cápsulas que contienen AuNP, cuando la muestra se excitó usando una línea láser de 633 nm, se adquirieron señales SERS características para CB[8] y MV: deformación C-N-C y balanceo de CH₂ para CB[8] (830 cm⁻¹), y estiramiento del anillo C-C para MV²⁺ (1630 cm⁻¹), estiramiento del anillo C-N para MV²⁺ (1560 cm⁻¹) y estiramiento entre anillos C-C para MV²⁺ (picos de 1308 cm⁻¹) (véase Forster et al. Journal of Raman Spectroscopy 1982, 12, 36) (Figura 6b). Sin embargo, la intensidad de la señal de las cápsulas que contienen MV²⁺-AuNP de 5 nm es casi insignificante en comparación con la de las cápsulas que contienen MV²⁺-AuNP de 20 nm. Esto está de acuerdo con el hecho de que la mejora del campo SERS depende de la distancia entre los NP y, por lo tanto, el tamaño de los NP (véase Anema et al. Annual Review of Analytical Chemistry 2011). El mapeo SERS de una microcápsula mostró que las señales SERS estaban localizadas uniformemente solo en el área de la cápsula (Figura 6c). Una verdadera indicación de la utilidad de nuestro método de fabricación de microcápsulas, también se sintetizó una microcápsula de control negativo reemplazando los MV²⁺-AuNPs con un MV²⁺-polímero multivalente 5, para producir una microcápsula hospedero-huésped polímero-polímero. Para este sistema no se registraron señales SERS (Figura 6c). Estos resultados demuestran que estas microcápsulas supramoleculares pueden usarse como un material plasmónico eficaz que da lugar a fuertes señales SERS para compuestos entre las AuNP.

Para investigar la viabilidad de detectar materiales encapsulados, se cargó FITC-dextrano en las cápsulas que contenían MV²⁺-AuNPs. Se observó una mejora significativa de Raman de FITC además de la de CB[8] y MV: 1186, 1232 y 1400 cm⁻¹ (Figura 6d). Se observó una dependencia similar del grado de mejora del tamaño de AuNP donde se midieron señales fuertes para las cápsulas que contenían MV²⁺-AuNP de 20 nm, mejora insignificante para las que contenían MV²⁺-AuNP de 5 nm, mientras que no se registraron señales cuando no AuNPs se incorporaron en la cubierta. Esto también puede atribuirse a la naturaleza altamente absorbente de los MV²⁺-AuNP de menor tamaño (véase Link et al. The Journal of Physical Chemistry B 1999, 103, 4212), donde la luz se convierte más eficientemente en calor y, por lo tanto, da malas señales SERS. Los AuNP con un diámetro de 20 nm, por el contrario, tienen una resonancia plasmónica más fuerte (véase Kelly et al. Journal of Physical Chemistry B 2002, 107, 668) y, por lo tanto, producen fuertes señales SERS. Este resultado demostró indiscutiblemente que la cubierta porosa de esta microcápsula supramolecular puede usarse como un sustrato SERS para la detección de materiales encapsulados.

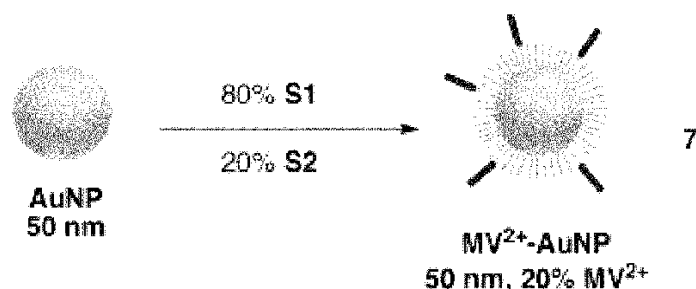
Síntesis de MV-AuNP de 30 nm

Los AuNP se sintetizaron mediante un Método de literatura modificado (véase Martin et al. Langmuir 2010, 26, 7410). En resumen, a una solución acuosa (200 ml) de trihidrato de cloruro de oro (III) (24 mg, 0.06 mmol), borohidruro de sodio (3.4 mg, 0.09 mmol) en etanol acuoso al 50% (v/v) (5 ml) se añadió y la solución resultante se enfrió inmediatamente en un baño de hielo durante 30 segundos. La solución se volvió de color rojo y se almacenó en el refrigerador (aprox. 4°C) hasta su uso posterior (Nota: los AuNP se usaron dentro de los 2-3 días posteriores a la preparación). Se prepararon soluciones madre (5 ml) para cada uno de los tioles EG3 S1 (4.72 mg, 1.98 x 10⁻² mmol) y MV²⁺ S2 (8.5 mg, 1.98 x 10⁻² mmol) en agua (5 ml). Se combinaron partes alícuotas de las soluciones madre (MV²⁺ S2: 0.45 ml, MV²⁺ 20%, aproximadamente 1170 ligandos MV por AuNP; EG3 S1: 1.8 ml) y se agregaron rápidamente a una solución en remolino (10 ml) de las AuNP sintetizadas. La mezcla se incubó luego durante 48 horas. Los MV²⁺-AuNPs se purificaron usando lavados centrífugos (120 segundos, 12,100 g) con agua Milli-Q. En el lavado final, los AuNP se concentraron a 1 ml y se usaron directamente para preparar las microcápsulas. Diámetro medio: 32 nm ± 5 nm, (TEM), λ_{máx} 529 nm.



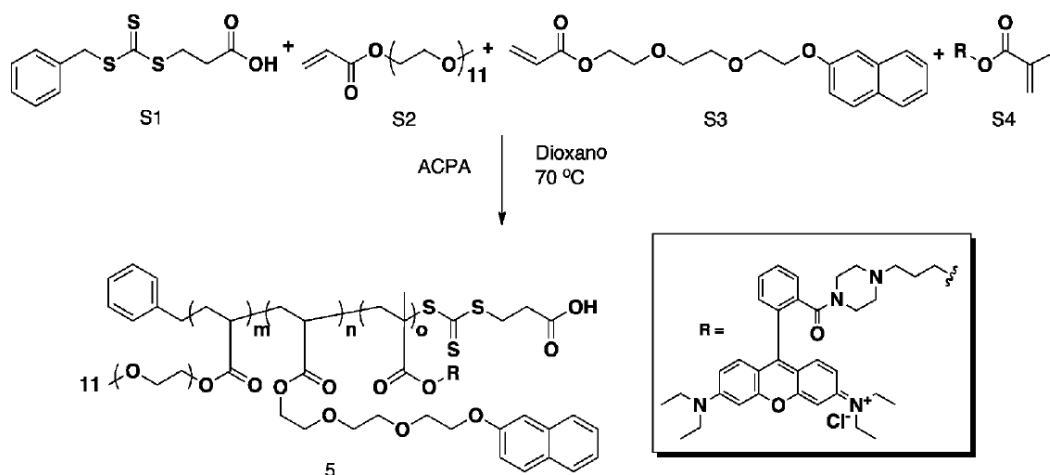
Síntesis de MV-AuNP de 50 nm

La síntesis de AuNP estabilizados con citrato siguió un método de literatura estándar (véase G. Frens Nature Phys. Sci. 1973, 241, 20). Los AuNP estabilizados con citrato (10 ml) se añadieron gota a gota a una solución acuosa (10 ml) de CTAB (3.6 mg, 9.8 μmol). Los AuNP se lavaron con una centrifuga (120 ve, 12,100 g) y agua Milli-Q para eliminar el exceso de ligandos. Se prepararon soluciones madre (5 ml) para cada uno de los tioles EG3 S1 (4.72 mg, 1.98 $\times 10^{-2}$ mmol) y MV²⁺ S2 (8.5 mg, 1.98 $\times 10^{-2}$ mmol) en agua (5 ml). Se combinaron partes alícuotas de las soluciones madre (MV²⁺ S2: 0.45 ml, MV 20%, aproximadamente 7340 ligandos MV por AuNP; EG3 S1: 1.8 ml) y luego se agregaron rápidamente a una solución de remolino (10 ml) de los AuNP estabilizados con CTAB. La mezcla se colocó luego en un agitador durante 48 horas a 150 rpm. Los MV²⁺-AuNP de 50 nm se aislaron luego del exceso de ligandos con dos lavados usando una centrifuga (1 x 60 s, 12,100 g y 1 x 45 s, 12,100 g) y agua Milli-Q. En el lavado final, los AuNP se concentraron a 1 ml y se usaron directamente para preparar las microcápsulas. Diámetro medio: 52 nm \pm 7 nm (TEM), $\lambda_{\text{máx}}$ 547 nm.



Síntesis general de Np y polímero funcional de rodamina

Con base en la polimerización RAFT (véase Chiefari et al. Macromolecules 1998, 31, 5559), se añadieron S1 (6.3 mg, 0.026 mmol), S2 (0.50 g, 1.05 mmol), S3 (0.18 g, 0.52 mmol), S4 (34.0 mg, 0.052 mmol), 4,4-azobis(ácido 4-cianopentanoico (ACPA, 1.4 mg, 0.0052 mmol) y dioxano (1.0 ml) a un tubo Schlenk y la mezcla se desgasificó por completo usando tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación. La mezcla se sumergió posteriormente en un baño de aceite termostatzado a 70°C durante 10 h. La polimerización se inactivó usando nitrógeno líquido, seguido de dilución con THF antes de que la solución se añadiera gota a gota a éter dietílico. El polímero se disolvió en agua y luego se colocó en un tubo de diálisis (NMWCO cortó 2.000 Da) y se dializó contra agua durante más de 48 horas con 3 x reemplazo de agua. La solución acuosa se liofilizó para dar el polímero 5 como un aceite rosa (0.46 g, 68%). Espectroscopía de ¹H-RMN (D₂O, 500 MHz, 298.5 K) δ = 7.41, 7.18, 6.98, 4.11, 3.60, 3.31, 0.91, 0.35ppm. FT-IR (ATR) ν = 2867.6 1, 1730.65, 1629.16, 1600.63, 1511.08, 1452.77, 1390.05, 1349.85, 1257.03, 1218.03, 1099.26, 1038.26, 947.86, 844.85, 751.49 cm^{-1} . GPC (DMF): M_n = 25.7 kDa (PDI) = 1.18. Espectro de fluorescencia: $\lambda_{\text{ex máx}}$ (H₂O) = 566 nm, $\lambda_{\text{em máx}}$ (H₂O) = 580 nm.



El espectro de excitación del Np-RD-pol aislado se muestra en la Figura 8.

Dispositivo para microfluidos

El procedimiento detallado de litografía suave para la fabricación maestra fue según lo informado por Duffy (véase Duffy, et al. Anal. Chem. 1998, 70, 4974). El dispositivo para microfluidos se fabricó cubriendo el patrón con una mezcla completamente agitada de polidimetilsiloxano (PDMS) y su agente de curado (10% en peso) (Sylgard (RTM) 184, Dow Corning). El PDMS se dejó solidificar a 70°C durante la noche antes de ser desprendido, mientras que las entradas y salidas se generaron usando un punzón de biopsia (Kai Medical, ID 1.0 mm). Los canales para microfluidos cerrados se formaron uniendo la réplica de PDMS moldeada en portaobjetos de microscopio (Thermo Scientific) después de la exposición a un plasma de oxígeno (Femto, 40 kHz, 100 W, Diener Electronic). Los microcanales de los dispositivos sellados se enjuagaron rápidamente con Aquapel (Duxback™) antes de lavarlos con Flourinert FC-40 (3M).

Fabricación y caracterización de las microcápsulas.

La fase de aceite fluorado y la solución de fase dispersa apropiada se cargaron en jeringas (Hamilton, Gasligh (RTM)) con agujas (Becton Dickinson, PrecisionGlide (RTM)) acopladas. Las agujas se equiparon con un tubo de polietileno (Portex (RTM) Fine Bore, 0.38 mm ID, 1.09 mm O). Las jeringas se montaron en bombas para jeringa (Harvard PHD 2000 Infusion), mientras que el otro extremo del tubo se insertó en las entradas apropiadas en el dispositivo PDMS. Los dispositivos fueron fotografiados en tiempo real usando un microscopio invertido (IX71, Olympus) conectado a una cámara rápida Phantom (V72, Vision Research). Se grabaron y analizaron imágenes fijas y videos utilizando el software Phantom. La formación de gotitas se inició cuando el aceite se bombeó primero al dispositivo a 200 µL/h para llenar los canales apropiados. La fase acuosa dispersa se bombeó luego al dispositivo a 10-90 µL/h dependiendo del experimento individual. El tensioactivo flúor (1% en peso) se disolvió en aceite FC-40 y se usó como la fase portadora. En un experimento típico, las concentraciones de las soluciones madre de los reactivos fueron de 0.3 a 80 µM, haciendo que la concentración final C_n de cierto reactivo en gotas se diluya aún más en función de su concentración inicial (C_0), su tasa de flujo Q_n y la tgasa de flujo total de todas las corrientes acuosas (Q_T) una vez encapsuladas en gotas:

$$C_n = C_0 \times \frac{Q_n}{Q_T}$$

Después de la formación, las gotas se recogieron en el depósito PDMS corriente abajo o se transfirieron a un portaobjetos de microscopio (76 x 26 mm, 1.2 mm, Menzel-Glaser). Tras la recolección, se dejó que las gotas se deshidrataran con el tiempo para la formación completa de microcápsulas.

Ejemplo de preparación detallada de cápsulas

En un experimento de fabricación de cápsulas estándar, se introdujo una fase de aceite en el canal del dispositivo para microfluidos descrito anteriormente a un rata de flujo de 200 µL/h, cuya rata de flujo se mantuvo constante. Las fases acuosas se introdujeron en el canal a un rata de flujo total de 100 µL/h, donde las ratas de flujo individuales fueron de 50 µL/h para CB[8] 1 (40 µM), 25 µL/h para MV²⁺-AuNP 2 (0.4 µM) y 25 µL/h para Np-pol 3 (2.3 µM). Dicha combinación de ratas de flujo en la geometría de la unión en T de 40 µm (sección transversal) genera gotas acuosas discretas en aceite con un diámetro de aproximadamente 60 µm. Al secarse, las cápsulas individuales estables resultantes retienen un diámetro de aproximadamente 25 µm. Se recogió una muestra de las microcápsulas generadas usando los parámetros anteriores y se midió el tamaño (diámetro) de las gotas:

Número de gotitas	Diámetro/µm
1	59.02
2	59.67
3	59.90
4	57.69
5	59.16
6	60.50

Número de gotitas	Diámetro/ μm
7	60.45
8	59.53
9	59.53
10	58.93
11	59.76
12	58.78
13	59.39
14	58.64
15	60.59
16	59.63
17	60.09
18	60.36
19	58.55
20	58.22

El tamaño de las gotitas y, por lo tanto, el de las cápsulas es subjetivo a los cambios según la geometría de la unión en T y en la relación de la rata de flujo de la fase continua y la rata de flujo total de la fase dispersa (véase, por ejemplo, Garstecki et al.). El efecto de estos factores se investiga y resume en la Figura 8.

- 5 Sin embargo, variar las ratas de flujo de las corrientes acuosas individuales no cambiará el tamaño resultante de las gotitas siempre que la rata de flujo global de las corrientes acuosas permanezca en la misma proporción que la de la fase oleosa. El siguiente gráfico muestra que, si bien el tamaño total de la gota varía según la relación de la rata de flujo de aceite con la rata de flujo acuoso combinado, la variación en la proporción de las ratas de flujo de las corrientes acuosas individuales no produce ningún cambio significativo en el tamaño de la gota resultante distribución. Los datos
- 10 sin procesar se resumen en la tabla a continuación.

Relación de ratas de flujo acuosos individuales	Relación de la rata de flujo de aceite a la rata de flujo acuoso combinado	Promedio del diámetro de gota (μm)	Desviación Estándar
	1/1	70.62	0.98
25/25/50	2/1	59.43	1.03
	4/1	50.50	0.17

Relación de ratas de flujo acuosos individuales	Relación de la rata de flujo de aceite a la rata de flujo acuoso combinado	Promedio del diámetro de gota (μm)	Desviación Estándar
	8/1	41.03	0.64
	1/1	70.25	0.68
33/33/34	2/1	59.40	0.75
	4/1	50.29	0.38
	8/1	42.60	0.22
	1/1	69.47	0.87
40/30/30	2/1	59.85	0.52
	4/1	50.49	0.24
	8/1	42.53	0.32
	1/1	70.62	0.98
60/20/20	2/1	59.35	0.82
	4/1	50.46	0.24
	8/1	42.91	0.39

Análisis y experimentos de microscopía confocal de escaneo con láser

La preparación de la muestra implicó inicialmente recoger gotas acuosas en aceite FC40 en un depósito de PDMS montado en un portaobjetos de cubierta de microscopio (22 x 50 mm, 0.17 mm, MenzelGlaser). Se tomó una imagen de la muestra en el depósito a diferentes intervalos de tiempo para capturar cápsulas en diferentes etapas de deshidratación. Las mediciones de LSCM se llevaron a cabo utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 utilizando un objetivo 63x (NA = 1.4, Leica HCX PL APO Lambda blue) con agua o aceite (Fluido de inmersión Leica Tipo F, $n_{23} = 1.518$) utilizado como medio de inmersión dependiendo en el experimento. Las muestras se iluminaron con líneas láser de 488 nm o 544 nm para excitar el FITC-dextrano y el polímero que contiene rodamina, respectivamente. La emisión de FITC-dextranos, alcanzando un máximo a 520 nm (hoja de datos del producto) y la emisión de Np-RD-pol, alcanzando un máximo a 582 nm (como se muestra en la Figura 7), se recogieron sobre pases de banda de emisión de 550-540 nm y 560 -650 nm respectivamente. Se analizaron las imágenes de fluorescencia y se obtuvieron los perfiles de intensidad utilizando el software Leica LAS AF 2.3.6.

Microscopio de electrones

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras se prepararon deshidratando las cápsulas en un depósito antes de transferirlas a un vial y se lavaron con aceite FC-40 nuevo dos veces por centrifugación. Se depositó una suspensión de aceite de cápsulas secas sobre una oblea de sílice seguido de un sople suave de nitrógeno para eliminar el exceso de aceite. Se realizaron mediciones y se registraron imágenes usando un SEM de presión variable Leo 1530 y un detector InLens. Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), se realizó una preparación de muestra similar aplicando varias gotas de la suspensión de aceite de las cápsulas secas sobre una rejilla de muestra TEM de cobre recubierto de carbono (malla 400). El exceso de aceite se eliminó primero secándolo a temperatura ambiente y luego en el horno (100°C). Las mediciones e imágenes se obtuvieron utilizando un JEOL 2000FX TEM bajo un voltaje de aceleración de 200 kV.

Configuración de la cámara Andor y análisis de permeabilidad de fluorescencia

5 Las imágenes de fluorescencia de microcápsulas se registraron usando una cámara EM-CCO (Xion⁺, Andor Technologies modelo A247 de Pixelinkand) conectada a un microscopio invertido (IX 71, Olympus) que funciona en modo de epifluorescencia, montado con una platina de microscopio automático (ProScan II, Prior Scientific). Se instaló una lámpara de mercurio (U-LH100HG, Olympus) para iluminación de amplio espectro con filtros FITC y dicroicos (BrightLine[®], Semrock) instalados para separar la excitación de fluorescencia y la luz de emisión. Se agregó un obturador controlado por ordenador a la ruta de excitación para reducir el tiempo durante el cual se excitó la muestra para minimizar el foto-blanqueo. La cámara, el escenario y el obturador fueron controlados por un software escrito a medida (LabVIEW 8.2, National Instruments), que se utilizó para grabar y analizar imágenes de campo claro y fluorescencia.

10 La permeabilidad de las microcápsulas se analizó encapsulando FITC-dextranos de diversos pesos moleculares. La encapsulación se generó al introducir una corriente separada de una solución acuosa de FITC-dextrano (1-10 μM) en línea, agregando un canal de entrada separado en el dispositivo o incorporando la solución de FITC-dextrano con una solución acuosa existente. Las ratas de flujo se ajustaron en consecuencia para generar una variedad de concentraciones de FITC-dextrano en la microcápsula antes de obtener la concentración para obtener una calidad de imagen óptima. Luego se dejó que las gotas se deshidrataran completamente en portaobjetos de vidrio como se describió anteriormente y se tomaron sus imágenes de campo claro y fluorescentes. Las cápsulas secas se volvieron a dispersar en H_2O cubriendo la muestra con una gota de agua y un portaobjetos de cubierta de microscopio. Se tomó otro conjunto de campo claro e imágenes fluorescentes inmediatamente después de la rehidratación, mientras que la permeabilidad de la cápsula se juzgó por la distribución de la fluorescencia FITC en relación con la ubicación de las cápsulas.

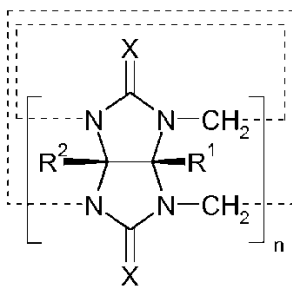
20 Para demostrar la liberación activa y sensible a la reducción del FITC-dextrano, se fabricaron cápsulas que contenían FITC-dextrano (500 kDa) y se secaron sobre portaobjetos de vidrio como se describió anteriormente. La muestra se colocó en una cámara transparente sellada con *parafilm*. El nitrógeno se dirigió a la cámara para crear un ambiente libre de oxígeno. Luego se montó la cámara en el microscopio Andor, y se aplicaron unas gotas de una solución acuosa de exceso de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) sobre las cápsulas secas con una jeringa. Se tomaron imágenes fluorescentes de las cápsulas cada 30 min durante 10 h.

Mediciones SERS

30 Todos los experimentos SERS se realizaron en un microscopio confocal Renishaw InVia Raman con un objetivo de 100 x (NA = 0.85) en la geometría de retrodispersión. Las muestras de microcápsulas para SERS se prepararon recogiendo y secando gotas en un portaobjetos de vidrio. Los espectros SERS se adquirieron utilizando la línea láser de 633 nm o 785 nm, típicamente con una potencia incidente de 0.015 mW y 0.20 mW, respectivamente, con un tiempo de adquisición que oscila entre 1 y 20 s. Los mapas de imágenes de SERS se recolectaron usando el escaneo Streamline[®] y tomaron de 2 a 20 minutos dependiendo de las mejoras de SERS específicas de la muestra y las condiciones de adquisición (incluyendo el área) con tiempos de permanencia de píxeles típicos de 1-20 s. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

REIVINDICACIONES

1. Una cápsula que tiene una cubierta que es un complejo de un hospedero y uno o más bloques de construcción que tienen una funcionalidad de hospedero-huésped adecuada para formar una red entrecruzada supramolecular, en donde el hospedero es cucurbiturilo, y el uno o más bloques de construcción tienen funcionalidad hospedero-huésped para el hospedero cucurbiturilo,
- 5 en donde un primer bloque de construcción es una molécula polimérica, preferiblemente la molécula polimérica es o comprende un poli(met)acrilato, un poliestireno y/o un polímero de poli(met)acrilamida, y opcionalmente la molécula polimérica comprende un marcador detectable.
2. La cápsula de la reivindicación 1, en donde la cubierta es un complejo de (a) una composición que comprende cucurbiturilo y (1) o (2); o (b) una composición que comprende una pluralidad de cucurbiturilo unido covalentemente y (1), (2) o (3), en donde:
- 10 (1) comprende un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped de cucurbiturilo y un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de segundas moléculas huésped de cucurbiturilo, en donde una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario.
- 15 (2) comprende un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped cucurbiturilo y una pluralidad de segundas moléculas huésped cucurbiturilo, en donde una primera y una segunda molécula huésped junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario y opcionalmente la composición comprende además un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una o más moléculas del tercer huésped cucurbiturilo, una o más moléculas del cuarto huésped cucurbiturilo o ambas, en donde una tercera y una cuarta molécula junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario, y/o la primera y cuarta moléculas junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario, y/o la segunda y tercera moléculas junto con cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped ternario; y
- 20 (3) comprende un primer bloque de construcción unido covalentemente a una pluralidad de primeras moléculas huésped de cucurbiturilo, en donde la primera molécula huésped junto con el cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped binario, opcionalmente la composición comprende además un segundo bloque de construcción unido covalentemente a una o más segundas moléculas huésped de cucurbiturilo, en donde la segunda molécula huésped junto con el cucurbiturilo son adecuadas para formar un complejo hospedero-huésped binario.
- 25 3. La cápsula de la reivindicación 2, en donde la cubierta es un complejo de una composición que comprende cucurbiturilo y (1) o (2).
4. La cápsula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cucurbiturilo se selecciona de CB[8] y variantes y derivados del mismo, en donde las variantes y derivados del mismo se seleccionan de un compuesto donde una o más unidades repetidas en CB[8] es una unidad de etilurea, o el compuesto está representado por la estructura a continuación:
- 35



en donde:

n es 8;

y para cada unidad de glicolurilo

40 cada X es O, S o NR³, y

-R¹ y -R² se seleccionan cada uno independientemente de -H y los siguientes grupos opcionalmente sustituidos: -R³, -OH, -OR³, -COOH, -COOR³, -NH₂, -NHR³ y -N(R³)₂ donde -R³ es seleccionados independientemente de alquilo C₁.

20, carboarilo C₆₋₂₀ y heteroarilo C₅₋₂₀, o donde -R¹ y/o -R² es -N(R³)₂, ambos -R³ juntos forman un anillo heterocíclico C₅₋₇; o juntos -R¹ y -R² son alquileo C₄₋₆ que forman un anillo carbocíclico C₆₋₈ junto con el marco de uracilo.

5. La cápsula de la reivindicación 4, en donde el cucurbiturilo forma un complejo ternario con una primera molécula huésped y una segunda molécula huésped, y las moléculas huésped primera y segunda se seleccionan de los siguientes pares:
- viológeno y naftol;
- viológeno y dihidroxibenceno;
- viológeno y tetraiafulvaleno;
- viológeno e indol;
- 10 metilviológeno y naftol;
- metilviológeno y dihidroxibenceno;
- metilviológeno y tetraiafulvaleno;
- metilviológeno e indol; N,N'-dimetildipiridilioetileno y naftol;
- N,N'-dimetildipiridilioetileno y dihidroxibenceno;
- 15 N,N'-dimetildipiridilioetileno y tetraiafulvaleno;
- N,N'-dimetildipiridilioetileno e indol;
- 2,7-dimetildiazapireno y naftol;
- 2,7-dimetildiazapireno y dihidroxibenceno;
- 2,7-dimetildiazapireno y tetraiafulvaleno; y
- 20 2,7-dimetildiazapireno e indol.
6. La cápsula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el segundo bloque de construcción, cuando está presente, es una molécula polimérica o una partícula, y opcionalmente la partícula es o comprende oro o plata o mezclas de los mismos.
7. La cápsula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde:
- 25 (i) el tamaño de la cápsula está en el rango de 0.5 μm a 400 μm, preferiblemente de 10 a 100 μm de diámetro; y/o
- (ii) el diámetro de la cápsula tiene una desviación estándar relativa (RSD) de como máximo 10%; y/o
- (iii) el tamaño de poro de la cubierta es de al menos 0.5 nm y está preferiblemente en el intervalo de 1 a 20 nm.
8. La cápsula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cápsula encapsula un componente, preferiblemente el componente es una molécula biológica, preferiblemente la molécula biológica es un polinucleótido, un polipéptido o un polisacárido, por ejemplo, el polinucleótido es ADN o ARN.
- 30 9. La cápsula de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el componente es un compuesto o composición de fragancia o un compuesto o composición aromatizante.
10. La cápsula de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el componente es un herbicida, pesticida o un catalizador.
11. Un método para la preparación de una cápsula que tiene una cubierta como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el método la etapa de:
- 35 (i) poner en contacto un flujo de una primera fase y un flujo de una segunda fase en un canal, para generar en el canal una dispersión de regiones discretas, preferiblemente gotitas, de la segunda fase en la primera fase, en donde la segunda fase comprende cucurbiturilo y uno o más bloques de construcción que tienen una funcionalidad huésped adecuada para cucurbiturilo para formar una red entrecruzada supramolecular, para así formar una cubierta de cápsula
- 40 dentro de la región discreta, en donde la primera y la segunda fase son inmiscibles,

y opcionalmente en donde la segunda fase comprende además un componente para la encapsulación, y la etapa (i) proporciona una cápsula que tiene una cubierta que encapsula el componente.

5 12. El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende además la etapa de (ii) recoger el flujo de salida del canal, para obtener así una gota, la cual contiene una cápsula, que opcionalmente comprende además la etapa de secar la cápsula obtenida en la etapa (ii).

13. Un método no terapéutico para dirigir un componente a una ubicación, comprendiendo el método los pasos de:

(i) proporcionar una cápsula que tiene una cubierta que encapsula un componente, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10;

(ii) dirigir la cápsula a una ubicación objetivo;

10 (iii) liberar el componente de la cubierta,

preferiblemente en donde la etapa de liberar el componente de la cubierta es en respuesta a un cambio en las condiciones locales, preferiblemente un cambio en la concentración.

14. Una cápsula de acuerdo con la reivindicación 8 para uso como medicamento.

Figura 1

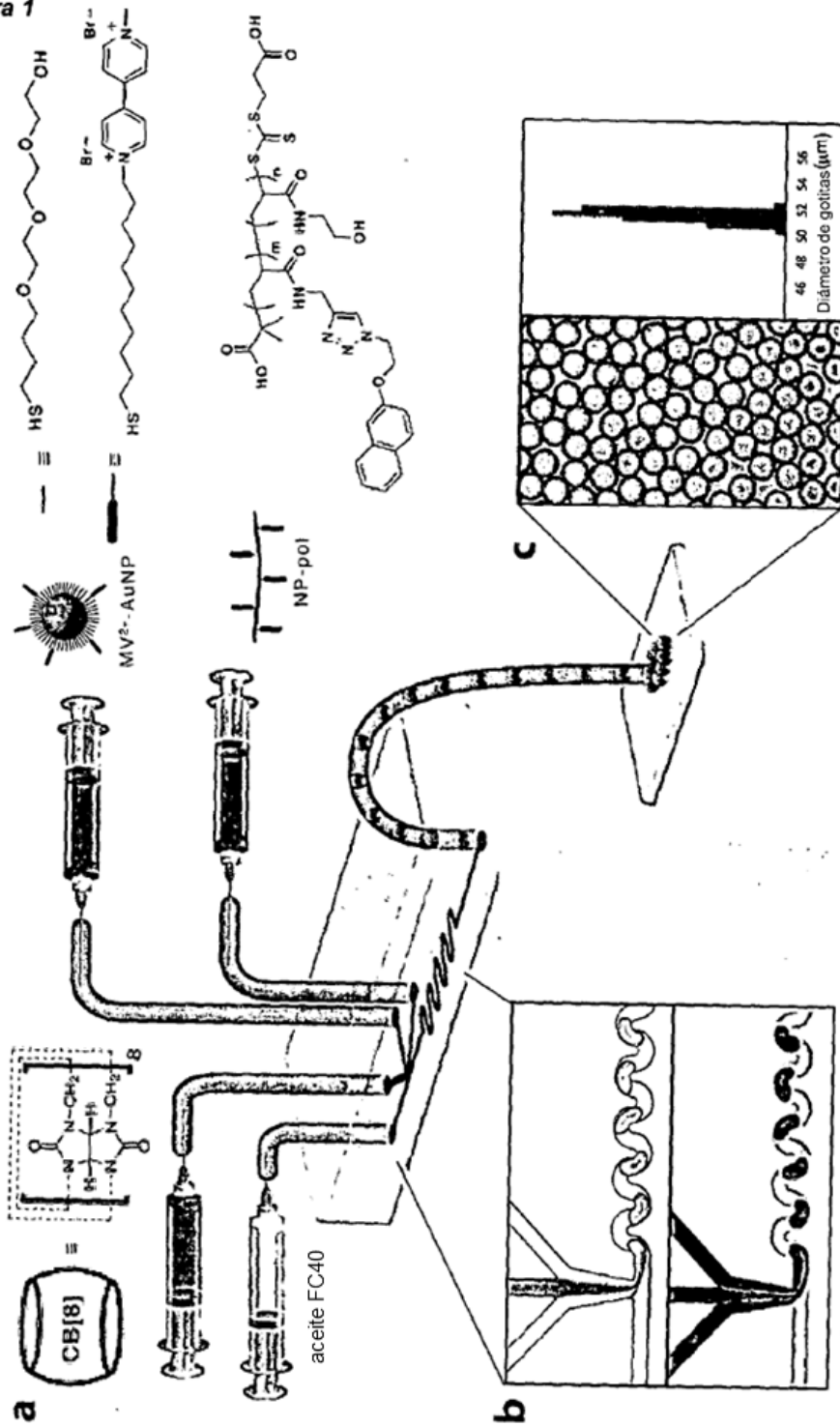
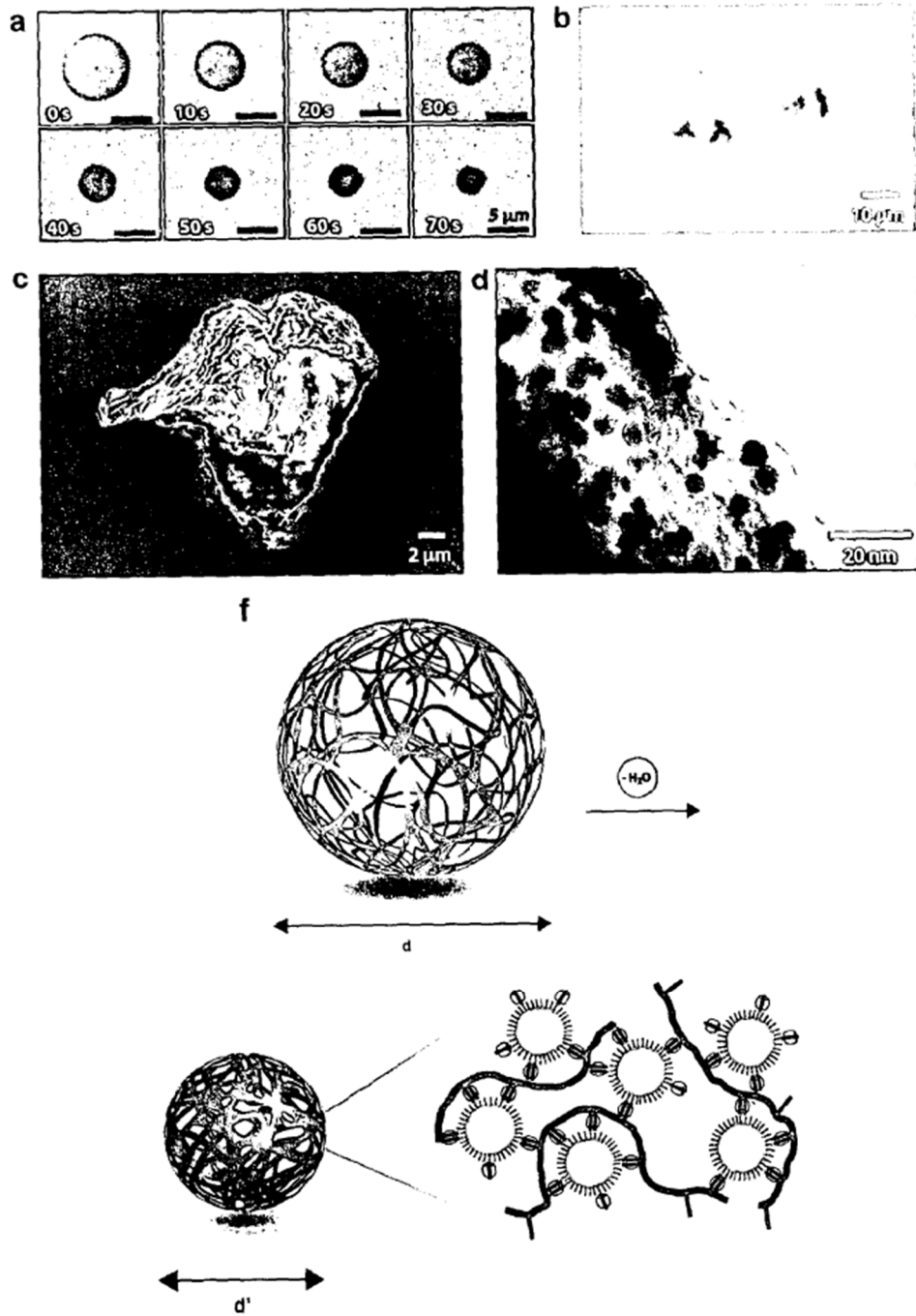
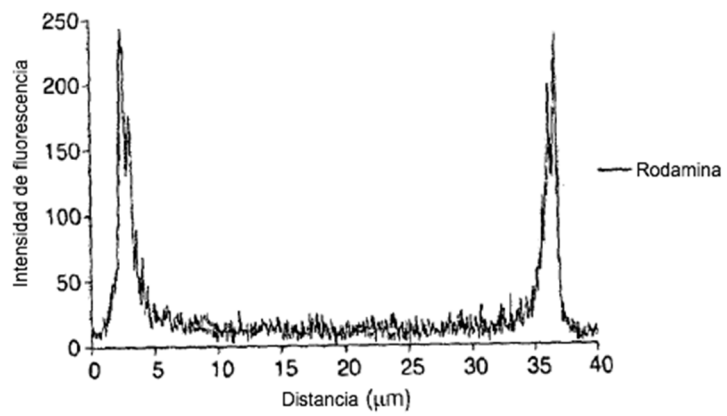
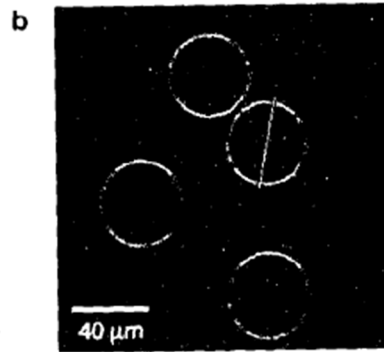
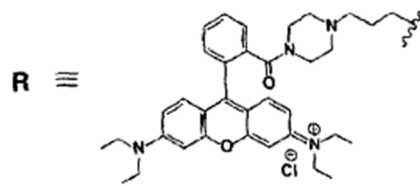
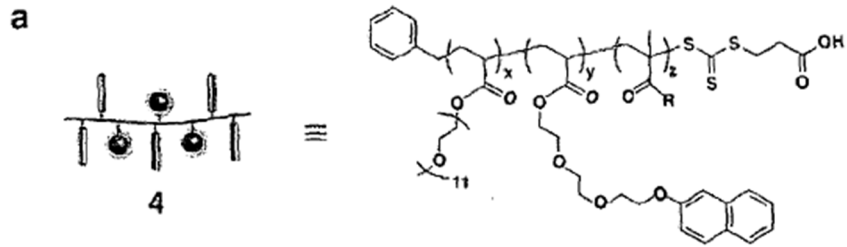


Figura 2



Figuras 3 a-b



Figuras 3 c-d

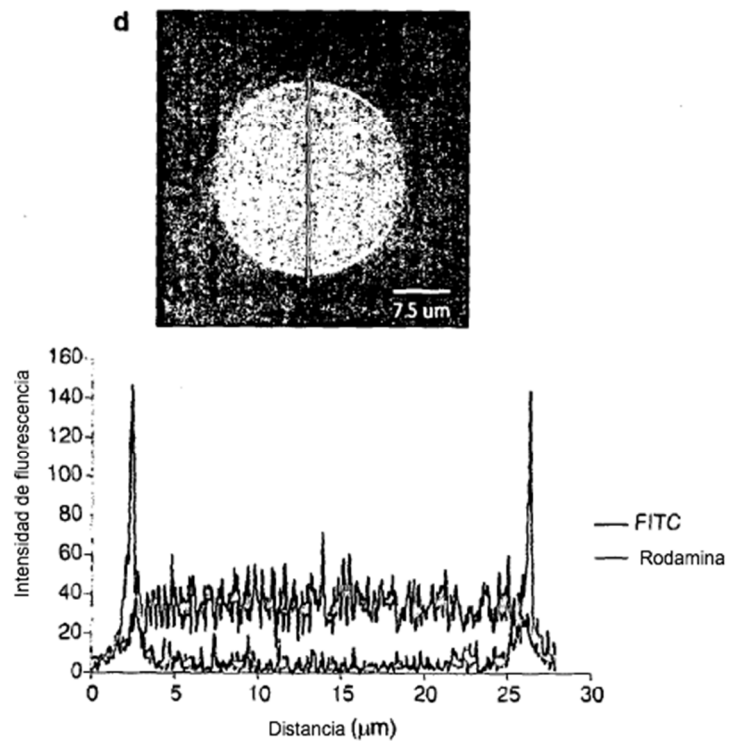
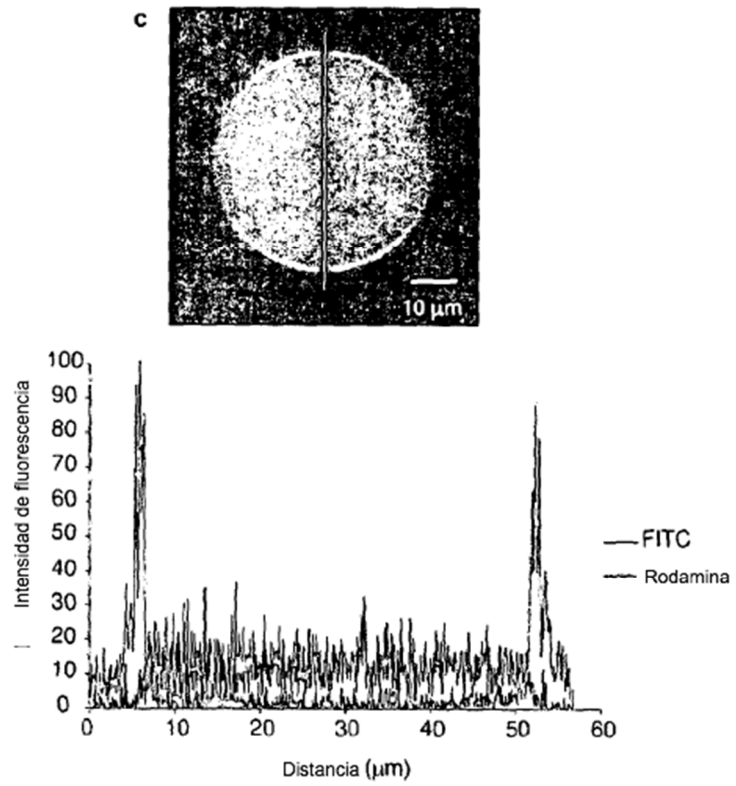


Figura 4

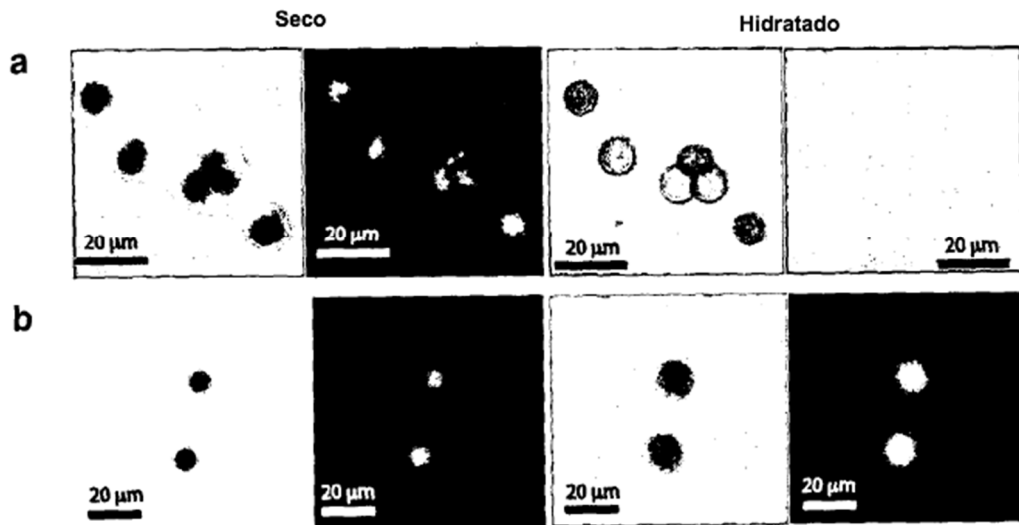


Figura 5

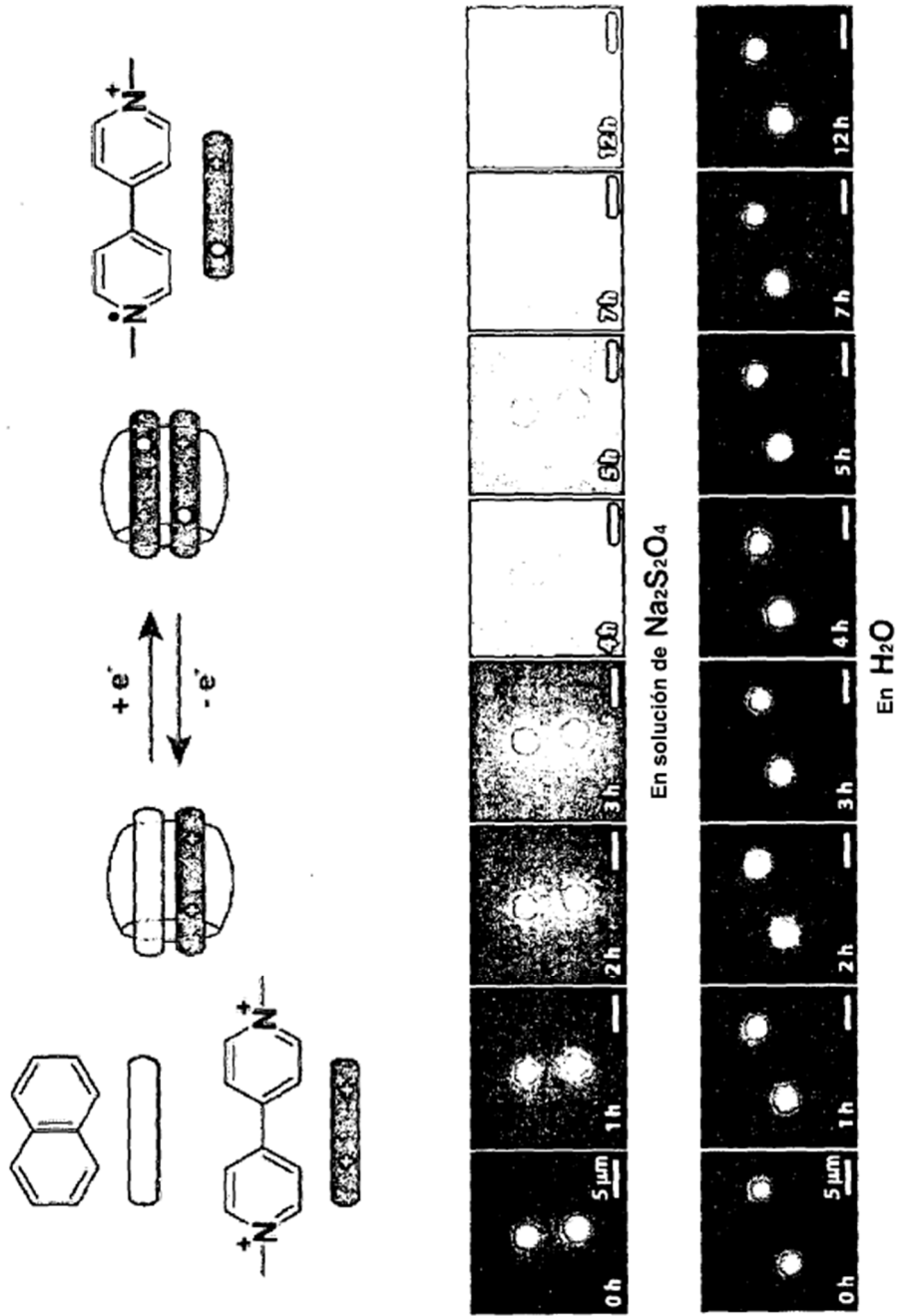


Figura 6a

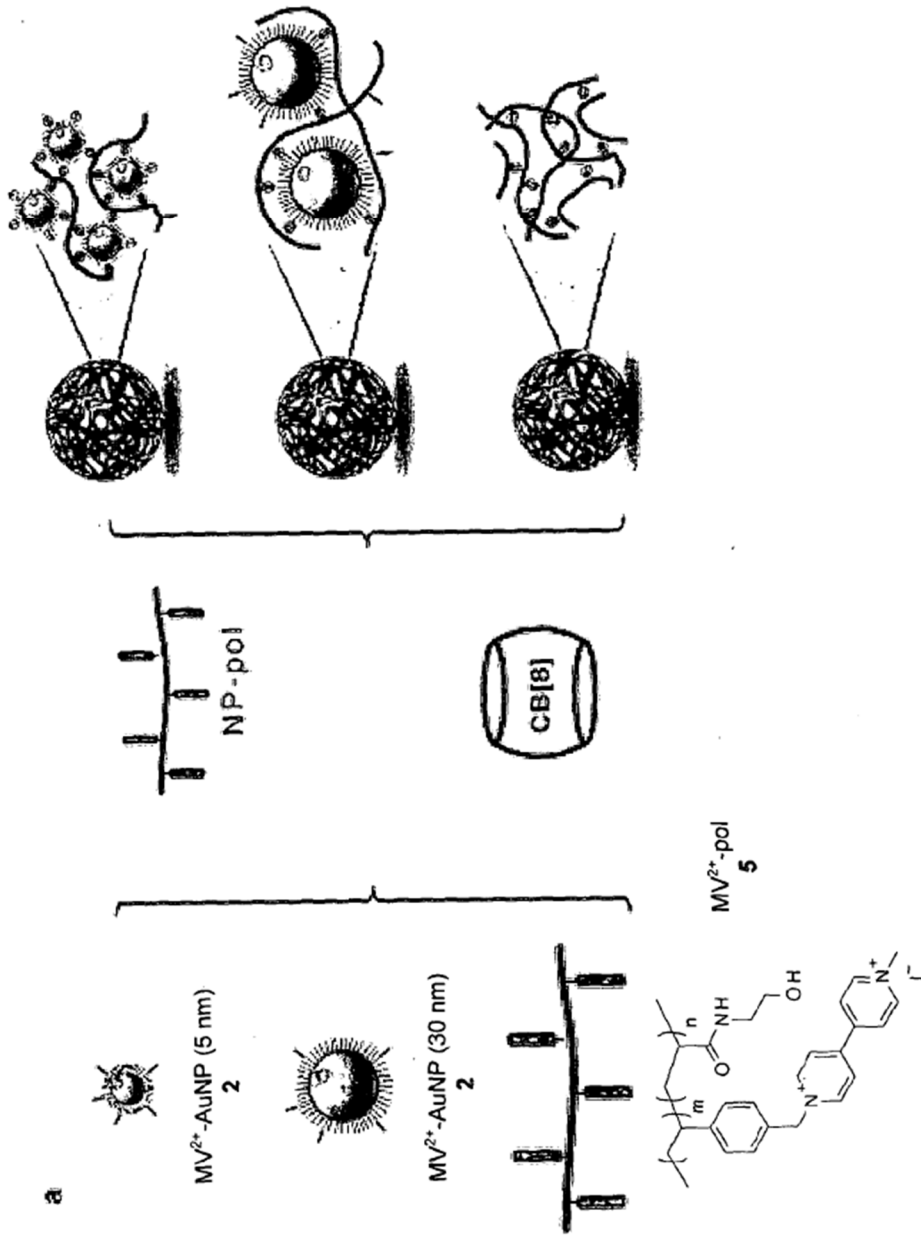
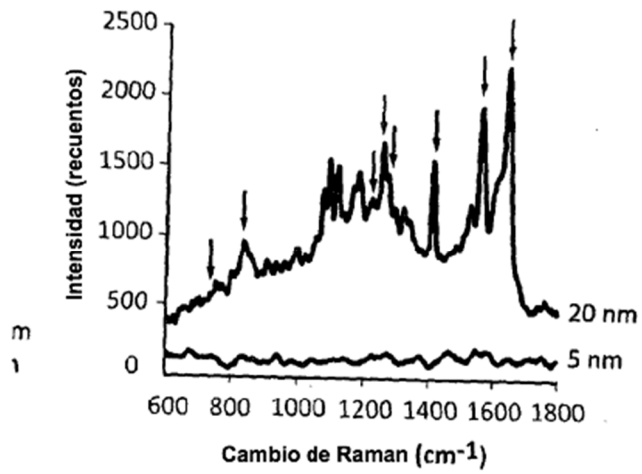


Figura 6 b-d

b



d



c

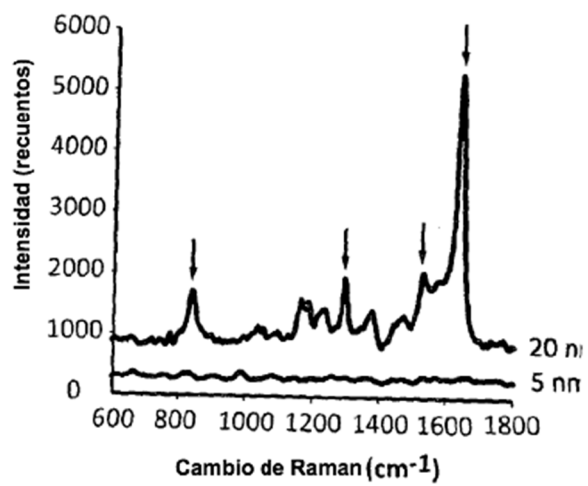


Figura 7

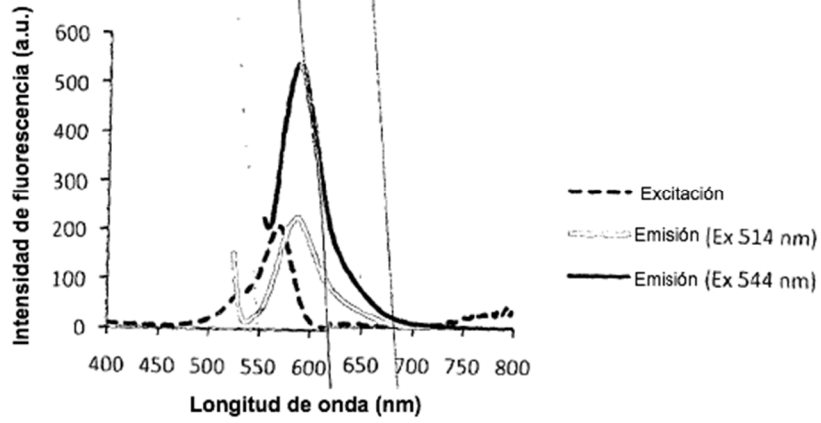


Figura 8

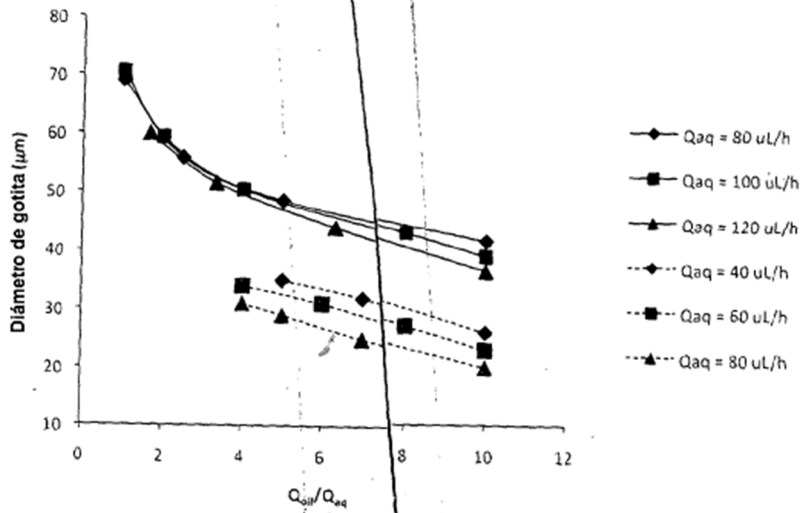


Figura 9

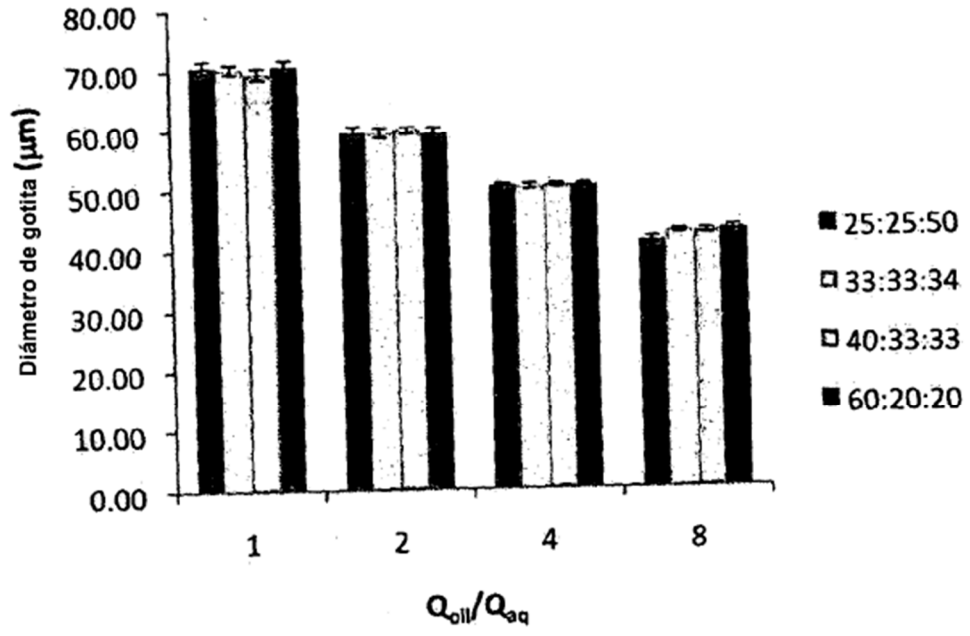


Figura 10

