

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 795**

51 Int. Cl.:

B01J 20/32 (2006.01)

B01J 29/20 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2008 E 08758608 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2152405**

54 Título: **Copolímeros de injerto para la cromatografía de intercambio catiónico**

30 Prioridad:

25.05.2007 EP 07010490

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

GRAALFS, HEINER

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 397 795 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

Copolímeros de injerto para la cromatografía de intercambio catiónico

La invención se refiere a un material de separación con una capacidad de unión mejorada, a su preparación y a su uso para la separación de biopolímeros cargados a partir de líquidos.

5 Estado de la técnica

La cromatografía es uno de los métodos más adecuados para el aislamiento de proteínas. Por ejemplo, se pueden purificar anticuerpos monoclonales mediante una cromatografía de afinidad con ligandos de proteína A. La unión a los ligandos del sobrenadante del cultivo celular se puede realizar sin ajustar el valor de pH ni la concentración de sal. Aún así, estos sorbentes se pueden utilizar sólo de forma limitada debido a sus elevados costes y al desprendimiento del ligando.

El uso de resinas de intercambio de iones de alta capacidad es una alternativa económica. Sin embargo, debe reducirse la conductancia en el sobrenadante del cultivo celular para que se produzca una unión al intercambiador de iones. Esto se puede efectuar mediante una desalinización o por dilución del sobrenadante. Ambas opciones son indeseables, en particular en procesos de producción de gran volumen.

15 En presencia de sales (conductancia elevada) las cargas quedan apantalladas. Para posibilitar aún así la unión a un intercambiador de iones a una conductancia mayor, debe existir, además de la interacción iónica, al menos una segunda interacción entre la proteína y el soporte cromatográfico.

En la bibliografía se conocen materiales de separación que, además de un grupo aniónico, presentan grupos funcionales adicionales y se unen a biopolímeros en presencia de sal.

20 A partir del documento US 5,652,348 (Burton y col.) se conocen resinas cromatográficas y su aplicación, las cuales se obtienen por modificación hidrófoba de ligandos ionizables con ligandos no ionizables. La unión se produce en condiciones que fomentan la interacción hidrófoba. La desorción tiene lugar a otro pH, de manera que la resina se vuelve hidrófila o recibe una carga y la proteína unida (de igual carga) es rechazada.

25 Burton y col. (Biotechnology and Bioengineering 1997, 56, 45-55) describen la purificación de quimosina en una matriz carboxílica que ha sido modificada parcialmente por acoplamiento con una amina aromática.

En el documento EP 1 094 899 se da a conocer un procedimiento para la separación de biomoléculas, especialmente de proteínas, con intercambiadores de cationes, que se caracteriza porque la unión se produce a >15 mS/cm y la elución a una fuerza iónica mayor. El ligando intercambiador de cationes está unido a través del segundo grupo funcional y de un espaciador a una matriz de soporte.

30 En el documento US 7,067,059 se reivindica un procedimiento para la preparación de geles cromatográficos con ligandos intercambiadores catiónicos de modo mixto, en el que la preparación se realiza usando compuestos de homocisteína cíclicos que, por apertura del anillo, conducen a agrupaciones con al menos dos grupos funcionales.

35 En los documentos US 6,852,230 y EP 1 345 694 se describe y reivindica el uso de intercambiadores de iones para la unión y la separación de biomoléculas cargadas con estructura peptídica, en el que después del paso de desorción está presente una solución sin sal o más pobre en sal, de modo que al mismo tiempo se produce una desalinización.

40 En el documento US 7,008,542 se reivindica un procedimiento para la separación de una sustancia, en particular de moléculas bioorgánicas con un peso molecular superior a 1.000 Dalton, que se realiza usando una matriz de soporte. Esta última presenta al menos dos ligandos estructuralmente diferentes, siendo al menos un ligando un intercambiador de iones. Los ligandos típicos poseen una masa molecular <1.000 Da.

En el documento US 7,144,743 se describe un ligando policíclico para cromatografía que está sustituido con un grupo aniónico.

45 Desde hace muchos años se conocen polímeros lineales funcionalizados que se obtienen injertando monómeros funcionalizados correspondientes sobre numerosas superficies diferentes. Cuando en el caso de la funcionalización se trata de agrupaciones aniónicas ligadas químicamente se pueden usar los materiales correspondientes para la cromatografía de intercambio catiónico (W. Müller, J. Chromatography 1990, 510, 133-140). En las patentes EP 0 337 144 o US 5,453,186 se encuentra un gran número de estructuras poliméricas de injerto posibles que están previstas para el fraccionamiento de biopolímeros. A partir de la bibliografía de patentes también se conocen

polímeros de injerto formados por más de un elemento estructural monomérico y que se obtienen por copolimerización. Sin embargo, en la bibliografía se profundiza poco en la combinación de los monómeros: Para obtener intercambiadores adecuados, los monómeros para la copolimerización se deberán seleccionar de tal manera, que ambos monómeros presenten grupos o bien básicos o bien ácidos, o uno de los monómeros sea neutro. No se mencionan explícitamente mezclas ternarias de monómeros o modificaciones químicas de los polímeros de injerto.

En Biomacromoleculas 2003, 4, 273-282, se ha estudiado y discutido la interacción entre proteínas y polielectrolitos sintéticos libres o solubles, como, por ejemplo, entre poli(ácido acrílico) modificado de forma hidrófoba y BSA.

A partir de la bibliografía de patentes y revistas se conocen, pues, muchos enfoques para la modificación de intercambiadores de cationes. También se conocen diferentes métodos para la preparación de adsorbentes con ligandos que trabajan en modo mixto. Sin embargo, sólo existen pocos adsorbentes comerciales adecuados para unir proteínas y, especialmente, anticuerpos a partir de sobrenadantes de cultivos celulares.

El gel cromatográfico descrito en el documento US 7,144,743, derivatizado con ácido 2-mercapto-5-benzimidazolsulfónico como ligando, puede enlazar hasta 30 mg/ml de IgG. En mediciones propias con Gammanorm, usando un producto correspondiente distribuido en el mercado bajo el nombre MBI HyperCel®, se encontró una unión de 23 mg/ml a pH 5 y NaCl 140 mM (pico no retenido del 10%).

En el caso de otro producto comercializado por la misma empresa se aprovecha la cromatografía hidrofóbica inducida por carga (Hydrophobic Charge Induction Chromatography, HCIC). Con este producto se pueden enlazar hasta aproximadamente 32 mg/ml de IgG humana policlonal.

Con el uso de otro producto disponible en el mercado, comercializado bajo el nombre de Capto MMC®, se obtuvo para la IgG humana una capacidad de unión dinámica (pico no retenido del 10%) de 7 mg/ml a pH 5,5 y NaCl 150 mM. Para la preparación del producto descrito en el documento US 7,067,059 se usa un ligando multimodal. Este gel, sin embargo, no se desarrolló específicamente para anticuerpos y enlaza 45 mg/ml de BSA.

Además, existen otros productos disponibles en el mercado con ligandos sintéticos que sólo pueden enlazar anticuerpos a partir de soluciones tamponadas. Cuando se aplican para el tratamiento de sobrenadantes de cultivos celulares se obtiene una unión insatisfactoria o nula. Este resultado se debe probablemente a componentes del sobrenadante del cultivo celular que interfieren.

Sigue siendo necesario proporcionar adsorbentes para la purificación de anticuerpos, que tengan ventajas respecto a la capacidad, el rendimiento, la rentabilidad o la selectividad (J. Chromatography B 2007, 848, 48 – 63). Los polímeros son en sí extraordinariamente adecuados para la modificación superficial de soportes cromatográficos, puesto que existe un amplio surtido de grupos funcionales para elegir, especialmente también para la formación de materiales multifuncionales, y se pueden formar capas gruesas con un gran número de grupos funcionales. En particular, se pueden producir materiales cromatográficos de alta capacidad recubriendo la superficie con una capa polimérica “blanda” (J. Chromatography 1993, 631, 107 - 114).

Sin embargo, hasta la fecha no se conocen materiales de separación que se puedan preparar mediante un procedimiento de fácil realización usando materiales de partida económicos y que, al aplicarlos para la separación de sobrenadantes de cultivos celulares o de otros líquidos biológicos, sin reducción significativa de las conductancias, presenten actividades de separación tan elevadas, especialmente en lo referente a anticuerpos monoclonales, que sean adecuados para una aplicación a escala técnica.

Objetivo

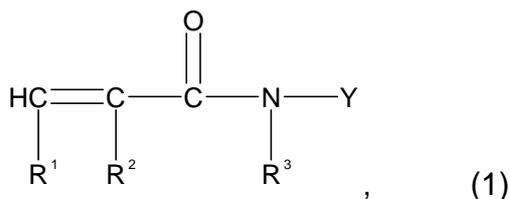
El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un material de separación que presente capacidades de unión mejoradas para proteínas, especialmente también para anticuerpos de sobrenadantes de cultivos celulares, y que sea adecuado para el uso a escala industrial para aplicaciones preparativas.

En particular, el objetivo de la presente invención consiste, por lo tanto, en preparar materiales que, a una conductancia como la que existe habitualmente en los sobrenadantes de cultivos celulares y en condiciones por lo demás iguales, presenten mayores capacidades de unión a proteínas que los intercambiadores de cationes disponibles actualmente en el mercado, como, por ejemplo, Fractogel® EMD SO₃⁻ (M) o Fractogel® EMD COO⁻ (M). De este modo, las capacidades de unión a proteínas deben ser elevadas, con una buena recuperación de la proteína usada cuando la proteína sólo presenta un tiempo de contacto corto con el material de separación, especialmente en condiciones dinámicas como las existentes en los procesos cromatográficos a altas velocidades de flujo. La finalidad de la presente invención es, por lo tanto, la síntesis de un intercambiador de cationes tolerante a sal y su aplicación en la purificación de proteínas.

El objetivo de la presente invención es asimismo proporcionar un material de separación estable a álcalis que permita una limpieza o regeneración a $\text{pH} \geq 13$ sin alterar de forma sustancial las propiedades del material de separación.

Logro del objetivo según la invención y objeto de la invención

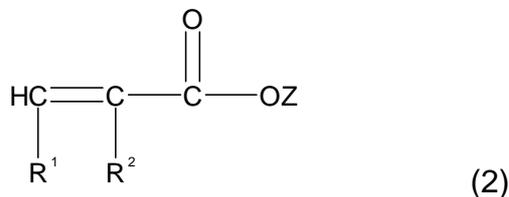
5 El objetivo de la presente invención se alcanza proporcionando un nuevo material de separación que se puede preparar por derivatización de la superficie de un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido que contiene grupos hidroxilo mediante copolímeros unidos de forma covalente, en el que los copolímeros son polímeros de injerto que se componen de al menos dos unidades monoméricas diferentes y en el que al menos una de estas unidades monoméricas presenta un grupo funcional con carga negativa y al menos una de estas unidades monoméricas presenta un grupo hidrófobo que, además de la carga negativa, confiere al copolímero un carácter hidrófobo. Lo característico del polímero de injerto unido a la superficie del material de separación es que se puede preparar usando al menos una unidad monomérica que presenta al menos un grupo carboxilo y/o ácido sulfónico como grupos de carga negativa y que contiene, además, grupos éster o amida y grupos alquilo y/o alquileno con, como máximo, un total de 8 átomos de C pero ningún grupo arilo. Otra variante consiste en que lleva una carga negativa en forma de un ácido sulfónico o ácido carboxílico y posee, además, grupos alquilo y/o alquileno pero ningún grupo arilo. El copolímero presenta asimismo, entre otras cosas, al menos una unidad monomérica que como grupo hidrófobo lleva un alquilo de cadena lineal o ramificado con 4 a 18 átomos de C o grupos arilo correspondientes y contiene grupos éster o amida. El polímero de injerto unido al material de soporte se compone de unidades monoméricas que presentan una relación molar entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con grupos hidrófobos comprendida entre 99:1 a 1: 90. Preferentemente, la preparación del polímero de injerto unido de forma covalente a la superficie del material de separación se realiza en forma de un copolímero usando al menos una unidad monomérica hidrosoluble con carga negativa de fórmula general (1)



en la que

- 25 R^1, R^2 e Y representan independientemente entre sí H o CH_3 ,
 R^3 $\text{R}^4\text{-SO}_3\text{M}$ o $\text{R}^4\text{-COOM}$,
 R^4 alquileno de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C y
M H, Na, K o NH_4

o de fórmula general (2)



en la que significan

- R^7 y R^8 independientemente entre sí
H o CH_3 , o
 R^7 COOM , cuando $\text{Z} = \text{M}$ y $\text{R}^8 = \text{H}$,
35 Z o bien M, $\text{R}^4\text{-COOM}$ o bien $\text{R}^4\text{-SO}_3\text{M}$ con

R⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C,
y

M H, Na, K o NH₄,

5 o al menos una unidad monomérica de fórmula general (1) y una unidad monomérica de fórmula general (2), respectivamente,

y al menos otra unidad monomérica con un grupo hidrófobo de fórmula general (1), que confiere al copolímero un carácter hidrófobo y en la que significan

R¹ H o COOM,

R² H o CH₃,

10 Y y R³ alquilo de cadena lineal o ramificado con hasta 18 átomos de C, en el que Y y R³ llevan juntos al menos 6 átomos de C,

o

Y H

y

15 R³ alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 18 átomos de C o

Y H

y

R³ arilo o R⁶-arilo

o

20 Y H o CH₃

y

R³ R⁴-CONHX,

X alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 18 átomos de C, arilo o R⁶-arilo

R⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C

25 R⁶ un alquileo de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C, en el que un grupo metileno puede estar reemplazado por O y estar sustituido con COOM

y

M H, Na, K o NH₄

o una unidad monomérica correspondiente con un grupo hidrófobo de fórmula general (2), en la que significan

30 R⁷ H,

R⁸ H o CH₃,

Z alquilo de cadena lineal o ramificado con 4 a 18 átomos de C, arilo, R⁶-arilo o R⁴-CONHX,

X alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 8 átomos de C, arilo, R⁶-arilo,

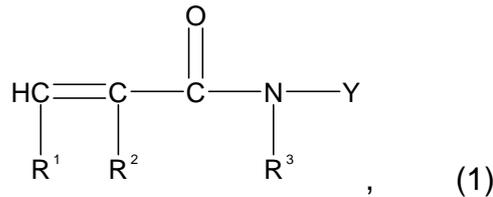
y

R⁶ un alquileo de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C

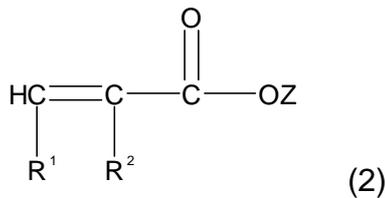
y

5 encontrándose la relación molar entre las unidades monoméricas con carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo hidrófobo en el intervalo de 99:1 a 10:90.

Tal polímero de injerto unido de forma covalente se puede preparar igualmente usando al menos una unidad monomérica hidrosoluble de fórmula general (1)



o de fórmula general (2)



10

en la que significan

Y R⁵-COOM

R¹ y R² independientemente entre sí H, alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de C, carboxilo, carboximetilo

15 R³ H, alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de C, Y

R⁵ alquileo de cadena lineal o ramificado con hasta 8 átomos de C, dado el caso sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxilo o/y

arileno con hasta 10 átomos de C, dado el caso sustituido una o varias veces con grupos alquilo, alcoxi o carboxilo

20 y

M H, Na, K o NH₄ y

Z M o Y.

Estos materiales de separación también se pueden preparar usando al menos una unidad monomérica hidrosoluble de las fórmulas generales (1) o (2), en las que significan

25 Y R⁴-SO₃M

y

R¹ y R² independientemente entre sí H, alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de C y

R³ H, alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de C y

R⁴ metileno, etileno, propileno, hexileno, isopropileno, isobutileno o fenileno.

El resto Y de la unidad monomérica hidrosoluble usada de fórmula general (1) o de fórmula general (2) también puede adoptar el siguiente significado:

Y R⁵-COOM,

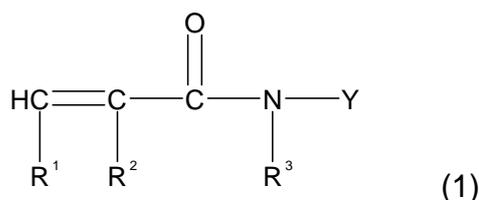
5 significando simultáneamente

R¹ y R² independientemente entre sí H, alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de C y

R³ H, alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de C y

R⁴ metileno, etileno, hexileno, propileno, isopropileno, isobutileno o fenileno.

10 Se prefieren especialmente aquellos materiales de separación que presentan copolímeros que contienen al menos dos unidades monoméricas diferentes y en los que los copolímeros presentan, respectivamente, al menos una unidad monomérica de carga negativa seleccionada del grupo formado por ácido 2-acrilamido-2-
metilpropanosulfónico, ácido 2-acrilamidoetanosulfónico, carboximetilacrilamida, carboxietilacrilamida,
15 carboxipropilacrilamida, carboximetilmetacrilamida, carboxietilmetacrilamida, carboxipropilmetacrilamida, ácido maleico, ácido acrílico y ácido metacrílico y presentan respectivamente al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo de fórmula general (1),



en la que significan

R¹ H,

R² H o CH₃,

20 Y H

y

R³ arilo o R⁶-arilo,

o

Y H o CH₃

25 y

R³ R⁴-CONHX con

X arilo o R⁶-arilo,

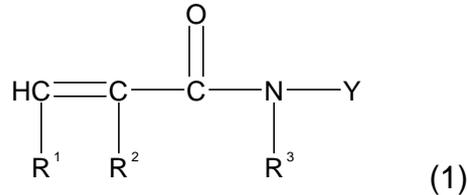
R⁴ metileno, etileno, propileno y

30 R⁶ un alquileno de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C, en el que un grupo metileno puede estar reemplazado por -O- y estar sustituido con COOM,

y

M H, Na, K o NH₄.

Asimismo se prefieren aquellos materiales de separación en los que el copolímero presenta al menos una unidad monomérica con carga negativa seleccionada del grupo formado por ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido 2-acrilamidoetanosulfónico, carboximetilacrilamida, carboxietilacrilamida, carboxipropilacrilamida, carboximetilmetacrilamida, carboxietilmetacrilamida, carboxipropilmetacrilamida, ácido maleico, ácido acrílico y ácido metacrílico y el copolímero presenta al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo de fórmula general (1)



en la que significan

- R¹ H,
- 10 R² H o CH₃,
- Y H
- y
- R³ fenilo, bencilo, feniletilo o fenoxietilo,
- o
- 15 Y H o CH₃
- y
- R³ R⁴-CONHX con
- X fenilo, bencilo o feniletilo
- y
- 20 R⁴ metileno, etileno, propileno, acriloilfenilglicina o acriloilfenilalanina.

Los materiales de separación correspondientes que se preparan usando al menos un compuesto seleccionado del grupo de las metacrilamidas, las acrilamidas o los ácidos carboxílicos insaturados presentan propiedades especialmente ventajosas.

25 El objeto de la presente invención son, en particular, materiales de separación como se han descrito previamente, para cuya preparación se usa al menos un compuesto seleccionado del grupo de los acrilatos de sulfoalquilo, como acrilato de 3-sulfopropilo o acrilato de 2-sulfoetilo, ácido vinilsulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido aliilsulfónico y ácido viniltoluenosulfónico, o del grupo de los metacrilatos de sulfoalquilo, como metacrilato de 2-sulfoetilo o metacrilato de 3-sulfopropilo.

30 Según la invención, también se puede usar para la preparación de los materiales de separación derivatizados adecuados al menos un compuesto seleccionado del grupo formado por ácido maleico, ácido cinámico, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido mesacónico o ácido fumárico, o del grupo de los acrilatos de carboxialquilo, como acrilato de carboxietilo, o de los metacrilatos de carboxialquilo.

35 Los materiales de separación adecuados para el propósito de la invención se pueden preparar asimismo usando al menos un compuesto seleccionado del grupo formado por carboximetilacrilamida, carboxietilacrilamida, ácido acriloil-gamma-aminobutírico y acriloil-fenilalanina, ácido acrílico, ácido metacrílico y ácido etacrílico.

Se prefieren especialmente los materiales de separación que presentan en la superficie un polímero de injerto unido de forma covalente y que se preparan usando al menos una unidad monomérica que presenta una proporción

hidrófoba notable en forma de al menos un grupo alquilo o arilo con un número adecuado de átomos de carbono. Según la invención, tales materiales de separación han resultado especialmente eficaces debido a que pueden interactuar con el biopolímero que se ha de separar tanto con la parte hidrófoba como con la parte cargada del polímero de injerto.

5 Por consiguiente, resulta especialmente deseable realizar una derivatización usando al menos una unidad monomérica con una parte hidrófoba, seleccionada del grupo de las alquilvinilcetonas, arilvinilcetonas, arilalquilvinilcetonas, estireno, acrilatos de alquilo, acrilatos de arilo, acrilatos de arilalquilo, acrilatos de alquilarilo, metacrilatos de alquilo, metacrilatos de arilo, metacrilatos de arilalquilo y metacrilatos de alquilarilo.

También se pueden preparar materiales de separación especialmente eficaces usando al menos una unidad monomérica de fórmula general (1) con una parte hidrófoba, en la que $Y = R^6$ y en la que

R^1 y R^2 significan independientemente entre sí H, alquilo lineal o ramificado con hasta 6 átomos de C

R^3 y/o R^6 significan independientemente entre sí H, alquilo, arilo, alquilarilo, arilalquilo lineal o ramificado, pudiendo llevar el grupo alquilo grupos oxo, pudiendo estar sustituido el grupo alquilo y/o arilo una o varias veces con grupos alcoxi, fenoxi, ciano, carboxilo, acetoxi o acetamino y llevando R^3 y R^6 juntos al menos 6 átomos de C.

Por lo tanto, los materiales de separación según la presente invención se pueden preparar usando al menos una unidad monomérica de fórmula general (1) con una parte hidrófoba, en la que

R^3 , R^6 significan independientemente entre sí H, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, 2-, 3- o 4-oxapentilo, 2-, 3-, 4- o 5-oxahexilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-oxaheptilo, 3-butoxipropilo, isopropilo, 3-butilo, isobutilo, 2-metilbutilo, isopentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-oxa-3-metilbutilo, 2-metil-3-oxahexilo, 2-fenil-2-oxoetilo, fenoxietilo, fenilo, bencilo, feniletilo y fenilpropilo y llevando R^3 y R^6 juntos al menos 6 átomos de C.

Por consiguiente, los materiales de separación según la invención se preparan preferentemente usando al menos una de estas unidades monoméricas con un grupo funcional de carga negativa y al menos una unidad monomérica que presenta un grupo hidrófobo que, además de la carga negativa, confiere al copolímero un carácter hidrófobo, así como, dado el caso, al menos una unidad monomérica neutra que puede ser hidrófila.

Se prefieren especialmente aquellos materiales de separación que se preparan usando al menos una unidad monomérica neutra, que puede ser hidrófila, de fórmula general (1) con $Y = R^6$ y en la que significan

R^1 , R^2 independientemente entre sí H o metilo

R^3 , R^6 independientemente entre sí H, alquilo, alcoxilalquilo con hasta 4 átomos de C respectivamente.

Se prefieren muy especialmente los materiales de separación con al menos una unidad monomérica neutra, que puede ser hidrófila, de fórmula general (1) con $Y = R^6$, en la que significan

R^1 , R^2 independientemente entre sí H o metilo,

R^3 , R^6 independientemente entre sí H, metilo, etilo, butilo, isopropilo, 3-butilo, isobutilo, metoxietilo o etoxietilo.

Para la preparación del material de separación se puede usar, por lo tanto, al menos una unidad monomérica neutra seleccionada del grupo formado por acrilamida (AAm), dimetilacrilamida, metacrilamida, isopropilacrilamida, metoxietilacrilamida y etoxietilacrilamida, o del grupo formado por acrilato de metilo y metacrilato de metilo, así como dos o tres monómeros seleccionados del grupo formado por ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido acrílico, N-arilalquilacrilamidas, como bencilacrilamida y acriloilfenilalanina, N-carboxialquilacrilamidas, como ácido acriloil-gamma-aminobutírico, y N-alquilacrilamidas.

El objeto de la presente invención son, en particular, materiales de separación como se han descrito anteriormente, en los que la relación molar entre las unidades que llevan cargas negativas y las unidades con grupos aromáticos se encuentra en el intervalo de 99:1 a 10:90, preferentemente en el intervalo de 96:4 a 40:60.

Los materiales de separación que presentan propiedades especialmente buenas son, de nuevo, aquellos cuyo copolímero contiene ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico o/y ácido 2-acrilamidoetanosulfónico como unidad(es) monomérica(s) de carga negativa y en los que la relación molar entre las unidades monoméricas de

carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo fenilo, bencilo o feniletilo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 70:30 a 30: 70.

Otros materiales de separación con propiedades especialmente buenas son aquellos en los que el copolímero contiene ácido acrílico o/y ácido metacrílico como unidad monomérica de carga negativa y en los que la relación molar entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo fenilo, bencilo o feniletilo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 95:5 a 70: 30.

También han resultado muy buenos en la aplicación aquellos materiales de separación en los que el copolímero presenta un monómero de la serie ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido 2-acrilamidoetanosulfónico como unidad monomérica de carga negativa y contiene un monómero de la serie ácido acrílico y ácido metacrílico y la relación molar entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo fenilo, bencilo o feniletilo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 95:5 a 30:70.

El presente objetivo se alcanza, en particular, mediante materiales de separación en los que la proporción de grupos cargados en los polímeros de injerto de poli(acrilamida) unidos de forma covalente a la superficie y que como grupos cargados sólo presentan grupos ácido sulfónico se encuentra en el intervalo de 35 a 70 mol% en relación con la cantidad total del polímero de injerto. El objetivo de la invención también se puede alcanzar mediante materiales de separación correspondientes, en los que la proporción de grupos cargados en los polímeros de injerto que solo presentan grupos ácido carboxílico como grupos cargados se encuentra en el intervalo de 60 a 98 mol% en relación con la cantidad total del polímero de injerto.

Los materiales de separación según la invención son especialmente adecuados para el uso en columnas cromatográficas. Por lo tanto, también son objeto de la presente invención las columnas cromatográficas que presentan los materiales de separación descritos según la invención.

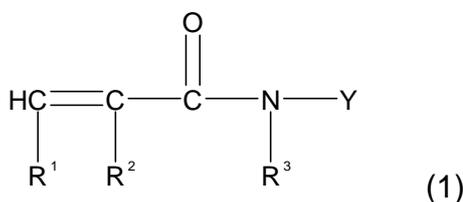
En particular, los materiales de separación aquí caracterizados son especialmente adecuados para la separación de biopolímeros a partir de medios líquidos. Ha resultado especialmente ventajoso que mediante estos materiales de separación se puedan adsorber biopolímeros de forma sencilla y eficaz a partir de un líquido con una conductividad electrolítica superior a 6 mS/cm, preferentemente superior a 9 mS/cm, mientras que los biopolímeros correspondientes están disueltos o se pueden desorber en un líquido acuoso que posee una conductividad electrolítica comprendida en el intervalo de 1 a 20 mS/cm y un valor de pH superior a 4. De este modo, estos materiales de separación son adecuados para adsorber anticuerpos a partir de un líquido acuoso con un pH de 5,5 y una conductividad electrolítica superior a 6 mS/cm, preferentemente superior a 9 mS/cm, y se pueden usar de manera sencilla para la separación a partir de líquidos biológicos. A continuación se puede tratar el material de separación cargado y eluir el biopolímero con un líquido adecuado.

Por lo tanto, también es objeto de la presente invención el uso del material de separación caracterizado para la separación de un biopolímero a partir de un líquido, en el que el biopolímero unido al material de separación por interacción con los grupos iónicos y, dado el caso, hidrófobos, se desorbe aumentando la fuerza iónica y/o modificando el pH de la solución y/o usando un eluyente con una polaridad distinta de la del tampón de adsorción.

Un procedimiento adecuado para la preparación de tales materiales de separación según la invención consiste en la polimerización por injerto de al menos una unidad monomérica con un grupo funcional de carga negativa con al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo y, dado el caso, con un monómero neutro con propiedades hidrófilas, en una reacción de una o dos etapas sobre un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo. Con este propósito se disuelve, por ejemplo, al menos una unidad monomérica con un grupo funcional de carga negativa, junto con al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo y, dado el caso, un monómero neutro con propiedades hidrófilas, en un ácido diluido añadiendo un codisolvente y en presencia de iones cerio(IV) y se polimeriza por injerto sobre un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo.

El procedimiento según la invención para la preparación de los materiales de separación antes caracterizados se caracteriza especialmente porque

a) se polimeriza por injerto al menos un monómero con un grupo carboxilo de fórmula general (1)



en la que significan

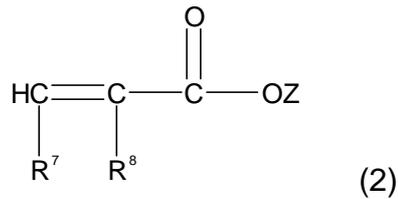
R^1, R^2 e Y independientemente entre sí H o CH_3 ,

R^3 R^4 -COOM y

R^4 alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C y

5 M H, Na, K o NH_4 ,

y/o un monómero con un grupo carboxilo de fórmula general (2)



en la que significan

R^7 y R^8 independientemente entre si

10 H o CH_3 , o

R^7 COOM cuando $Z = M$ y $R^8 = H$,

Z o bien M o bien R^4 -COOM con

R^4 alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C

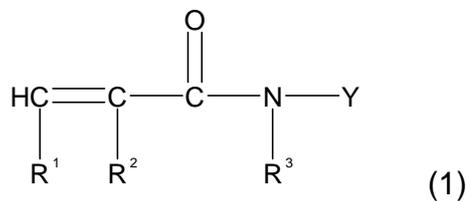
y

15 M H, Na, K o NH_4 ,

dado el caso junto con un monómero hidrosoluble, sobre un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo y b) a continuación se transforma una parte de los grupos carboxilo polimerizados por injerto en grupos amido por acoplamiento con una amina.

Una variante seleccionada de este procedimiento consiste en

20 a) disolver en agua al menos un monómero con un grupo carboxilo de fórmula general (1)



en la que

en la que significan

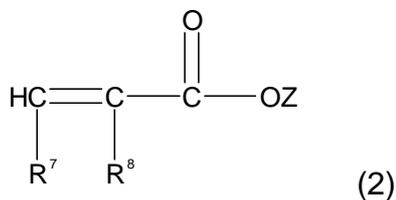
R^1, R^2 e Y independientemente entre sí H o CH_3 ,

25 R^3 R^4 COOM,

R^4 alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C y

M H, Na, K o NH₄,

y/o de fórmula general (2)



en la que significan

5 R⁷ y R⁸ independientemente entre sí H o CH₃,

o

R⁷ COOM cuando Z = M y R⁸ = H

Z M o R⁴-COOM

R⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C,

10 y

M H, Na, K o NH₄,

dado el caso junto con un monómero hidrosoluble adicional, de manera que la proporción de los grupos de carga negativa ascienda a entre 1 y 100 mol% en relación con la cantidad total de monómeros, b) mezclar la solución obtenida con el material de soporte de tal manera, que se usen entre 0,05 y 100 mol de monómeros totales por litro de material de soporte sedimentado, c) añadir a la suspensión obtenida sal de cerio(IV) disuelta en ácido mineral, por medio de lo cual se ajusta un valor de pH comprendido en el intervalo de 0 a 5 y una concentración de cerio(IV) de 0,00001 a 0,5 mol/l, preferentemente de 0,001 a 0,1 mol/l, y d) polimerizar por injerto la mezcla de reacción en un plazo de 0,5 a 72 horas y e) usar para la modificación por acoplamiento de los grupos carboxilo polimerizados por injerto una amina o una mezcla de aminas y f) usar la cantidad total de aminas en una relación molar de 0,01 a 100:1 respecto a los grupos carboxilo unidos al soporte y transformar éstos en grupos amida en presencia de un reactivo de acoplamiento que se usa en una relación molar de 0,01:1 a 20:1 respecto a los grupos cargados unidos al soporte y g) usar para el acoplamiento una alquil-, aril- o arilalquilamina con 6 a 18 átomos de C del grupo formado por anilina, bencilamina, 4-fluorobencilamina, 4-metoxibencilamina, naftilmetilamina, fenacilamina, feniletilamina, fenoxietilamina, triptamina o tiramina, en forma de amina libre o de hidrocioruro.

Para la realización del procedimiento según la invención se usa como ácido diluido un ácido del grupo formado por ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido nítrico a una concentración comprendida en el intervalo de 1 a 0,00001 mol/l, mezclándose el ácido en una relación volumétrica de 30:70 a 98:2 con un codisolvente. Como codisolvente se puede usar al menos un disolvente seleccionado del grupo formado por dioxano, acetona, dimetilformamida, dimetilacetamida y tetrahidrofurano.

Para obtener materiales de separación derivatizados con las propiedades deseadas, los monómeros cargados y los monómeros hidrófobos se usan, para la realización del procedimiento, en una relación tal, que la proporción del componente hidrófobo ascienda a entre 1 y 90 mol% en relación con la cantidad total de monómeros, usándose entre 0,05 y 100 mol de monómeros por litro de material de soporte sedimentado.

Una forma de realización seleccionada del procedimiento según la invención consiste en polimerizar por injerto (met)acrilamidas funcionalizadas y ácido (met)acrílico en una reacción de una sola etapa en la superficie de un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo.

Otra variante del procedimiento según la invención consiste en polimerizar por injerto un monómero hidrófilo en un medio de reacción líquido sobre un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo y en modificar el polímero de injerto obtenido de forma hidrófoba en un segundo paso mediante una reacción polimérica análoga.

Preferentemente, la realización del procedimiento según la invención para la preparación de los materiales de separación se efectúa

- 5 a) disolviendo un monómero hidrófilo en agua, el cual, dado el caso, se mezcla con monómeros adicionales en una relación tal, que la proporción de grupos de carga negativa ascienda a entre 1 y 100 mol% en relación con la cantidad total de monómeros,
- b) mezclando la solución obtenida con el material de soporte de tal manera, que se usen entre 0,05 y 100 mol de monómeros totales por litro de material polimérico sedimentado,
- c) añadiendo a la suspensión obtenida sal de cerio(IV) disuelta en ácido mineral, ajustándose de este modo un valor de pH comprendido en el intervalo de 0 a 5, y
- 10 d) polimerizando por injerto la mezcla de reacción en un plazo de 0,5 a 72 horas.

El elemento monomérico usado para la modificación hidrófoba se utiliza preferentemente en un exceso de 100 a 10.000 mol% en relación con los grupos cargados unidos al soporte en presencia de un reactivo de acoplamiento, usándose este último en un exceso de 60 a 2.000 mol% en relación con los grupos cargados unidos al soporte.

15 Por lo tanto, también es objeto de la presente invención el material de separación así obtenido, el cual puede estar presente en forma de una columna cromatográfica y que se ha derivatizado según la invención mediante polimerización por injerto.

La presente invención comprende asimismo el uso de los materiales de separación según la invención para la separación de biopolímeros a partir de medios líquidos, en particular para la separación de proteínas a partir de medios líquidos o para la separación de anticuerpos a partir de medios líquidos. La separación resulta especialmente selectiva cuando el biopolímero interactúa con los grupos iónicos y, dado el caso, hidrófobos del polímero de injerto unido de forma covalente a la superficie del material de soporte. En este caso, el biopolímero se adsorbe interactuando tanto con la parte cargada como con la parte hidrófoba del polímero de injerto. La liberación siguiente del biopolímero adsorbido y separado del líquido se puede efectuar volviendo a desorber el biopolímero unido al material de separación mediante la interacción con los grupos iónicos y, dado el caso, hidrófobos

25 a) por aumento de la fuerza iónica y/o

b) por modificación del pH

de la solución

y/o

c) mediante un eluyente adecuado con una polaridad distinta a la del tampón de adsorción.

30 Por consiguiente, la invención descrita a continuación se refiere a la preparación de copolímeros de injerto sobre superficies con contenido en grupos hidroxilo de partículas porosas o de elementos moldeados adecuados correspondientes, que se caracterizan porque los polímeros de injerto se componen de dos o varias unidades repetitivas, llevando al menos una de las unidades una carga negativa y estando al menos una unidad enlazada con un grupo hidrófobo, y porque los polímeros de injerto pueden unirse por interacción iónica a sustancias cargadas, en especial a sustancias cargadas que se encuentran en cultivos celulares y en sobrenadantes de cultivos celulares.

40 Se conoce el uso de polímeros de injerto flexibles unidos a la superficie del soporte, los denominados "tentáculos", como grupos intercambiadores de iones. Así, en el intercambiador de cationes comercial Fractogel[®] EMD SO₃⁻ (M), el polímero de injerto se compone únicamente de una unidad repetitiva con grupos ácido sulfónico. Asimismo, el intercambiador de cationes Fractogel[®] EMD COO⁻ (M) sólo consta de unidades hidrófilas repetitivas. Estos intercambiadores de cationes muestran una capacidad de unión reducida para, por ejemplo, inmunoglobulinas (IgG) cuando la IgG se encuentra en una solución con una conductancia superior a 10 mS/cm, por ejemplo en una solución que contiene cloruro sódico 150 mM.

45 En las patentes EP 0 337 144 o US 5,453,186 no hay información acerca de las combinaciones de monómeros que son preferibles para la síntesis de un intercambiador de iones tolerante a sal. Sólo los ensayos propios dirigidos a la preparación de diferentes polímeros de injerto mostraron que la combinación de monómeros hidrófobos y de carga negativa es especialmente adecuada para el uso previsto. En la serie de ensayos relativos al injerto se usaron con preferencia acrilamidas funcionalizadas y ácido acrílico, como se exponen, por ejemplo, en la tabla 1, puesto que

los polímeros formados a partir de ellos son estables a la hidrólisis en condiciones alcalinas. Para los estudios los materiales se sometieron a un tratamiento de varias horas con sosa cáustica de 0,1 M a 1,0 M. Estudios más amplios de las propiedades en soluciones acuosas han mostrado que las nuevas estructuras superficiales obtenidas poseen muy buenas propiedades de hinchamiento pese a sus propiedades hidrófobas. Esto se debe obviamente a que las poli(acrilamidas) obtenidas pueden formar, como se sabe por la bibliografía (W. Shi y col., J. Chromatography A, 2001, 924, 123-135), enlaces de tipo puente de hidrógeno en soluciones acuosas.

Para la preparación de los materiales de separación según la invención se puede usar un soporte cromatográfico hidrófilo, como, por ejemplo, Fractogel TSK HW65 (S) o (M), que es idéntico a Toyopearl HW-65 (S) y (M) disponible en el mercado. Este soporte se modifica con copolímeros de injerto. Los copolímeros de injerto unidos al soporte cromatográfico son accesibles mediante dos rutas de preparación diferentes:

a) En la polimerización por injerto de una sola etapa la incorporación de todos los grupos funcionales en la superficie del soporte cromatográfico se realiza mediante un solo paso de polimerización por injerto

o

b) en un procedimiento de dos etapas se realiza primero un injerto mediante elementos hidrófilos adecuados y después la incorporación de los grupos hidrófobos mediante una reacción polimérica análoga en el polímero de injerto.

Para la preparación de los materiales según la invención también se pueden usar otros soportes cromatográficos. Sin embargo, la condición previa para ello es que el material usado presente grupos reactivos, especialmente grupos OH, accesibles a la reacción de polimerización por injerto. Así, por ejemplo, también se pueden preparar materiales de soporte adecuados a partir de polímeros orgánicos. Tales polímeros orgánicos pueden ser polisacáridos, como agarosa, dextranos, almidón, celulosa, etc., o polímeros sintéticos, como poli(acrilamidas), poli(metacrilamidas), poli(acrilatos), poli(metacrilatos), poli(éteres alquilalílicos) sustituidos hidrófilamente, poli(éteres alquilvinílicos) sustituidos hidrófilamente, poli(alcoholes vinílicos), poli(estirenos) y copolímeros de los monómeros correspondientes. Estos polímeros orgánicos preferentemente también se pueden usar en forma de una red hidrófila entrecruzada. Entre ellos se encuentran también polímeros de estireno y divinilbenceno, que, al igual que otros polímeros hidrófobos, se pueden usar preferentemente en una forma hidrófilizada.

De forma alternativa se pueden usar como soportes materiales inorgánicos, tales como sílice, óxido de circonio, dióxido de titanio, óxido de aluminio, etc. Igualmente se pueden usar materiales compuestos, es decir, se pueden obtener, por ejemplo, materiales de separación según la invención por derivatización de la superficie de, por ejemplo, partículas o elementos moldeados inorgánicos que se derivatizan según la invención. Un ejemplo de ello son partículas que se pueden magnetizar introduciendo por polimerización partículas magnetizables o mismamente un núcleo magnetizable.

No obstante, preferentemente se usan materiales de soporte hidrófilos que son estables a la hidrólisis o que son difíciles de hidrolizar, pues los materiales según la invención tienen que soportar una limpieza o regeneración alcalina a $\text{pH} \geq 13$ durante un tiempo de aplicación más prolongado. Los soportes pueden llevar ya ligandos de bajo peso molecular. Los ligandos pueden llevar uno o varios grupos cargados, grupos hidrófobos o grupos que puedan formar enlaces de tipo puente de hidrógeno. Se prefieren los ligandos con grupos de carga negativa.

Los materiales de soporte también pueden componerse de partículas de forma irregular o esféricas cuyo tamaño de partícula puede encontrarse entre 2 y 1.000 μm . Se prefieren tamaños de partícula de 3 a 300 μm .

Los materiales de soporte pueden estar presentes, en particular, en forma de partículas no porosas o, preferentemente, porosas. Los tamaños de poro pueden encontrarse entre 2 y 300 nm. Se prefieren tamaños de poro de 5 a 200 nm.

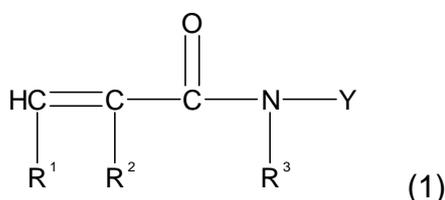
Asimismo, los materiales de soporte también pueden estar presentes en forma de membranas, fibras, fibras huecas, revestimientos o de elementos moldeados monolíticos. Los elementos moldeados monolíticos son elementos tridimensionales, por ejemplo de forma cilíndrica.

La figura 1 muestra esquemáticamente ambas variantes de preparación antes mencionadas. En detalle, esta figura muestra lo siguiente:

El monómero 4, que contiene un grupo aniónico, y el monómero hidrófobo 5 se pueden injertar directamente en forma de mezcla sobre la superficie del soporte hidrófilo 1, generándose la superficie químicamente modificada 3 con grupos aniónicos e hidrófobos. Si el monómero 4 contiene grupos carboxilo, se puede generar primero la superficie aniónica hidrófila 2, que a continuación se convierte en 3 mediante una modificación hidrófoba con, por

ejemplo, una arilalquilamina y una carbodiimida como reactivo de acoplamiento. El monómero 4 puede ser una mezcla de monómeros hidrófilos y el monómero 5, una mezcla de monómeros hidrófobos y neutros.

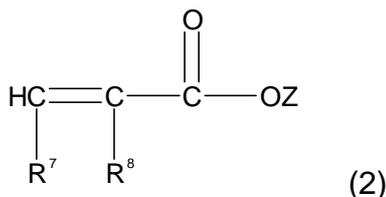
Para la polimerización por injerto de una sola etapa se usa al menos un monómero de carga negativa que presenta, por ejemplo, grupos ácido sulfónico o carboxilo. Los monómeros adecuados con grupos ácido sulfónico son, por ejemplo, ácido vinilsulfónico, ácido estirenosulfónico, ácido alilsulfónico, ácido vinyltoluenosulfónico, acrilatos de fórmula 2 con $Z = R^4-SO_3M$, en la que R^7 y R^8 pueden presentar independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, carboxilo o carboximetilo y en la que R^4 puede ser un grupo alquileo de cadena lineal con 1 a 8 átomos de C, como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado con 1 a 8 átomos de C, como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxilo. R^4 también puede tener el significado de un grupo arileno con hasta 10 átomos de C, como, por ejemplo, fenileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces, preferentemente una o dos veces, en especial una vez, con grupos alquilo con 1 a 4 átomos de C, grupos alcoxi o carboxilo. R^4 también puede constar de una cadena formada por un grupo alquileo y un grupo arileno o por un grupo arileno y un grupo alquileo. M es un átomo de hidrógeno o un catión metálico, como sodio o potasio, o un catión amonio. M se selecciona de manera que el monómero sea hidrosoluble. A modo de ejemplo son de mencionar los acrilatos de sulfoalquilo, como acrilato de 3-sulfopropilo o acrilato de 2-sulfoetilo, y los metacrilatos de sulfoalquilo, como metacrilato de 3-sulfopropilo o metacrilato de 2-sulfoetilo. Preferentemente se usan las acrilamidas de fórmula 1 con $R^3 = R^4-SO_3M$, en la que R^1 , R^2 e Y pueden presentar independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, R^1 y R^2 pueden ser también independientemente entre sí carboxilo o carboximetilo, R^3 también puede ser R^4-SO_3M , en la que R^4 puede ser un grupo alquileo de cadena lineal con 1 a 8 átomos de C, como por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado con 1 a 8 átomos de C, como por ejemplo, isopropileno o isobutileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxilo. R^4 también puede tener el significado de un grupo arileno con hasta 10 átomos de C, como, por ejemplo, fenileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces, preferentemente una o dos veces, en especial una vez, con grupos alquilo con 1 a 4 átomos de C, grupos alcoxi o carboxilo. R^4 también puede constar de una cadena formada por un grupo alquileo y un grupo arileno o por un grupo arileno y un grupo alquileo. M es un átomo de hidrógeno o un catión metálico, como sodio o potasio, o un catión amonio. M se selecciona de manera que el monómero sea hidrosoluble. Como acrilamidas adecuadas se mencionan a modo de ejemplo ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) y ácido 2-acrilamidoetanosulfónico.



Los monómeros adecuados con grupos carboxilo pueden ser, por ejemplo, ácido cinámico o acrilatos de fórmula 2 con $Z = R^5-COOM$, en la que R^1 y R^2 pueden presentar independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, carboxilo o carboximetilo, y en la que R^5 puede ser un grupo alquileo de cadena lineal con 1 a 8 átomos de C, como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado con 1 a 8 átomos de C, como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxilo. R^5 también puede tener el significado de un grupo arileno con hasta 10 átomos de C, como por ejemplo, fenileno.

Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces, preferentemente una o dos veces, en especial una vez, con grupos alquilo con 1 a 4 átomos de C, grupos alcoxi o carboxilo. R^5 también puede constar de una cadena formada por un grupo alquileo y un grupo arileno o por un grupo arileno y un grupo alquileo. M es un átomo de hidrógeno o un catión metálico, como sodio o potasio, o un catión amonio. M se selecciona de manera que el monómero sea hidrosoluble. A modo de ejemplo se mencionan los acrilatos de carboxialquilo, como acrilato de carboxietilo, y los metacrilatos de carboxialquilo. Preferentemente se usan las acrilamidas de fórmula 1 con $R^3 = R^5-COOM$, en la que R^1 , R^2 e Y pueden presentar independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, R^1 y R^2 pueden ser también independientemente entre sí carboxilo o carboximetilo, R^3 también puede ser R^5-COOM , en la que R^5 puede ser un grupo alquileo de cadena lineal con 1 a 8 átomos de C, como, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o hexileno, o un grupo alquileo ramificado con 1 a 8 átomos de C, como, por ejemplo, isopropileno o isobutileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces con grupos alcoxi o carboxilo. R^5 también puede tener el significado de un grupo arileno con hasta 10 átomos de C, como, por ejemplo, fenileno. Dado el caso, el grupo alquileo puede estar sustituido una o varias veces, preferentemente una o dos veces, en especial una vez, con grupos alquilo con 1 a 4 átomos de C, grupos fenilo, fenilmetilo, alcoxi o carboxilo. R^5 también puede constar de una

cadena formada por un grupo alquileo y un grupo arileno o por un grupo arileno y un grupo alquileo. M es un átomo de hidrógeno o un catión metálico, como sodio o potasio, o un catión amonio. M se selecciona de manera que el monómero sea hidrosoluble. Como acrilamida adecuada es de mencionar a modo de ejemplo el ácido acrilóil-gamma-aminobutírico. Con especial preferencia se usan ácidos carboxílicos insaturados de fórmula 2 con Z = M, en la que R⁷ y R⁸ pueden tener independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, carboxilo o carboximetilo. M es un átomo de hidrógeno o un catión metálico, como sodio o potasio, o un catión amonio. M se selecciona de manera que el monómero sea hidrosoluble. A modo de ejemplo son de mencionar ácido maleico, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido mesacónico o ácido fumárico. Entre ellos se prefieren especialmente los monómeros de fórmula 2 con Z = M, en la que R⁷ significa hidrógeno y R⁸ hidrógeno o alquilo con hasta 3 átomos de C. A modo de ejemplo se menciona ácido acrílico (AA), ácido metacrílico o ácido etacrílico.



Como componente adicional para la polimerización por injerto de una sola etapa se necesita al menos un monómero hidrófobo que posea una notable proporción hidrófoba en la molécula. Por lo tanto, los monómeros hidrófobos adecuados poseen al menos un grupo alquilo o arilo u otro grupo que dé lugar a las propiedades hidrófobas de la molécula. Se prefieren los monómeros cuyas propiedades hidrófobas son conferidas por grupos alquilo con un número adecuado de átomos de carbono o por grupos arilo. Como monómeros hidrófobos se usan preferentemente monómeros que presentan grupos alquilo o arilo. Los monómeros hidrófobos adecuados para el uso según la invención son, por ejemplo, acrilatos de fórmula (2) en la que R⁷ tiene el significado de hidrógeno, R⁸ significa hidrógeno o metilo y Z significa alquilo de cadena lineal o ramificado con 4 a 18 átomos de C, arilo, R⁶-arilo o R⁴-CONHX, donde X significa alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 8 átomos de C, arilo, R⁶-arilo y R⁶ significa alquileo de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C, mencionándose a modo de ejemplo acrilato de butilo y metacrilato de butilo. Se prefieren las acrilamidas de fórmula general 1 en la que R¹ y R² tienen independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, y en la que Y y/o R³ tienen independientemente entre sí el significado de alquilo, donde Y y R³ llevan juntos al menos 6 átomos de C, preferentemente 6 a 18 átomos de carbono, y los grupos metileno pueden estar sustituidos con O, tienen arilo, alquilarilo, arilalquilo, pudiendo estar sustituido el grupo alquilo y/o arilo una o varias veces, preferentemente una o dos veces, en especial una vez, con un resto alcoxi, ciano, carboxilo, acetoxi o acetamino. Y y/o R³ significan entonces independientemente entre sí y preferentemente metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, 2-, 3- o 4-oxapentilo, 2-, 3-, 4- o 5-oxahexilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-oxaheptilo, 3-butoxipropilo, isopropilo, 3-butilo, isobutilo, 2-metilbutilo, isopentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-oxa-3-metilbutilo, 2-metil-3-oxahexilo. Preferentemente, Y y/o R³ también pueden tener independientemente entre sí el significado de un grupo fenilo que está sustituido preferentemente una vez con ciano, cianoalquilo, alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, preferentemente en la posición p. Y y/o R³ representan independientemente entre sí y preferentemente un grupo feniloxialquilo, tal como fenoxietilo, o un grupo fenilalquilo, representando Y y/o R³ con especial preferencia independientemente entre sí bencilo, feniletilo, fenilpropilo. Los grupos alquilo pueden llevar grupos oxo. Como monómeros hidrófobos se prefieren en este caso especialmente acrilamidas de fórmula 1 en la que R¹ y R² tienen independientemente entre sí los significados de hidrógeno o alquilo con hasta 6 átomos de C, preferentemente hidrógeno o metilo, en la que Y tiene el significado de hidrógeno y R³ tiene los significados de alquilo, donde R³ lleva al menos 6 átomos de C, preferentemente 6 a 18 átomos de C, y los grupos metileno pueden estar sustituidos con O, tiene arilo, alquilarilo, arilalquilo, pudiendo estar sustituido un grupo alquilo y/o arilo una o varias veces, preferentemente una o dos veces, en especial una vez, con un resto alcoxi, ciano, carboxilo, acetoxi o acetamino. R³ significa entonces preferentemente hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-oxaheptilo, 3-butoxipropilo, 2-metil-3-oxahexilo. Preferentemente, R³ también puede tener el significado de un grupo fenilo que está sustituido preferentemente una vez con ciano, alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, preferentemente en la posición p. R³ representa preferentemente un grupo feniloxialquilo, tal como fenoxietilo, o un grupo fenilalquilo, representando R³ con especial preferencia bencilo, feniletilo, fenilpropilo. Los grupos alquilo pueden llevar grupos oxo, como en 2-fenil-2-oxoetilo. A modo de ejemplo aquí se mencionan los monómeros acrilóilglicinalanina, acrilóilfenilalanina, bencilacrilamida, octilacrilamida.

En la polimerización por injerto de una sola etapa se pueden añadir opcionalmente monómeros neutros que, preferentemente, son hidrófilos. De este modo es posible mejorar el comportamiento de hinchamiento de los polímeros de injerto en medios acuosos sin aumentar la densidad de carga de los polímeros de injerto. Los monómeros neutros apropiados para este propósito son, por ejemplo, acrilatos de alquilo inferior, tales como acrilato de metilo, y metacrilatos de alquilo inferior, tales como metacrilato de metilo. Preferentemente se usan acrilamidas de fórmula general 1 con Y = R⁶ en la que R¹ y R² son independientemente entre sí hidrógeno o metilo y R³ y R⁶ significan independientemente entre sí hidrógeno o alquilo con hasta 4 átomos de C. R³ y/o R⁶ significan

entonces hidrógeno o alquilo inferior. El último tiene aquí preferentemente el significado de metilo, etilo, butilo, isopropilo, 3-butilo o isobutilo, así como, además, el significado de alcoialquilo con hasta 4 átomos de C, como, por ejemplo, metoxietilo o etoxietilo. A modo de ejemplo se mencionan aquí acrilamida (AAM), dimetilacrilamida, metacrilamida, isopropilacrilamida, metoxietilacrilamida y etoxietilacrilamida.

5 La reacción de polimerización por injerto propiamente dicha se puede iniciar con cerio(IV) sobre el soporte con contenido en grupos hidroxilo. Esta reacción transcurre normalmente en ácidos minerales diluidos, como por ejemplo, en ácido nítrico diluido, en los que los monómeros hidrófobos son poco solubles o insolubles. La reacción también se puede realizar en ácido sulfúrico o ácido clorhídrico diluido. No obstante, se prefiere trabajar en ácido nítrico diluido. El monómero hidrófobo se puede disolver e injertar mediante la adición de un solubilizador o un
10 codisolvente, preferentemente dioxano. Como codisolvente también se pueden usar acetona, dimetilacetamida, dimetilformamida, tetrahidrofurano. No obstante, con especial preferencia se trabaja con dioxano porque éste produce el mayor rendimiento de injerto y la menor cantidad de productos secundarios en la reacción iniciada con cerio(IV). Adicionalmente cabe señalar que también se pueden aplicar otros procedimientos para la polimerización por injerto. Se prefieren los métodos en los que sólo se generan pocos productos secundarios, tales como polímero
15 no unido covalentemente, que se tienen que separar. Resultan especialmente interesantes los procedimientos con polimerización radicalaria controlada, como, por ejemplo, el método de la polimerización radicalaria por transferencia atómica (ATRP). En un primer paso se une un grupo iniciador de forma covalente y en la densidad deseada a la superficie del soporte. Un grupo iniciador puede ser, por ejemplo, un halogenuro unido a través de una función éster, como en un éster del ácido 2-bromo-2-metilpropiónico. La polimerización por injerto se realiza en una
20 segunda etapa en presencia de sales de cobre(I).

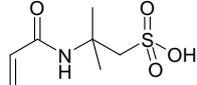
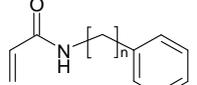
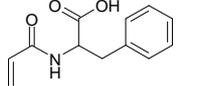
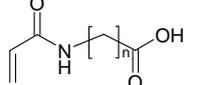
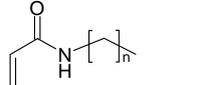
Si el monómero hidrófobo no está completamente disuelto en la fase líquida, lo que se manifiesta, por ejemplo, en un enturbiamiento de la solución de reacción o en gotas de una segunda fase líquida, se produce un injerto por reacción de ambos monómeros, pero el producto obtenido se comporta más bien como un intercambiador de iones normal. En este caso, pues, las propiedades vienen determinadas principalmente por el elemento monomérico
25 cargado. Es decir, que el copolímero de injerto se debe preparar de tal manera, que las funciones cargadas e hidrófobas del polímero de injerto puedan cooperar unas con otras en solución. Para la reacción se intenta, por tanto, usar el ácido diluido y el codisolvente en una relación favorable para la reacción especial. Para la realización de la polimerización por injerto el ácido habitualmente se usa en una solución acuosa a una concentración comprendida en el intervalo de 1 a 0,00001 mol/l, preferentemente de 0,1 a 0,001 mol/l. Con especial preferencia se
30 trabaja con ácido nítrico diluido, que se usa a una concentración comprendida en el intervalo de 0,05 a 0,005 mol/l. Para la realización de la reacción la relación volumétrica entre el ácido diluido y el codisolvente adecuado puede encontrarse en el intervalo de 30: 70 a 98: 2. Preferentemente se trabaja en una relación volumétrica de 40: 60 a 90: 10. Se obtienen capacidades de unión especialmente buenas cuando el ácido diluido usado y el codisolvente se encuentran en una relación volumétrica comprendida en el intervalo de 45: 55 a 75: 25. Esto es especialmente
35 válido cuando se trabaja con un monómero con grupos ácido sulfónico en ácido nítrico diluido y dioxano como codisolvente.

Si, por el contrario, se añade demasiado codisolvente, el rendimiento de polímero de injerto disminuye. Como consecuencia, sólo se puede unir poca proteína al material de separación derivatizado obtenido. El rendimiento del polímero de injerto sobre el material de soporte se puede incrementar dosificando una solución adicional de un
40 monómero hidrófobo en presencia de un codisolvente a una polimerización por injerto con monómero cargado ya iniciada.

En otras series de ensayos se ha descubierto que se obtienen materiales de separación derivatizados mediante polimerización por injerto con propiedades mejoradas según la invención si se polimerizan por injerto materiales de soporte con los monómeros indicados en la tabla siguiente.

45

Tabla 1: Monómeros para la copolimerización por injerto.

| Nombre del monómero | Abreviatura | Estructura |
|--|-------------|--|
| Ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico | AMPS |  |
| Ácido acrílico | AA |  |
| N-Arilaalquilacrilamidas (p.ej. bencilacrilamida, acriloilfenil-alanina) | ArAAM |   |
| N-Carboxialquilacril-amidas (p.ej. ácido acriloil-gamma-aminobutírico) | CAAAM |  |
| N-Alquilacrilamidas (p.ej. butilacrilamida) | AlquilAAM |  |

5 A modo de ejemplo se prepararon, por combinación de dos o tres monómeros, los siguientes copolímeros de injerto unidos a soporte sobre soportes adecuados, como por ejemplo, Fractogel TSK HW65 (M), que es idéntico a Toyopearl HW-65 (M) disponible en el mercado (fabricante: Tosoh, Japón, y como se describe en el documento EP 0 006 199), y se estudiaron respecto a sus propiedades, especialmente respecto a su capacidad de unión:

poli(AMPS, AA, ArAAM) con bencilacrilamida

poli(AMPS, ArAAM) con bencilacrilamida

poli(AA, ArAAM) con bencilacrilamida, acriloilfenilalanina

10 poli(AMPS, ArAAM, AAM) con bencilacrilamida

poli(AA, ArAAM, AAM) con bencilacrilamida

poli(CAAAM, ArAAM) con carboxipropilacrilamida y bencilacrilamida

poli(AMPS, alquilAAM) con butilacrilamida

15 Se ha descubierto que aunque las alquilacrilamidas (alquilAAM) inferiores, tales como la butilacrilamida, se pueden copolimerizar con monómeros que presentan grupos ácido sulfónico, como, por ejemplo, AMPS, los materiales de soporte derivatizados muestran solamente capacidades de unión frente a inmunoglobulinas (IgG) en el intervalo de los materiales de separación conocidos, como por ejemplo, el polímero de injerto formado por AMPS puro.

En este contexto, se ha descubierto que los grupos alquilo superior, como por ejemplo, los grupos octilo, contribuyen positivamente a la unión de proteínas. Sorprendentemente, sin embargo, en el marco de los estudios ha resultado especialmente ventajoso mezclar la mezcla de reacción durante la preparación de los intercambiadores de iones tolerantes a sal con monómeros aromáticos (por ejemplo, ArAAm). Estos monómeros permiten incorporar grupos hidrófobos en la modificación iónica superficial. Dependiendo de la cantidad añadida de monómeros aromáticos se intensifica el carácter hidrófobo de los materiales obtenidos y, con ello, se altera la capacidad de unión, de manera que se puede influir en la capacidad de unión en función de la fracción molar de los grupos hidrófobos presentes en el polímero de injerto. También se ha observado que, dependiendo de la combinación de los monómeros seleccionados y de las condiciones de polimerización, la relación de los monómeros entre sí se tiene que escoger de forma diferente para lograr capacidades de unión elevadas.

Si los polímeros de injerto de poli(acrilamida) presentan exclusivamente grupos ácido sulfónico como grupos cargados, se obtienen propiedades especialmente ventajosas cuando la proporción de los grupos cargados es de 35 a 70 mol% en relación con la cantidad total del polímero de injerto. En ese caso, un material de separación con 100 mol% de grupos cargados se corresponde con un intercambiador de cationes puro sin grupos hidrófobos.

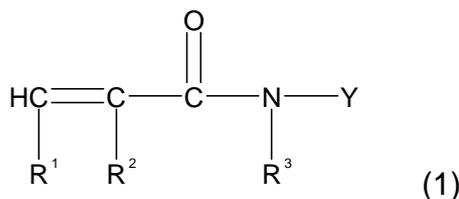
La situación es diferente cuando el polímero de injerto, además de otros grupos cargados, contiene grupos carboxilo, como por ejemplo, en un copolímero con ácido acrílico, o sólo están presentes grupos cargados de este tipo. En estos casos se obtienen capacidades de unión mejoradas cuando la proporción de grupos cargados asciende a entre 60 y 98 mol% respecto a la cantidad total del polímero de injerto. Se han encontrado propiedades especialmente ventajosas en aquellos materiales en los que la proporción de grupos cargados se encuentra en el intervalo de 70 a 95 mol%.

Para obtener polímeros de injerto con propiedades ventajosas, los monómeros cargados y los monómeros hidrófobos se mezclan en una relación tal, que la proporción del componente hidrófobo asciende a entre 1 y 90 mol% en relación con la cantidad total de monómeros, prefiriéndose una proporción comprendida en el intervalo de 3 a 70 mol% respecto a la cantidad total de monómeros. Cuando se usa AMPS, la proporción del componente hidrófobo se elige, en particular, de manera que se encuentre en el intervalo de 20 a 60 mol% respecto a la cantidad total de monómeros. Cuando se usa AA, se logran propiedades especialmente buenas si la proporción del componente hidrófobo se encuentra en el intervalo de 5 a 50 mol%. Para la preparación de los materiales de separación según la invención, los monómeros normalmente se añaden en exceso al material de soporte. Se usan entre 0,05 y 100 mol de monómeros totales por litro de material polimérico sedimentado, usándose con preferencia entre 0,15 y 25 mol/l.

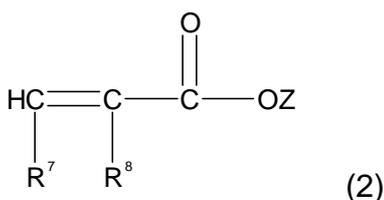
Por material de soporte sedimentado se entiende un material de soporte húmedo que se obtiene por sedimentación a partir de una suspensión y que carece de disolvente sobrenadante. El material de soporte correspondiente se almacena habitualmente en estado húmedo. Para el uso según la invención se aspira previamente el disolvente sobrenadante. A continuación, para la realización de la derivatización se suspende un volumen medido o una cantidad pesada (gel húmedo, filtrado por aspiración) en un volumen adecuado o en una cantidad adecuada de solución de monómeros y se somete a una polimerización por injerto. En el caso del material de soporte se puede tratar de un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo. Así pues, también puede ser un material polimérico orgánico.

La segunda variante de preparación, al ser un procedimiento de dos etapas, tiene el inconveniente de una etapa de reacción adicional, pero la polimerización por injerto no está limitada por la eficacia del codisolvente añadido. En un primer paso de polimerización por injerto se injertan preferentemente sólo monómeros hidrófilos que son solubles en el medio de reacción líquido. Al menos un monómero contiene grupos carboxilo. Después, en un segundo paso, el polímero de injerto se puede modificar de forma hidrófoba mediante una reacción polimérica análoga. Este paso se puede efectuar, por ejemplo, por acoplamiento de bencilamina con carbodiimida hidrosoluble a un polímero de injerto de poli(ácido acrílico), obteniéndose una poli(bencilacrilamida) injertada.

Como monómeros para el procedimiento de dos etapas se pueden usar los monómeros ya mencionados para la polimerización por injerto de una sola etapa. Los monómeros con un grupo carboxilo se pueden usar en una polimerización por injerto solos o también en mezcla con monómeros neutros hidrófobos y/o con monómeros con grupos ácido sulfónico. Preferentemente se usan mezclas con monómeros neutros y/o con monómeros con grupos ácido sulfónico. Se prefieren especialmente los monómeros hidrosolubles con un grupo carboxilo o mezclas de monómeros hidrosolubles con un grupo carboxilo con otros monómeros hidrosolubles. Así pues, se prefieren especialmente los siguientes monómeros hidrosolubles con un grupo carboxilo de fórmula general (1)



en la que R^1 , R^2 e Y significan independientemente entre sí H o CH_3 , R^3 tiene el significado de $\text{R}^4\text{-COOM}$, donde R^4 significa alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C, y M significa H, Na, K o NH_4 , o de fórmula general (2)



en la que R^7 y R^8 significan independientemente entre sí H o CH_3 , Z significa M o bien $\text{R}^4\text{-COOM}$, donde R^4 significa alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C, R^7 también puede significar COOM cuando Z es M y R^8 es H, y M significa H, Na, K o NH_4 . Otros monómeros hidrosolubles pueden ser los ácidos sulfónicos correspondientes de los monómeros hidrosolubles con un grupo carboxilo, en los que el grupo $\text{R}^4\text{-COOM}$ está reemplazado por $\text{R}^4\text{-SO}_3\text{M}$, o los monómeros neutros ya mencionados para la polimerización por injerto de una sola etapa. Ejemplos de monómeros hidrosolubles con un grupo carboxilo son ácido acrílico, carboxietilacrilamida, acrilato de carboxietilo, carboxietilmetacrilamida, carboximetilacrilamida, acrilato de carboximetilo, carboximetilmetacrilamida, carboxipropilacrilamida y carboxipropilmetacrilamida, ácido metacrílico y ácido maleico. Ejemplos de otros monómeros hidrosolubles son acrilamida, ácido 2-acrilamidoetanosulfónico, AMPS, isopropilacrilamida, acrilato de metilo, metacrilato de metilo, acrilato de 2-sulfoetilo, metacrilato de 2-sulfoetilo, acrilato de 3-sulfopropilo, metacrilato de 3-sulfopropilo.

En la reacción de acoplamiento de bencilamina a, por ejemplo, polímeros de injerto de poli(ácido acrilóil-gamma-aminobutírico) es posible transformar prácticamente todos los grupos carboxilo si la bencilamina se usa en un exceso de aproximadamente 4.000 mol% en relación con los grupos carboxilo unidos al soporte. Con un exceso del reactivo de acoplamiento EDC (hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) del 300 mol% en relación con los grupos carboxilo unidos al soporte se logra una transformación de aproximadamente el 90% de los grupos carboxilo presentes en grupos amida. El objetivo de la reacción según la invención, es, sin embargo, transformar solo una parte de los grupos carboxilo, para que queden suficientes grupos intercambiadores de iones en el polímero de injerto. Si en el ejemplo anterior se usa sólo un 60 mol% de EDC, sólo se transforma aproximadamente un 30% de los grupos carboxilo y la capacidad de unión del producto en presencia de sal es el doble de la del caso anterior.

El exceso del monómero que se ha de acoplar se elige en función de lo grande que deba ser la proporción deseada de grupos carboxilo transformados. Así, el exceso del monómero que se ha de acoplar puede encontrarse en el intervalo de 100 a 10.000 mol% en relación con los grupos carboxilo unidos al soporte, mientras que el reactivo de acoplamiento se usa en un exceso comprendido en el intervalo de 60 a 2.000 mol% en relación con los grupos carboxilo unidos al soporte. Naturalmente, la relación tanto del monómero que se ha de acoplar como del reactivo de acoplamiento se elige de tal manera, que se puedan transformar suficientes grupos carboxilo y se pueda preparar un material de separación que, después de realizar la segunda etapa de reacción, presente propiedades ventajosas o mejoradas y sea adecuado para la separación de las moléculas diana, como, por ejemplo, biopolímeros cargados, a partir de líquidos como, por ejemplo, sobrenadantes de cultivos celulares.

A altas densidades superficiales de, por ejemplo, poli(ácido acrílico) se transformó, en las condiciones elegidas y con un exceso de amina y un déficit de EDC en relación con los grupos carboxilo unidos al soporte, aproximadamente un 30% de los grupos carboxilo presentes. Con un gran exceso del reactivo de acoplamiento también es posible transformar una proporción mayor de grupos carboxilo. Sin embargo, a esta forma de proceder se opone un considerable incremento de los costes de la preparación en dos etapas cuando las transformaciones se realizan a escala industrial. Así, por motivos económicos, esta forma de proceder no constituye una alternativa real.

Bastante más económica resulta la preparación de un copolímero de injerto a partir de una mezcla de monómeros con grupos carboxilo o ácido sulfónico. A modo de ejemplo cabe mencionar aquí una mezcla de AMPS y AA como precursor, puesto que en este caso el polímero de injerto todavía presenta grupos intercambiadores de iones

debido a los grupos ácido sulfónico aun cuando, dado el caso, los grupos carboxilo se hayan transformado por completo. Como se ha descrito anteriormente, una transformación completa se puede lograr, especialmente a bajas densidades del polímero de injerto, mediante un exceso del reactivo de acoplamiento de al menos 300 mol% en relación con los grupos carboxilo unidos al soporte. Sin embargo, en este caso generalmente los grupos carboxilo
5 tampoco se pueden transformar siempre por completo a altas densidades del polímero de injerto. Así, se ha descubierto que a partir de un polímero de injerto compuesto por aproximadamente un 30 mol% de unidades de AMPS y un 70 mol% de ácido acrílico se obtiene, por acoplamiento de bencilamina, un polímero de injerto que, además de aproximadamente un 20 mol% de unidades de bencilacrilamida, todavía contiene un 50 mol% de unidades de ácido acrílico. Consta, pues, de tres elementos monoméricos, aunque según el plan de síntesis original, en el que se
10 esperaba una transformación completa usando entre 100 y 150 mol% de EDC, solo debían estar presentes dos elementos.

Para una reacción polimérica análoga en el polímero de injerto compuesto por AMPS y AA se usaron, por ejemplo, 3 mol de bencilamina por litro de material polimérico sedimentado. Como reactivo de acoplamiento se añadieron 0,2 mol/l de EDC, lo que equivale a aproximadamente el 100 mol% en relación con los grupos carboxilo unidos al
15 soporte.

Para obtener polímeros de injerto adecuados con grupos carboxilo para la modificación hidrófoba, generalmente se disuelve al menos un monómero con grupos carboxilo en agua y se mezcla con otros monómeros posiblemente presentes de tal manera, que la proporción del componente con grupos carboxilo ascienda a entre 1 y 100 mol% en relación con la cantidad total de monómeros, con preferencia entre 10 y 100 mol%. Los monómeros normalmente se añaden al material de soporte en exceso. Se usan entre 0,05 y 100 mol de monómeros totales por litro de material polimérico sedimentado, usándose con preferencia entre 0,15 y 25 mol/l. A una suspensión acuosa exenta de oxígeno se añade una solución, idealmente también exenta de oxígeno, de la sal de cerio(IV) en ácido mineral, preferentemente nitrato de amonio y cerio(IV) en ácido nítrico, bajo agitación a una temperatura de 5 a 95°C, preferentemente de 20 a 70°C, y a continuación se agita durante 0,5 a 72 horas, preferentemente durante 2 a 20
20 horas, a esta temperatura. Las concentraciones en la solución acuosa que se ajustan tras la adición de la solución de la sal de cerio(IV) se eligen de tal manera, que el pH se encuentre entre 0 y 5, preferentemente entre 1 y 3. La concentración de cerio(IV) se ajusta de tal manera, que ascienda a entre 0,00001 y 0,5 mol/l, preferentemente a entre 0,001 y 0,1 mol/l, en la solución de reacción.

En la tabla 2 se muestran ejemplos de aminas primarias que se han acoplado a los copolímeros de injerto unidos al soporte y formados por AMPS y AA (sobre Fractogel® TSK HW65 M). Además es posible acoplar varias aminas al material de soporte o usar mezclas de aminas para la reacción de acoplamiento. En la tabla 3 también se reflejan ejemplos correspondientes. Además, se pueden usar todas las aminas que conduzcan a las acrilamidas ya mencionadas como elementos monoméricos hidrófobos para la polimerización de injerto en una sola etapa. Es conocido para el especialista que para acoplar elementos de amina con grupos carboxilo se ha de seleccionar un método de acoplamiento alternativo de los polímeros de injerto, por ejemplo a través de los ésteres de hidroxisuccinimida, preparados con EDC.
30
35

Asimismo se ha descubierto que, al igual que los copolímeros de injerto con grupos aromáticos, que en parte ya se pueden preparar mediante una síntesis de una sola etapa, también los grupos alquilo, como, por ejemplo, los grupos octilo, mejoran en un polímero de injerto, junto con grupos ácido sulfónico y carboxilo, las propiedades de unión en comparación con los intercambiadores de cationes no modificados de forma hidrófoba.
40

Mediante la síntesis de dos etapas se pueden preparar de forma sencilla y partiendo, por ejemplo, de un precursor de poli(ácido acrílico) polímeros de injerto con diferentes proporciones hidrófobas pero con las mismas densidades de injerto. En la tabla 3, los resultados de los ejemplos reflejados en las filas 6 a 8 muestran una serie de este tipo con diferentes proporciones en mol% de grupos bencilo en el polímero de injerto. Mediante ensayos también se ha descubierto que existe una unión óptima con aproximadamente un 25 mol% de grupos bencilo en el polímero de injerto. La recuperación de una IgG policlonal es tanto mayor cuanto menor sea el contenido de grupos bencilo en el polímero de injerto. Mediante ensayos con anticuerpos monoclonales se ha mostrado que la recuperación también se encuentra en prácticamente el 100% con aproximadamente un 25 mol% de grupos bencilo en el polímero de injerto. La elución de proteínas monoclonales es más fácil de optimizar, puesto que, al contrario que las proteínas policlonales, se han de separar especies muy similares.
45
50

Para evaluar los materiales de separación generalmente se analiza la capacidad de unión estática de IgG humana policlonal (Gammanorm) en una solución de cloruro sódico 75 mM y 150 mM a un pH de 5 a 7. La conductancia de la concentración de sal 150 mM equivale a la del sobrenadante de un cultivo celular (con frecuencia de 10 a 15 mS/cm). La determinación de la capacidad de unión se realiza después de la elución de la IgG por aumento de la concentración de sal a aproximadamente NaCl 1 M.
55

La determinación de la capacidad de unión dinámica se efectúa igualmente en presencia de cloruro sódico 150 mM. Para ello se carga solución de IgG hasta obtener un pico no retenido del 10%. La elución se realiza aumentando la

concentración de sal a aproximadamente NaCl 1 M al pH del tampón de unión. La recuperación de IgG se puede mejorar aumentando simultáneamente la concentración de sal y el valor de pH.

Los ejemplos en la tabla 3 muestran que los materiales de separación con copolímeros de injerto alcanzan unas capacidades de unión dinámicas bastante más elevadas que los geles comparativos que no presentan proporciones hidrófobas en el polímero de injerto. Los copolímeros de injerto alcanzan altas capacidades de unión a pH 5,5. A este valor de pH el copolímero de injerto está cargado negativamente. La IgG, en cambio, lleva más cargas positivas que negativas (pH < pI). De este modo, la unión se produce principalmente por interacciones iónicas. Si las cargas positivas de una IgG policlonal se reducen a pH 6,5 por cambio de tampón y se aproximan a su pI, el valor del 10% para el pico no retenido se alcanza ya a cantidades muy pequeñas de IgG. Este comportamiento de unión lo muestran todos los copolímeros de injerto, independientemente de si su síntesis se ha realizado directamente mediante un solo paso de polimerización por injerto o mediante modificación hidrófoba de un polímero de injerto hidrófilo adecuado.

En resumen, se puede decir que los materiales de separación especialmente adecuados para la cromatografía de intercambio iónico a una conductancia como la que se presenta habitualmente en los sobrenadantes de cultivos celulares contienen un copolímero de injerto que se compone de al menos una unidad monomérica que lleva una carga negativa en forma de un ácido sulfónico o un ácido carboxílico y que contiene, además, grupos éster o amida y grupos alquilo y/o alquileo y, como máximo, un total de 8 átomos de C pero carece de grupos arilo, o que lleva una carga negativa en forma de un ácido sulfónico o un ácido carboxílico y que contiene, además, grupos alquilo y/o alquileo pero carece de grupos arilo, y al menos una unidad monomérica que lleva un grupo éster y, como grupo hidrófobo, un alquilo de cadena lineal o ramificado con 4 a 18 átomos de C o un grupo arilo, o que contiene al menos un grupo amida y, como grupos hidrófobos, alquilos de cadena lineal o ramificados con un total de 6 a 18 átomos de C o un grupo arilo. La relación entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo hidrófobo se encuentra preferentemente en el intervalo de 99:1 a 10:90.

Las proporciones hidrófobas en los polímeros de injerto permiten que se produzca una unión a una concentración de sal aumentada, puesto que en los intercambiadores de cationes puros las cargas son apantalladas por los iones de sal presentes, de manera que la interacción iónica es demasiado débil para enlazar proteínas a los materiales de separación. La interacción hidrófoba-hidrófoba adicional con las proteínas permite obtener una unión suficientemente fuerte.

Esta interacción hidrófoba probablemente también se produzca dentro o entre las cadenas del polímero de injerto y conduzca a uniones reversibles de estas cadenas (C. Tribet, Biochimie, 1998, 80, 461-473). Para la caracterización se analizó, por tanto, un copolímero de injerto modificado de forma hidrófoba y preparado mediante una síntesis de dos etapas sobre un soporte poroso y su precursor de poli(AMPS, AA) unido a Fractogel® TSK HW65 M por cromatografía de exclusión molecular (figura 2). Aunque ambos geles presentan la misma densidad de injerto, se ha descubierto que el sistema poroso del copolímero de injerto hidrófobo es más accesible en condiciones no enlazantes, en particular en presencia de cloruro sódico 1 M. Así pues, en condiciones de alta salinidad, el polímero de injerto más hidrófobo se dispone más compacto sobre la superficie del soporte poroso. Aún así, el sistema poroso con el polímero de injerto más hidrófobo también muestra coeficientes de reparto KD menores a medida que disminuye la concentración de cloruro sódico. Por lo tanto, esta estructura superficial está muy hinchada a concentraciones de cloruro sódico inferiores a 1 M y es muy accesible para los componentes disueltos en el tampón acuoso.

Los materiales según la invención se pueden usar para la separación de biopolímeros cargados. Preferentemente se usan para la separación de proteínas, en particular de anticuerpos, que pueden ser policlonales o monoclonales, de fragmentos de anticuerpos o de proteínas de fusión que contengan una porción de anticuerpo. No obstante, también se pueden separar otros biopolímeros, como, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, virus, células eucariotas o procariotas. Mediante la separación se pueden purificar, aislar o eliminar los biopolímeros.

Las moléculas diana se separan de al menos una o varias otras sustancias a partir de una muestra, donde la muestra que contiene la molécula diana está disuelta en un líquido que se pone en contacto con el material según la invención. Los tiempos de contacto se encuentran habitualmente en el intervalo de 30 segundos a 24 horas. Resulta ventajoso trabajar según los principios de la cromatografía líquida, pasando el líquido a través de una columna cromatográfica que contiene el material de separación según la invención. El líquido puede atravesar la columna solo por su fuerza de gravedad o se puede bombear a través de ella con una bomba. Un método alternativo consiste en la cromatografía discontinua. En este caso, el material de separación se mezcla con el líquido por agitación o sacudimiento el tiempo necesario para que las moléculas diana o los biopolímeros se puedan unir al material de separación. Igualmente, se puede trabajar según los principios del lecho fluidizado cromatográfico, introduciendo el líquido que se ha de separar en, por ejemplo, una suspensión que contiene el material de separación y seleccionándose el material de separación de tal manera, que por su alta densidad y/o un núcleo magnético sea adecuado para la separación deseada.

La molécula diana se une habitualmente al material según la invención. A continuación, el material de separación se puede lavar con un tampón de lavado, que preferentemente presenta la misma fuerza iónica y el mismo pH que el líquido en el que la molécula diana se pone en contacto con el material de separación. El tampón de lavado elimina todas las sustancias que no se unen al material de separación. Se pueden realizar pasos de lavado
 5 adicionales con tampones adecuados. La desorción de la molécula diana unida se efectúa aumentando la fuerza iónica en el eluyente. También es posible realizar una elución alterando el valor de pH del eluyente, preferentemente por aumento del valor de pH, usando un eluyente con una polaridad distinta a la del tampón de adsorción o, dado el caso, usando un agente tensioactivo disuelto en el eluyente, preferentemente en combinación con un aumento de la fuerza iónica. La molécula diana se puede obtener purificada y concentrada en el eluyente.
 10 Después de la desorción la molécula diana presenta normalmente una pureza del 70% al 99%, preferentemente del 85% al 99%, con especial preferencia del 90% al 99%.

También existe la posibilidad de que la molécula diana permanezca en el líquido mientras que otras sustancias concomitantes se unen al material de separación. La molécula diana se obtiene entonces directamente recogiendo el eluato a medida que atraviesa la columna. El especialista sabe cómo debe adaptar las condiciones,
 15 especialmente el pH y/o la conductividad, para enlazar un biopolímero concreto a un material de soporte o si resulta ventajoso para el objetivo de la purificación no enlazar la molécula diana.

Los biopolímeros proceden predominante pero no exclusivamente de fuentes líquidas o están contenidos en ellas, como, por ejemplo, en líquidos corporales como, por ejemplo, sangre, sueros, saliva u orina, extractos tisulares, leche, suero de la leche, extractos vegetales, extractos celulares, cultivos celulares, caldos de fermentación,
 20 extractos animales. Los anticuerpos pueden proceder, por ejemplo, de células mamíferas de roedores o de hibridomas.

El material de separación según la invención se puede usar en un primer paso de purificación cromatográfica (paso de captura) de un proceso de procesamiento de un biopolímero. Normalmente resulta ventajoso filtrar las soluciones
 25 brutas cargadas de sólidos, como, por ejemplo, suspensiones celulares u homogeneizados celulares, antes del paso de captura para eliminar impurezas gruesas tales como células enteras o fragmentos celulares. Como se ha descrito anteriormente, una ventaja de la presente invención reside en que no se tiene que adaptar la fuerza iónica del sobrenadante del cultivo celular. Si todavía no se ha alcanzado la pureza deseada del biopolímero, generalmente al paso de captura le siguen otras etapas de purificación cromatográfica con otros materiales de separación capaces de eliminar las diferentes impurezas restantes. Puesto que el orden en el que se aplican los
 30 materiales de separación puede influir en el rendimiento total del proceso, en determinados casos puede ser ventajoso usar el material de separación según la invención en la segunda, tercera o cuarta etapa de purificación.

La invención se refiere asimismo a un kit para la purificación o la separación de biopolímeros de una o varias otras sustancias a partir de un líquido. El kit consta de una columna cromatográfica rellena del material de separación
 35 según la invención, uno o varios tampones y un prospecto con instrucciones escritas. El líquido se ajusta con un tampón a un pH de, por ejemplo, 5,5 y se pone en contacto con la columna cromatográfica. Primero se lava la columna con un tampón de lavado, obteniéndose una fracción con los componentes que no se unen, después se desorben los biopolímeros con un tampón de elución con una fuerza iónica mayor, por ejemplo con una solución de NaCl 1 M, y se obtienen en una segunda fracción.

La presente descripción permite a los especialistas usar la invención en todo su alcance. Por eso, incluso sin otras explicaciones, se asume que un especialista puede utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio.
 40

En el caso de posibles faltas de claridad, es evidente que se deben consultar las publicaciones y la bibliografía de patentes citadas. Por consiguiente, estos documentos se consideran una parte de la publicación de la presente descripción.

Para una mejor comprensión y para ilustrar la invención, a continuación se presentan ejemplos que se encuentran dentro del alcance de protección de la presente invención. Estos ejemplos también sirven para ilustrar posibles
 45 variantes. Sin embargo, a causa de la validez general del principio de la invención descrito, los ejemplos no son apropiados para reducir el alcance de protección de la presente solicitud únicamente a éstos.

Además, para los especialistas es evidente que, tanto en los ejemplos dados como en el resto de descripción, las cantidades de componentes presentes en las composiciones siempre suman como máximo 100% en peso o en mol
 50 respecto a la composición total y no pueden superar esta cantidad, incluso si se pudieran obtener valores más elevados a partir de los intervalos de porcentaje indicados. Si no se indica lo contrario, los datos en % son en % en peso o en mol, a excepción de las proporciones, que se expresan en volumen, como, por ejemplo, el eluyente, para cuya preparación se usan mezclas de disolventes en relaciones volumétricas determinadas.

Las temperaturas indicadas en los ejemplos y en la descripción, así como en las reivindicaciones, se indican siempre en °C.
 55

Ejemplos

Ejemplo 1:

Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y bencilacrilamida (preparación 05SW136)

5 Realización:

En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se prepara una suspensión de 70 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada), una solución de 32,3 g de bencilacrilamida en 250 ml de dioxano y una solución de 41,5 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y 25 g de sosa cáustica al 32% en 50 ml de agua desionizada. Se lleva a un volumen de 475 ml con agua desionizada y se ajusta a pH 4 con sosa cáustica al 32% o ácido nítrico al 65%.

En un embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 13,7 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 1,2 g de ácido nítrico al 65% en 25 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 70°C.

15 La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 70°C. La suspensión se agita durante 17 horas a 70°C bajo una ligera corriente de nitrógeno. Después, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

8x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

3x agua desionizada

20 2x sosa cáustica 1 M

4x agua desionizada

5x acetona

5x agua

25 El gel se suspende en 200 ml de agua desionizada y se ajusta a pH 7 con ácido clorhídrico al 25%. El almacenamiento se efectúa en etanol al 20% a temperatura ambiente.

Ejemplo 2:

Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido acrílico y bencilacrilamida (preparación 06SW297)

Realización:

30 En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se prepara una suspensión de 77,9 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada), una solución de 1,34 g de bencilacrilamida en 14,5 ml de dioxano y una solución de 18,0 g de ácido acrílico en 50 ml de agua desionizada. Se ajusta a pH 4 con sosa cáustica al 32% y se lleva a un volumen de 375 ml con agua desionizada.

35 En un embudo de goteo con compensación de presión se disuelven otros 6,72 g de bencilacrilamida en 73 ml de dioxano y se lleva a un volumen de 100 ml con agua desionizada.

40 En un segundo embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 9,6 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 1,2 g de ácido nítrico al 65% en 25 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 55°C.

La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 55°C. La suspensión se agita a 55°C bajo una ligera corriente de nitrógeno y cada 30 min se añaden, respectivamente, 20 ml

de la solución de bencilacrilamida en dioxano. En total, la suspensión de reacción se sigue agitando durante 17 horas a 55°C después de añadir el iniciador. Después, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

5 2x ácido sulfúrico 0,5 M/ácido ascórbico 0,2 M - acetona 1:1 (V/V)

8x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

3x agua desionizada

2x sosa cáustica 1M.

10 El gel se suspende en 200 ml de sosa cáustica 1 M y se agita durante 20 horas, y después de filtrarlo por succión, el gel se sigue lavando sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

2x sosa cáustica 1 M

5x agua desionizada

El gel se suspende en 200 ml de agua desionizada y se ajusta a pH 7 con ácido clorhídrico al 25%. El almacenamiento se efectúa en etanol al 20% a temperatura ambiente.

15 **Ejemplo 3:**

Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido acrílico y bencilacrilamida (preparación 06SW085)

Realización:

20 En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se prepara una suspensión de 69 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada), una solución de 32,2 g de bencilacrilamida en 250 ml de dioxano, una solución de 25,9 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y 15,6 g de sosa cáustica al 32% en 50 ml de agua desionizada y 9,0 g de ácido acrílico. Se lleva a un volumen de 475 ml con agua desionizada y se ajusta a pH 4 con sosa cáustica al 32% o ácido nítrico al 65%.

25 En un embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 13,7 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 1,2 g de ácido nítrico al 65% en 25 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 55°C.

30 La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 55°C. La suspensión se agita durante 17 horas a 55°C bajo una ligera corriente de nitrógeno. Después, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

8x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

3x agua desionizada

2x sosa cáustica 1 M

35 El gel se suspende en 200 ml de sosa cáustica 1 M y se agita durante 20 horas, y después de filtrarlo por succión, el gel se sigue lavando sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

2x sosa cáustica 1 M

4x agua desionizada 5x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

5x agua desionizada

ES 2 397 795 T3

El gel se suspende en 200 ml de agua desionizada y se ajusta a pH 7 con ácido clorhídrico al 25%. El almacenamiento se efectúa en etanol al 20% a temperatura ambiente.

Ejemplo 4:

5 Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 05PP131)

Realización:

10 En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se prepara una suspensión de 140 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada) y una solución de 33,6 g de sosa cáustica al 32% en 120 ml de agua desionizada, 46,6 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (adición bajo refrigeración con hielo) y 16,2 g de ácido acrílico. Se lleva a un volumen de 400 ml con agua desionizada y se ajusta a pH 3 con ácido nítrico al 65%.

En un embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 2,8 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 0,7 g de ácido nítrico al 65% en 50 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 42°C.

15 La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 42°C. La suspensión se agita bajo una ligera corriente de nitrógeno durante 5 horas a 42°C y a continuación durante otras 17 horas a temperatura ambiente. Después, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 200 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

7x agua desionizada

20 8x ácido sulfúrico 1 M, ácido ascórbico 0,2 M

5x agua desionizada

3x sosa cáustica 1M

3x agua desionizada

1x tampón fosfato 50 mM pH 7,0

25 2x agua desionizada

2x etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM

El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

Ejemplo 5:

30 Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP066)

Realización:

35 En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se prepara una suspensión de 210 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada) y una solución de 56,1 g de sosa cáustica al 32% en 150 ml de agua desionizada, 77,7 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (adición bajo refrigeración con hielo) y 27,0 g de ácido acrílico. Se lleva a un volumen de 660 ml con agua desionizada y se ajusta a pH 3 con ácido nítrico al 65%.

En un embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 20,7 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 7,2 g de ácido nítrico al 65% en 90 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 55°C.

40 La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 55°C. La suspensión se agita durante 3 horas a 55°C bajo una ligera corriente de nitrógeno. Después, la solución de reacción

se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 300 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

7x agua desionizada

8x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

5 5x agua desionizada

2x sosa cáustica 1 M

El gel se suspende en 600 ml de sosa cáustica 1 M y se agita durante 20 horas, y después de filtrarlo por succión, el gel se sigue lavando sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

2x sosa cáustica 1 M

10 3x agua desionizada

1x tampón fosfato 50 mM pH 7,0

2x agua desionizada

2x etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM

El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

15 **Ejemplo 6:**

Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP189)

20 Para la realización véanse las instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP066) Solo se añadieron pasos de lavado adicionales con 2x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M.

Ejemplo 7:

Instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP262)

Realización:

25 Sobre una frita de vidrio, 40 ml del copolímero de injerto sedimentado de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico se lavan 8x con 40 ml de agua, respectivamente, sobre Fractogel (preparación 06PP189) y se filtran por succión.

30 En un equipo de vidrio con agitador de paletas planas se suspende el gel húmedo filtrado por aspiración en una solución de 12,8 g de bencilamina en 32 ml de agua desionizada y se ajusta a pH 4,7 con ácido clorhídrico al 32%. Una vez comprobado y, dado el caso, reajustado el valor de pH se añaden 0,8 g de hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC).

La suspensión se agita, manteniéndose el valor de pH a pH 4,7 por adición de sosa cáustica al 6%. Al cabo de 3 horas se añaden otros 0,8 g de EDC. El valor de pH se sigue manteniendo a pH 4,7 por adición de sosa cáustica al 6% y se comprueba durante al menos 1 hora.

35 Tras agitar durante 17 horas, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 40 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

10x agua desionizada

3x solución de cloruro sódico 1 M

5x tampón fosfato 50 mM, pH 7,0

2x solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM

El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

Ejemplo 8:

- 5 Instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP345)

Para la realización véanse las instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP262). Se añaden respectivamente 0,6 g de hidrocioruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC).

10 **Ejemplo 9:**

Instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP346)

- 15 Para la realización véanse las instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico (preparación 06PP262). Se añade respectivamente 1,0 g de hidrocioruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC).

Ejemplo 10:

Instrucciones para la preparación de un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido 4-acrilamidobutírico (preparación 06SW055)

Realización:

- 20 En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se prepara una suspensión de 70 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada) y una solución de 16,8 g de sosa cáustica al 32% en 75 ml de agua desionizada, 13,3 g de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (adición bajo refrigeración con hielo) y 17,7 g de ácido 4-acrilamidobutírico. Se lleva a un volumen de 200 ml con agua desionizada y se ajusta a pH 3 con ácido nítrico al 65%.

- 25 En un embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 6,2 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 0,4 g de ácido nítrico al 65% en 25 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 55°C.

- 30 La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 55°C. La suspensión se agita durante 3 horas a 55°C bajo una ligera corriente de nitrógeno. Después, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 100 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

5x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

3x agua desionizada

4x sosa cáustica 1M

- 35 5x agua desionizada

1x tampón fosfato 50 mM pH 7,0

3x agua desionizada

2x etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM

El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

Ejemplo 11:

Instrucciones para la preparación de un polímero de injerto de ácido 4-acrilamidobutírico (preparación 05PP116)

Realización:

5 En un equipo de reacción de vidrio con un agitador de paletas planas se añaden entre 0 y 5°C 25,0 g de sosa cáustica al 32% a una solución de 20,6 g de ácido 4-aminobutírico en 200 ml de agua desionizada. Bajo agitación intensa y entre 0 y 5°C se dosifican simultáneamente desde dos embudos de goteo 18,2 g de cloruro del ácido acrílico y 25,0 g de sosa cáustica al 32%. Después se sigue agitando durante 45 minutos a temperatura ambiente. La solución de monómeros se acidifica a pH 2 con ácido nítrico al 65%.

10 Se suspenden 70 g de Fractogel TSK HW65 (M) húmedo filtrado por aspiración (lavado con ácido mineral diluido y agua desionizada) en la solución de monómeros. Se lleva a un volumen de 450 ml con agua desionizada y se ajusta a pH 2 con ácido nítrico al 65%.

15 En un embudo de goteo con compensación de presión se introduce una solución de iniciador de 2,7 g de nitrato de amonio y cerio(IV) y 1,0 g de ácido nítrico al 65% en 50 ml de agua desionizada. El equipo completo se inertiza con nitrógeno por evacuación y relajación repetida (3x). A continuación se calienta la suspensión en el equipo a 42°C.

La solución de iniciador se añade bajo agitación a la suspensión inertizada a una temperatura interior de 42°C. La suspensión se agita bajo una ligera corriente de nitrógeno durante 5 horas a 42°C y a continuación durante otras 17 horas a temperatura ambiente. Después, la solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio (P2) y el gel se lava sobre la frita con 200 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

20 5x agua desionizada

8x ácido sulfúrico 0,5 M, ácido ascórbico 0,2 M

3x agua desionizada

2x sosa cáustica 1 M

2x agua desionizada

25 El gel se suspende en 200 ml de agua desionizada y se ajusta a pH 7 con ácido clorhídrico al 25%. El almacenamiento se efectúa en etanol al 20% a temperatura ambiente.

Ejemplo 12:

Instrucciones para el acoplamiento de aminas a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico

30 Realización:

Sobre una frita de vidrio se lavan 8x con 20 ml de agua, respectivamente, 20 ml del copolímero de injerto sedimentado de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico sobre Fractogel (preparación 06PP066 o 05PP131) y se filtran por succión.

35 Solución de amina: Se disuelven entre 5 y 60 mmoles de amina en 20 ml de agua desionizada (o DMF/agua desionizada 3:1) y se ajusta a pH 4,7 con ácido clorhídrico al 32% (tabla 2).

Solución de EDC: Se disuelven 2,4 g de hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) en 4,8 ml de agua desionizada.

40 El gel húmedo filtrado por aspiración se suspende en la solución de amina en un vaso que se puede cerrar. Después se añaden 1,2 ml de solución de EDC y la suspensión se agita a temperatura ambiente. Al cabo de 3 horas se añaden otros 1,2 ml de la solución de EDC y se agita durante otras 17 horas.

La solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio y el gel se lava sobre la frita con 20 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

(dado el caso 5x DMF)

5x agua desionizada

5 3x con sosa cáustica 1 M/etanol 2:8 (v/v)

El gel se suspende en 20 ml de sosa cáustica 1 M/etanol 2:8 y se agita durante 20 horas, y después de filtrarlo por succión, el gel se sigue lavando sobre la frita con 20 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

2x sosa cáustica 1 M/etanol 2:8

10 3x agua desionizada

1x tampón fosfato 50 mM, pH 7,0

2x agua desionizada

2x solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM

El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

15 **Ejemplo 13:**

Instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido 4-acrilamidobutírico (preparación 06SW058)

Realización:

20 Sobre una frita de vidrio se lavan 20 ml del copolímero de injerto sedimentado de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido 4-acrilamidobutírico sobre Fractogel (preparación 06SW055) 5x con 20 ml de agua, respectivamente, y 5x con 20 ml, respectivamente, de una solución de ácido 2-morfolinoetanosulfónico 0,1 M (tampón MES) pH 4,7 y se filtran por succión.

Se disuelven 6,4 g de bencilamina en 20 ml de tampón MES 0,1 M y se ajusta a pH 4,7 con ácido clorhídrico al 32%.

25 El gel húmedo filtrado por aspiración se suspende en la solución de bencilamina en un vaso que se puede cerrar. Después se añaden 0,4 g de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y la suspensión se agita a temperatura ambiente. Al cabo de 3 horas se añaden otros 0,4 g de EDC y se agita durante otras 17 horas.

La solución de reacción se filtra por succión a través de una frita de vidrio y el gel se lava sobre la frita con 20 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

30 10x agua desionizada

3x solución de cloruro sódico 1 M

5x tampón fosfato 50 mM, pH 7,0

2x agua desionizada

2x solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM

35 El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

La capacidad de unión estática de IgG humana policlonal (Gammanorm) en fosfato 20 mM, cloruro sódico 75 mM, pH 6,5, asciende a 30,9 mg de IgG/ml y en fosfato 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 6,5, a 9,1 mg de IgG/ml. El método para la determinación de la capacidad de unión se describe en el ejemplo 15.

Ejemplo 14:

Instrucciones para el acoplamiento de bencilamina a un polímero de injerto de ácido 4-acrilamidobutírico (preparación 05PP117/05PP118)

Realización:

- 5 Sobre una frita de vidrio se lavan 20 ml del copolímero de injerto sedimentado de ácido 4-acrilamidobutírico sobre Fractogel (preparación 05PP116) 5x con 20 ml de agua, respectivamente, y 5x con 20 ml, respectivamente, de una solución de ácido 3-morfolinopropanosulfónico 0,1 M (tampón MPS) pH 4,7 y se filtran por succión.

Variante A: Se disuelven 6,4 g de bencilamina en 20 ml de tampón MPS 0,1 M y se ajusta a pH 4,7 con ácido clorhídrico al 32%.

- 10 El gel húmedo filtrado por aspiración se suspende en la solución de amina en un vaso que se puede cerrar. Se añaden 0,4 g de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y la suspensión se agita a temperatura ambiente. Al cabo de 3 horas se añaden otros 0,4 g de EDC y se agita durante otras 17 horas.

Variante B: Se disuelven 1,1 g de bencilamina en 20 ml de tampón MPS 0,1 M y se ajusta a pH 4,7 con ácido clorhídrico al 32%.

- 15 El gel húmedo filtrado por aspiración se suspende en la solución de amina en un vaso que se puede cerrar. Se añaden 0,07 g de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y la suspensión se agita a temperatura ambiente. Al cabo de 3 horas se añaden otros 0,07 g de EDC y se agita durante otras 17 horas.

Las soluciones de reacción de la variante A o B se filtran por succión a través de una frita de vidrio y los geles se lavan sobre la frita con 20 ml, respectivamente, de solución de lavado de la siguiente manera:

- 20 10x agua desmineralizada

3x solución de cloruro sódico 1 M

5x tampón fosfato 50 mM pH 7,0

El almacenamiento se efectúa en una solución de etanol al 20%/cloruro sódico 150 mM a temperatura ambiente.

- 25 La capacidad de unión estática de IgG humana policlonal (Gammanorm) en fosfato 20 mM, cloruro sódico 75 mM, pH 6,5, asciende en el gel de la variante A a 7,6 mg de IgG/ml, y en el gel de la variante B, a 16,8 mg de IgG/ml. El método para la determinación de la capacidad de unión se describe en el ejemplo 15.

Ejemplo 15:

Determinación de la capacidad de unión estática de IgG (formato de placa de microtitulación)

- 30 Todas las suspensiones de gel se ajustaron con etanol al 20% en agua a un volumen del gel sedimentado del 50%. Se rellena una placa filtrante con tampón de unión y con 20 µl de la suspensión de gel homogeneizada. Después, la placa filtrante se filtra por succión en una estación de vacío.

Se rellena una placa de pocillos profundos con tampón de unión, se añade solución madre de IgG (IgG humana policlonal Gammanorm, empresa Octapharma) y se mezcla.

- 35 Se añaden 200 µl de la solución de IgG al gel en la placa filtrante y se agita durante 15 min en un agitador. La placa filtrante se filtra por succión en la estación de vacío. Se lava dos veces con 100 µl, respectivamente, de tampón de unión y se filtra por succión. Después, se añaden 200 µl, respectivamente, de tampón de elución (fosfato 20 mM, cloruro sódico 1 M, pH 7) a la placa filtrante y se agita durante 5 min. El sobrenadante se filtra con succión en la estación de vacío y se transfiere a una placa UV, que se mide en el fotómetro a 280 nm.

- 40 En la tabla 2 se exponen las capacidades de unión de IgG calculadas a partir del eluato por 1 ml de volumen del gel sedimentado (IgG SBC). Como tampones de unión se usaron fosfato 20 mM, cloruro sódico 75 mM, pH 6,5 y fosfato 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 6,5.

En la tabla 2 se compilan las capacidades de unión de los materiales de separación del ejemplo 12.

Ejemplo 16:

Determinación de la composición química de los polímeros de injerto

5 Cuando en el caso de los polímeros de injerto se trata de cadenas de poli(acrilamida), se pueden disociar los grupos funcionales por hidrólisis ácida. Los grupos funcionales se liberan en forma de amina y se pueden analizar cuantitativamente mediante HPLC después de la derivatización con orto-ftaldialdehído y mercaptoetanol. Para el calibrado se usan aminas comerciales o el monómero usado en la síntesis, que después tiene que ser hidrolizado como el polímero de injerto.

Se añaden 1.000 µl de ácido clorhídrico 5 M a 10 mg de gel seco, se trata en el baño de ultrasonidos y a continuación se calienta a 125°C durante 10 horas en un recipiente a presión de 1 ml.

10 Una vez enfriado a temperatura ambiente, el recipiente a presión se abre y se retiran con una pipeta aproximadamente 200 µl de sobrenadante, que se centrifuga durante 5 min (8.000 rpm).

15 Se neutralizan 40 µl del sobrenadante transparente con 176 µl de sosa cáustica 1 M y se añaden 325 µl de tampón borato 0,5 M, pH 9,5, y 119 µl de acetonitrilo/agua 8:2 (v/v) y se mezclan. Después se añaden 100 µl del reactivo OPA, que se prepara a partir de 100 mg de orto-ftaldialdehído, 9 ml de metanol, 1 ml de tampón borato 0,5 M, pH 9,5, y 100 µl de mercaptoetanol, y se agita intensamente. Tras un tiempo de reacción de 2 minutos la muestra se analiza por HPLC (detección UV 330 nm).

El número de grupos cargados se determina por titulación. Para ello se agita el gel con ácido clorhídrico 0,5 M y se lava con ácido clorhídrico 0,001 M. El gel así cargado se titula con sosa cáustica 0,1 M. A continuación, el gel se lava y se seca. La determinación de los puntos de equivalencia se efectúa hallando la primera derivada.

20 Los resultados se exponen en la Tabla 4.

Ejemplo 17:

Determinación de la capacidad de unión dinámica de IgG

25 Se rellenaron columnas con un contenido de 1 ml. Columnas Proteo-Cart y columnas Superformance con una altura del lecho de 19 mm y 13 mm, respectivamente, y una compresión del 20% y 10%, respectivamente. Las columnas se cargaron con una solución de IgG con un contenido de 1 g/l en tampón A (preparado a partir de IgG humana policlonal Gammanorm, empresa Octapharma) hasta obtener un pico no retenido del 10%. La velocidad de flujo se eligió de tal manera, que el tiempo de contacto en la columna ascendiera a 4 min. Tras aclarar con tampón A se eluyó con tampón B.

tampón A: fosfato 25 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 6,5

30 tampón B: fosfato 25 mM, cloruro sódico 1 M, pH 6,5

o bien

tampón A': fosfato 25 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 5,5

tampón B': fosfato 25 mM, cloruro sódico 1 M, pH 5,5

o bien

35 tampón A'': fosfato 25 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 5,5

tampón B'': tampón TRIS 50 mM, cloruro sódico 2 M, pH 9,0

Los resultados se exponen en la Tabla 4.

Ejemplo 18:

Experimento de unión con anticuerpos monoclonales

Una columna Proteo-Cart con un contenido de 1 ml (Merck KgaA) se rellena con un material de separación (06PP343) preparado según el ejemplo 7 (compresión del 17%) y se equilibra con fosfato 25 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 5,5 (aprox. 12 mS/cm). Se aplica en la columna una muestra con 20 mg de anticuerpo monoclonal quimérico (como se describe en Clinical Cancer Research 1995, 1, 1311- 1318, disuelto en fosfato 25 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 5,5) a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. La elución se efectúa con una solución que contiene fosfato 25 mM, cloruro sódico 1 M a pH 5,5. La recuperación siguiente del anticuerpo una vez efectuada la elución ascendió al 98% en los ensayos realizados.

En la figura 3 se muestra el cromatograma.

Ejemplo 19:

10 Cromatografía de exclusión molecular

Los coeficientes de reparto Kd de pululanos con diferentes pesos moleculares, representados en la figura 2 mediante su radio de viscosidad, se determinaron experimentalmente mediante experimentos isocráticos a tres concentraciones de sal (cloruro sódico 0, 0,1 y 1,0 M) para un polímero de injerto de ácido acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico antes (Fractogel SO3/COO) y después del acoplamiento de bencilamina (Fractogel SO3/COO/bencilo).

Tabla 2: Acoplamiento de aminas a un copolímero de injerto de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido acrílico, capacidad de unión estática (SB) de IgG humana policlonal (Gammanorm) a pH 6,5 y cloruro sódico 75 o 150 mM por ml de gel sedimentado.

| Preparación | Precursor | Disolvente | Amina | Amina(s) (relación) | SB NaCl 75 mM | SB NaCl 150 mM |
|--------------------------------|------------|------------|-------|---------------------------------|------------------|-------------------|
| | | | mmol | | mg IgG/ml | mg IgG/ml |
| SO ₃ ^[1] | no procede | | | | 6,4 | 0,3 |
| COO ^[2] | no procede | | | | 1,2 | 0,2 |
| 05PP131 ^[3] | no procede | | | | 1,5 | 0,3 |
| 05PP157 | 05PP131 | Agua | 10 | 4-Metoxibencilamina | 16,6 | no determinado |
| 05PP143 | 05PP131 | Agua | 60 | Fenoxietilamina | 17,4 | no determinado |
| 05PP158 | 05PP131 | Agua | 10 | 4-Fluorobencilamina | 17,4 | no determinado |
| 06PP069 | 06PP066 | DMF/Agua | 60 | Octilamina | 20,2 | 5,2 |
| 05PP152 | 05PP131 | Agua | 5 | Hidrocloruro de fenacilamina | 23,4 | no determinado |
| 05PP151 | 05PP131 | Agua | 30 | Anilina | 26,5 | no determinado |
| 06PP080 | 06PP066 | DMF/Agua | 60 | Naftilmetilamina | 27,9 | 11,4 |
| 06PP054 | 06PP066 | Agua | 60 | Bencilamina/tiramina (90:10) | 28,1 | 12,5 |
| 05PP132 | 05PP131 | Agua | 60 | Bencilamina | 30,2 | no determinado |

ES 2 397 795 T3

(continuación)

| Preparación | Precursor | Disolvente | Amina | Amina(s) (relación) | SB NaCl 75 mM | SB NaCl 150 mM |
|-------------|-----------|------------|-------|--------------------------------------|------------------|-------------------|
| | | | mmol | | mg IgG/ml | mg IgG/ml |
| 06PP051 | 06PP066 | Agua | 60 | Bencilamina/etanol- amina (90:10) | 32,7 | 12,9 |
| 06PP119 | 06PP066 | Agua | 60 | Bencilamina | 37,9 | 20,4 |
| 06PP118 | 06PP066 | DMF/Agua | 60 | Triptamina | 42,3 | 25,4 |
| 06PP086 | 06PP066 | Agua | 60 | Feniletilamina | 45,5 | 18,1 |

[1] Fractogel[®] EMD SO₃⁻ (M) disponible en el mercado,

[2] Fractogel[®] EMD COO⁻ (M) disponible en el mercado,

[3] Copolímero de injerto antes de la reacción de acoplamiento con amina hidrófoba.

ES 2 397 795 T3

Tabla 3: Capacidad de unión dinámica (DB) de IgG humana policlonal (Gammanorm) con cloruro sódico 150 mM y a pH 5,5 o pH 6,5 por ml de gel rellenado y composición química de los polímeros de injerto.

| Preparación | DB pH 6,5 | DB ^[1] pH 5,5 (recuperación) | DB ^[2] pH 5,5 (recuperación) | Grupos SO ₃ ⁻ | Grupos bencilo | Grupos cargados (titulación) |
|---|-----------|--|--|--|-------------------|------------------------------------|
| | mg IgG/ml | mg IgG/ml | mg IgG/ml | μmol/g | μmol/g | μmol/g |
| Fractogel [®] EMD SO ₃ ⁻ (M) | 1,1 | 0,4 (n.d.) | n.d. | | | |
| Fractogel [®] EMD COO ⁻ (M) | 0,5 | 0,6 (n.d.) | n.d. | | | |
| 05SW136 | 1,4 | 28,0 (96%) | n.d. | 240 | 422 | 393 |
| 06SW297 | 0,9 | 42,9 (83%) | 50,5 (96%) | | 122 | 2016 |
| 06SW085 | n.d. | 34,7 (93%) | 36,9 (98%) | 107 | 187 | 497 |
| 06PP262 | 1,2 | 68,1 (82%) | 76,1 (93%) | 521 | 467 | 1366 ^[3] |
| 06PP345 | 0,5 | 15,7 (85%) | 22,7 (100%) | 657 | 353 | 1480 ^[3] |
| 06PP346 | 1,3 | 61,2 (77%) | 67,4 (89%) | 582 | 530 | 1303 ^[3] |

[1] Elución con tampón B' a pH 5,5

[2] Elución con tampón B'' a pH 9,0

[3] Calculado a partir del resultado de la titulación del precursor (06PP189 con 1.833 μmol/g o 06PP292 con 1.963 μmol/g) y la densidad de grupos bencilo

n.d. no determinado

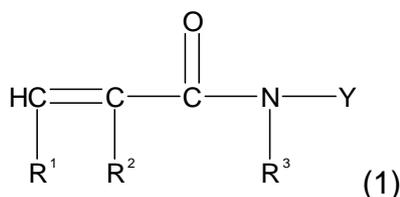
REIVINDICACIONES

1. Materiales de separación para la cromatografía de intercambio iónico basados en soportes de base con contenido en grupos hidroxilo en cuya superficie están unidos covalentemente copolímeros, **caracterizados porque**

- 5 a) el soporte de base contiene grupos hidroxilo alifáticos,
- b) los copolímeros unidos covalentemente están unidos al soporte a través de una unidad monomérica terminal,
- c) los copolímeros contienen al menos dos unidades monoméricas diferentes,
- d) las unidades monoméricas están enlazadas de forma lineal,
- 10 e) el copolímero contiene al menos una unidad monomérica que lleva una carga negativa en forma de un ácido sulfónico o ácido carboxílico y contiene, además, grupos éster o amida y grupos alquilo y/o alquileno y, como máximo, un total de 8 átomos de C pero ningún grupo arilo, o que lleva una carga negativa en forma de un ácido sulfónico o ácido carboxílico y contiene, además, grupos alquilo y/o alquileno pero ningún grupo arilo,
- 15 f) el copolímero contiene al menos una unidad monomérica que como grupo hidrófobo lleva alquilo de cadena lineal o ramificado con 4 a 18 átomos de C o grupos arilo correspondientes y contiene grupos éster o amida, y
- g) la relación entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con grupos hidrófobos se encuentra en el intervalo de 99:1 a 10:90.

20 2. Materiales de separación según la reivindicación 1, **caracterizados porque**

- a) el soporte de base contiene grupos hidroxilo alifáticos,
- b) los copolímeros unidos covalentemente están unidos al soporte a través de una unidad monomérica terminal,
- c) los copolímeros contienen al menos dos unidades monoméricas diferentes,
- 25 d) las unidades monoméricas están enlazadas de forma lineal,
- e) el copolímero presenta al menos una unidad monomérica de carga negativa, bien de fórmula general (1)



en la que significan

R^1 , R^2 e Y independientemente entre sí

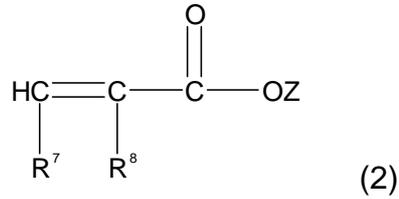
30 H o CH_3 ,

R^3 R^4 - SO_3M o R^4 - COOM ,

R^4 alquileno de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C y

M H, Na, K o NH_4 ,

bien de fórmula general (2)



en la que significan

R^7 y R^8 independientemente

5 H o CH_3 , o

R^7 COOM cuando $\text{Z} = \text{M}$ y $\text{R}^8 = \text{H}$,

Z o bien M, R^4 -COOM o bien R^4 - SO_3M con

R^4 alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C,

y

10 M H, Na, K o HN_4 ,

presenta en cada caso al menos una unidad monomérica de fórmula general 1 y de fórmula general (2) y

f) el copolímero presenta al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo de fórmula general 1 que confiere al copolímero un carácter hidrófobo,

en la que significan

15 R^1 H o COOM,

R^2 H o CH_3 ,

Y y R^3 alquilo de cadena lineal o ramificado con hasta 18 átomos de C,

donde Y y R^3 llevan juntos al menos 6 átomos de C,

o

20 Y H

y

R^3 alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 18 átomos de C o

Y H

y

25 R^3 arilo o R^6 -arilo

o

Y H o CH_3

y

$R^3 R^4$ -CONHX,

X alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 18 átomos de C,

arilo o R^6 -arilo

R^4 alquileno de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C

5 R^6 alquileno de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C, en el que un grupo metileno puede estar reemplazado por O y puede estar sustituido con COOM

y

M H, Na, K o NH_4 ,

o una unidad monomérica correspondiente de fórmula general (2),

10 en la que significan

R^7 H,

R^8 H o CH_3 ,

Z alquilo de cadena lineal o ramificado con 4 a 18 átomos de C,

arilo, R^6 -arilo o R^4 -CONHX,

15 X alquilo de cadena lineal o ramificado con 6 a 8 átomos de C, arilo, R^6 -arilo

y

R^6 un alquileno de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C,

y

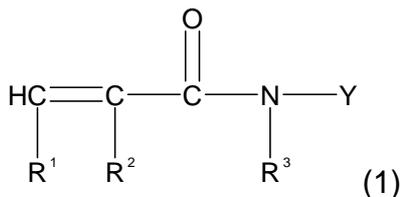
20 g) la relación entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 99:1 a 10:90.

3. Materiales de separación según la reivindicación 1 o 2, **caracterizados porque**

c) los copolímeros contienen al menos dos unidades monoméricas diferentes,

25 e) el copolímero presenta al menos una unidad monomérica de carga negativa de la serie ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido 2-acrilamidoetanosulfónico, carboximetilacrilamida, carboxietilacrilamida, carboxipropilacrilamida, carboximetilmetacrilamida, carboxietilmetacrilamida, carboxipropilmetacrilamida, ácido maleico, ácido acrílico y ácido metacrílico y

f) el copolímero presenta al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo de fórmula general (1)



en la que significan

30 R^1 H,

R² H o CH₃,

Y H

y

R³ arilo o R⁶-arilo,

5

o

Y H o CH₃

y

R³ R⁴-CONHX con

X arilo o R⁶-arilo,

10

R⁴ metileno, etileno, propileno y

R⁶ un alquileo de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de C, en el que un grupo metileno puede estar reemplazado por O y estar sustituido con COOM

y

M H, Na, K o NH₄.

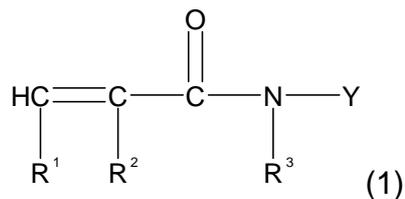
15 **4. Materiales de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados porque**

c) los copolímeros contienen al menos dos unidades monoméricas diferentes,

20

e) el copolímero presenta al menos una unidad monomérica de carga negativa de la serie ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, ácido 2-acrilamidoetanosulfónico, carboximetilacrilamida, carboxietilacrilamida, carboxipropilacrilamida, carboximetilmetacrilamida, carboxietilmetacrilamida, carboxipropilmetacrilamida, ácido maleico, ácido acrílico y ácido metacrílico y

f) el copolímero presenta al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo de fórmula general (1)



en la que significan

R¹ H,

25

R² H o CH₃,

Y H

y

R³ fenilo, bencilo, feniletilo o fenoxietilo,

o

30

Y H o CH₃

y

R³ R⁴-CONHX con

X fenilo, bencilo o feniletilo

y

5 R⁴ metileno, etileno, propileno acriloilfenilglicina o acriloilfenilalanina.

5. Material de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque**

a) el copolímero contiene como unidad monomérica de carga negativa ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico o/y ácido 2-acrilamidoetanosulfónico,

10 b) la relación entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo fenilo, bencilo o feniletilo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 70: 30 a 30: 70.

6. Material de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** a) el copolímero contiene como unidad monomérica de carga negativa ácido acrílico o/y ácido metacrílico y

b) la relación molar entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo fenilo, bencilo o feniletilo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 95:5 a 70:30.

15 7. Material de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque**

a) el copolímero contiene un monómero de la serie ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico y ácido 2-acrilamidoetanosulfónico como unidad monomérica de carga negativa y

b) un monómero de la serie ácido acrílico y ácido metacrílico y

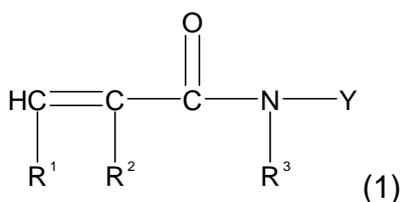
20 b) la relación molar entre las unidades monoméricas de carga negativa y las unidades monoméricas con un grupo fenilo, bencilo o feniletilo hidrófobo se encuentra en el intervalo de 95:5 a 30:70.

8. Procedimiento para la preparación de los materiales de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** se polimeriza por injerto al menos una unidad monomérica con un grupo funcional de carga negativa con al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo y, dado el caso, con un monómero neutro con propiedades hidrófilas, en una reacción de una o varias etapas sobre un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado porque** se disuelve al menos una unidad monomérica con un grupo funcional de carga negativa con al menos una unidad monomérica con un grupo hidrófobo y, dado el caso, con un monómero neutro con propiedades hidrófilas en ácido diluido añadiendo un codisolvente de la serie acetona, dimetilacetamida, dimetilformamida, dioxano, tetrahidrofurano en presencia de iones cerio(IV) y se polimeriza por injerto sobre un soporte de base con contenido en grupos hidroxilo.

10. Procedimiento para la preparación de los materiales de separación según las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado porque**

a) se polimeriza por injerto al menos un monómero con un grupo carboxilo de fórmula general (1)



35 en la que significan

R¹, R² e Y independientemente entre sí

H o CH₃,

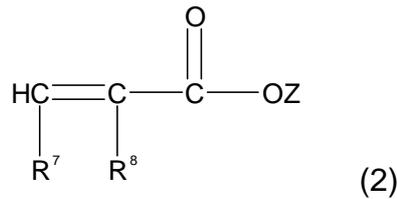
R³ R⁴-COOM y

R⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C y

5

M H, Na, K o NH₄,

y/o un monómero con un grupo carboxilo de fórmula general (2)



en la que significan

R⁷ y R⁸ independientemente ente sí

10

H o CH₃, o

R⁷ COOM cuando Z = M y R⁸ = H,

Z o bien M o bien R⁴-COOM con

R⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C

y

15

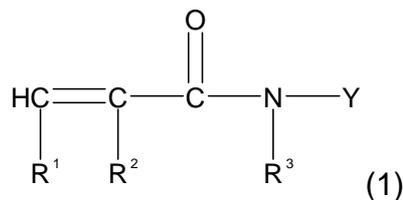
M H, Na, K o NH₄,

dado el caso junto con un monómero hidrosoluble, sobre un material de soporte inorgánico, orgánico o híbrido con contenido en grupos hidroxilo y

b) a continuación se transforma una parte de los grupos carboxilo polimerizados por injerto en grupos amida mediante acoplamiento con una amina.

20 **11.** Procedimiento según la reivindicación 10 para la preparación de los materiales de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque**

a) se disuelve en agua al menos un monómero con un grupo carboxilo de fórmula general (1)



en la que significan

25

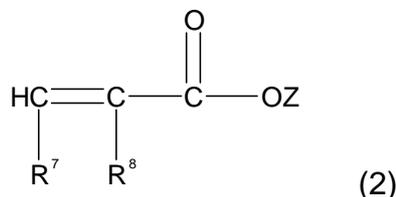
R¹, R² e Y independientemente ente sí H o CH₃,

R³ R⁴-COOM,

R⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C y

M H, Na, K o NH₄,

y/o de fórmula general (2)



5 en la que significan

R⁷ y R⁸ independientemente entre sí H o CH₃,

o

R⁷ COOM cuando Z = M y R⁸ = H

Z M o R⁴-COOMR⁴ alquileo de cadena lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de C

10 y

M H, Na, K o NH₄,

dado el caso junto con un monómero hidrosoluble adicional, de manera que la proporción de los grupos de carga negativa ascienda a entre 1 y 100 mol% en relación con la cantidad total de monómeros,

15 b) la solución obtenida se mezcla con el material de soporte de tal manera, que se usen entre 0,05 y 100 mol de monómeros totales por litro de material de soporte sedimentado,

c) se añade a la suspensión obtenida una sal de cerio(IV) disuelta en ácido mineral, por medio de lo cual se ajusta un valor de pH comprendido en el intervalo de 0 a 5 y una concentración de cerio(IV) de 0,00001 a 0,5 mol/l, preferentemente de 0,001 a 0,1 mol/l, y

d) la mezcla de reacción se polimeriza por injerto en un plazo de 0,5 a 72 horas y

20 e) para la modificación por acoplamiento de los grupos carboxilo polimerizados por injerto se usa una amina o una mezcla de aminas y

f) la cantidad total de aminas se usa en una relación molar de 0,01 a 100:1 respecto a los grupos carboxilo unidos al soporte y éstos se transforman en grupos amido en presencia de un reactivo de acoplamiento que se usa en una relación molar de 0,01:1 a 20:1 respecto a los grupos cargados unidos al soporte y

25 g) para el acoplamiento se usa una alquil-, aril- o arilalquilamina con 6 a 18 átomos de C del grupo formado por anilina, bencilamina, 4-fluorobencilamina, 4-metoxibencilamina, naftilmetilamina, fenacilamina, feniletilamina, fenoxietilamina, triptamina o tiramina, en forma de amina libre o de hidrocloreuro.

12. Columna cromatográfica que presenta un material de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7.

30 13. Uso de los materiales de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7 en una columna cromatográfica.

14. Uso de los materiales de separación según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7 para la separación de biopolímeros a partir de medios líquidos.

35 15. Uso según la reivindicación 13, **caracterizado porque** el biopolímero está disuelto en un líquido acuoso que presenta una conductividad electrolítica de 1 a 20 mS/cm y un valor de pH superior a 4.

16. Uso según una o varias de las reivindicaciones 13 a 15, **caracterizado porque** el biopolímero unido al material de separación mediante la interacción con los grupos iónicos y, dado el caso, hidrófobos se desorbe

a) por aumento de la fuerza iónica y/o

b) por modificación del pH

5 de la solución

y/o

c) mediante el uso de un eluyente con una polaridad distinta a la del tampón de adsorción.

Fig. 1

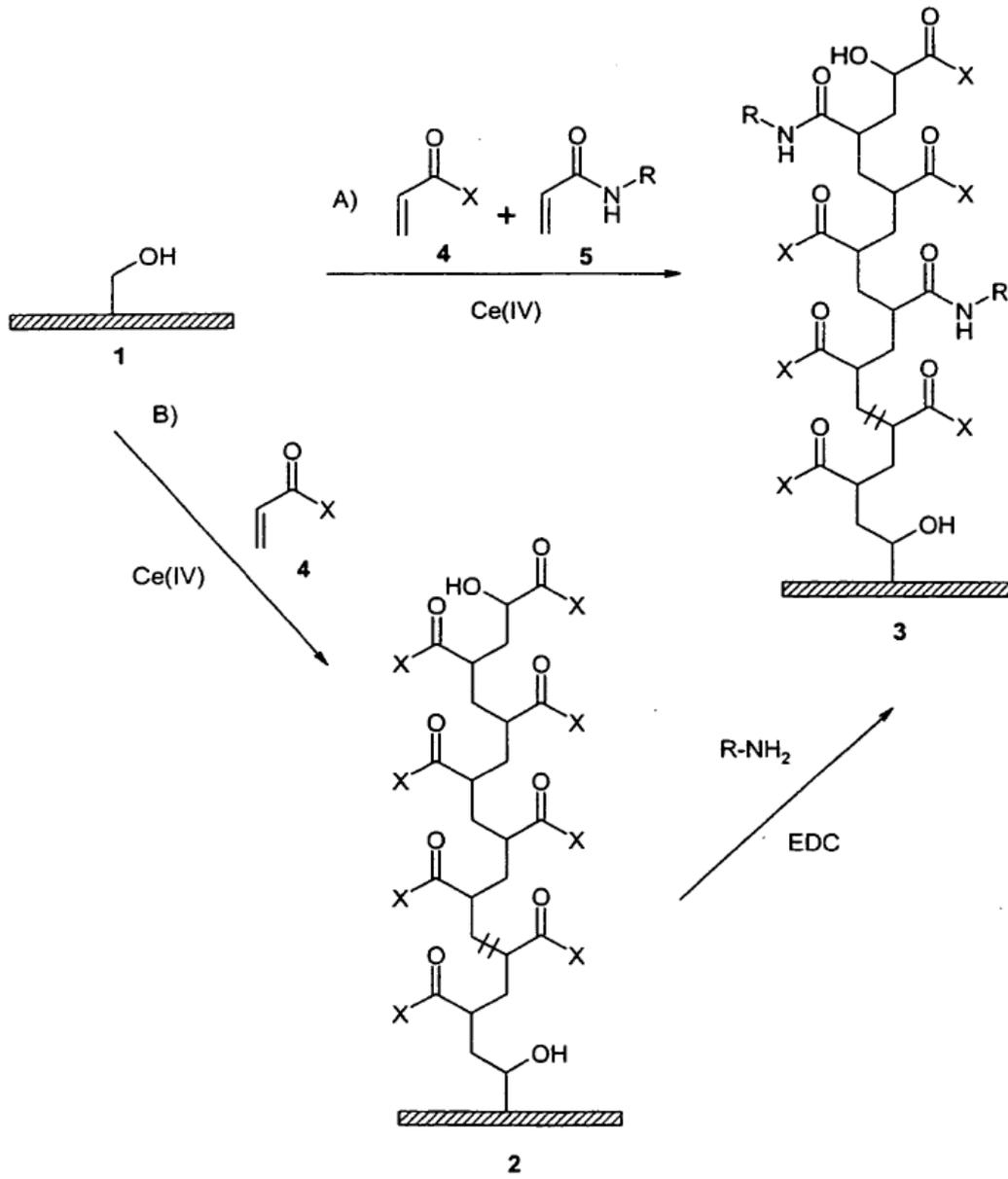


Fig. 2

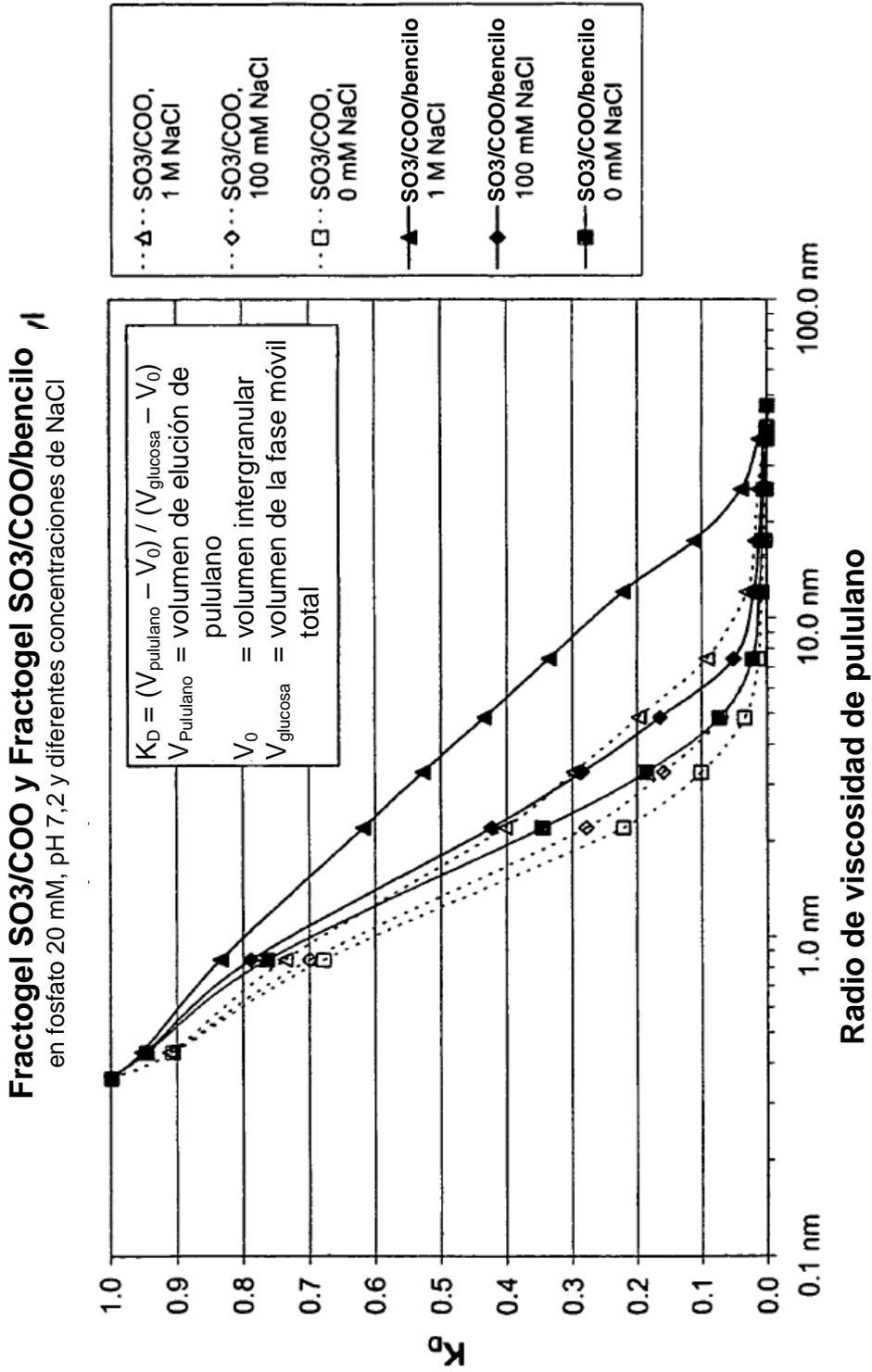


Fig. 3

