

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 822**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18	(2006.01)	C08J 3/12	(2006.01)
B01D 15/08	(2006.01)	B01J 20/285	(2006.01)
C08B 37/12	(2006.01)	C08J 3/24	(2006.01)
B01D 15/04	(2006.01)	C08F 16/12	(2006.01)
C08B 15/10	(2006.01)	C08F 20/56	(2006.01)
C08F 226/00	(2006.01)	C08F 26/06	(2006.01)
B01J 39/26	(2006.01)	C08F 220/06	(2006.01)
C08F 2/44	(2006.01)		
C08F 220/56	(2006.01)		
C08H 1/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2009 E 09813911 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2344517**

54 Título: **Partículas poliméricas sensibles a la temperatura en aplicaciones de separación de proteínas**

30 Prioridad:

22.09.2008 AU 2008221604

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

25.09.2014

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (50.0%)
1 Limestone Avenue
Campbell, Australian Capital Territory 2612, AU y
MONASH UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WOONTON, BRAD WILLIAM;
HEARN, MILTON THOMAS WILLIAM;
MAHARJAN, PANKAJ;
DE SILVA, KIRTHI y
JACKSON, WILLIAM ROY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 498 822 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

Partículas poliméricas sensibles a la temperatura en aplicaciones de separación de proteínas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para aislar proteínas de una disolución que contiene las proteínas. La invención también se refiere a un método para la separación cromatográfica de proteínas. Además, la presente invención también se refiere a partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, y a métodos para preparar tales partículas.

Antecedentes de la invención

10 La cromatografía es una técnica empleada para separar mezclas de moléculas. Implica disolver la mezcla en un disolvente o combinación de disolventes (la llamada fase móvil) para formar una disolución y posteriormente hacer pasar la disolución sobre un sólido (la llamada fase estacionaria). La combinación correcta de fase móvil y fase estacionaria hace que las moléculas sean separadas permitiendo la interacción preferencial o selectiva de cada molécula con la fase estacionaria hasta un grado diferente. Esta diferente interacción permite que las moléculas sean separadas y por tanto aisladas, analizadas o identificadas. Tanto la fase móvil como la fase estacionaria de la cromatografía son variadas para ser adecuadas a (i) el tipo de moléculas que son separadas, (ii) la escala de la separación (p.ej., analítica, preparativa o industrial), y (iii) la funcionalidad deseada de las moléculas separadas (p.ej. bioactividad). Los ejemplos de fases móviles incluyen acetonitrilo, agua, disolución salina acuosa, metanol o mezclas de los mismos, mientras que las fases estacionarias comunes incluyen resinas de intercambio iónico, de interacción hidrófoba o de interacción por afinidad. La cromatografía se emplea extensamente en la industria farmacéutica y alimentaria para fines analíticos, y también para aislar moléculas valiosas a escala preparativa y comercial.

15 Los polímeros "sagaces" o "inteligentes" son materiales que sufren cambios reversibles, rápidos, en su estructura y función respuesta a estímulos físicos, químicos o eléctricos externos. La temperatura es el estímulo más ampliamente estudiado en los sistemas de "polímeros inteligentes", y la poli(N-isopropilacrilamida) (PoliNIPAAm) es un polímero sensible a la temperatura común y extensamente estudiado.

25 Los materiales sensibles a la temperatura tienen potencial en cromatografía de intercambio iónico como herramienta versátil de separación, donde la elución de biomoléculas diana enlazadas puede ser inducida mediante un cambio físico suave, tal como un ajuste en temperatura. Estos sistemas cromatográficos de polímeros inteligentes son prometedoros en el aislamiento rentable de componentes valiosos, particularmente de alimentaciones complejas agrícolas-alimentarias, farmacéuticas, químicas, acuosas y otras, de una manera respetuosa con el medio ambiente.

30 El PoliNIPAAm y polímeros relacionados han sido usados en el campo de las separaciones para generar fases estacionarias sensibles a la temperatura para cromatografía iónica (Kobayashi *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (13), 3244-3249; Sakamoto *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1030, 247-253; Ayano *et al.*, *Journal of Separation Science*, 2006, 29, 738-749), exclusión de tamaños (Hosoya *et al.*, *Macromolecules*, 1994, 27, 3973-3976; Agrados *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2001, 930 (1-2), 73-78), interacción hidrófoba (Kanazawa, *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 5961-5966), y separaciones por cromatografía basadas en afinidad (Hoffman y Stayton, *Macromolecular Symposia*, 2004, 207, 139-151) usando un intervalo de diferentes materiales de soporte.

35 Además, un copolímero sensible al pH y a la temperatura de poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico-co-terc-butilacrilamida) injertado sobre perlas de sílice ha sido evaluado como medio cromatográfico aniónico sensible a la temperatura (Kobayashi *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2002, 958, 109-119); Kobayashi *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (13), 3244-3249). La separación efectiva de péptidos bioactivos básicos bajo condiciones exclusivamente acuosas se logró usando superficies modificadas con polímeros aniónicos sensibles a la temperatura/pH. De manera similar, perlas de sílice injertadas con poli(N-isopropilacrilamida-co-metilacrilato de butilo-co-N,N'-dimetilaminopropilacrilamida) han sido evaluadas como medio cromatográfico catiónico sensible a la temperatura (Sakamoto *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1030, 247-253; Ayano *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1119, 58-65). El medio fue diseñado para la separación eficaz de compuestos bioactivos y compuestos farmacéuticos usando fases móviles acuosas isocráticas.

40 Hay varios informes que muestran el uso de polímeros inteligentes injertados sobre perlas de sílice para cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, las industrias alimentarias y otras tienden a evitar las matrices con base de sílice debido al coste, la inestabilidad al alto pH y la falta de robustez operacional bajo las condiciones usadas a menudo en las industrias alimentarias y otras para limpiar el equipo. Además, los sorbentes basados en sílice son generalmente aplicables a separaciones analíticas, y carecen de la flexibilidad requerida para aplicaciones de proceso en las industrias alimentarias y otras.

45 Además, las investigaciones previas sobre el potencial de los polímeros inteligentes en la cromatografía de intercambio catiónico con perlas de sílice modificadas sólo han sido emprendidas usando compuestos pequeños, como aminoácidos y esteroides. Ha habido poca bibliografía publicada que examine la retención y liberación de proteínas grandes de significación para las industrias alimentarias, farmacéuticas, químicas o del agua (p.ej., lactoferrina) usando resinas cromatográficas de intercambio iónico sensibles a la temperatura.

Hay una necesidad de resinas poliméricas de intercambio iónico inteligentes sobre matrices no silíceas. Específicamente, hay una necesidad de medios poliméricos de intercambio iónico inteligentes basados en una matriz que sea compatible con los sistemas empleados actualmente por las industrias alimentarias, farmacéuticas y otras (tales como agarosa reticulada). Además, hay una necesidad de resinas cromatográficas de intercambio catiónico basadas en agarosa térmicamente sensibles para su aplicación en el aislamiento de proteínas grandes de importancia comercial dentro de las industrias alimentarias y otras (tales como lactoferrina).

La discusión de los antecedentes de la invención de la presente memoria se incluye para explicar el contexto de la invención. Esta no es para ser interpretada como una admisión de que cualquier material al que se hace referencia fue publicado, conocido o fue parte del conocimiento general común en cuanto a la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

En toda la descripción y reivindicaciones de la memoria descriptiva, la palabra “comprenden” y las variaciones de la palabra, tales como “que comprenden” y “comprende”, no pretende excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para aislar proteínas de una disolución que contiene las proteínas, método que incluye:

(a) poner en contacto la disolución que contiene las proteínas con partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables y dicho contacto ocurre a una temperatura entre 30°C y 80°C para facilitar la retención de las proteínas por las partículas poliméricas reticuladas;

(b) reemplazar la disolución que contiene la proteína por una disolución de aclarado;

(c) reemplazar la disolución de aclarado por una disolución de liberación eficaz para liberar las proteínas de las partículas poliméricas reticuladas en la disolución;

(d) aislar la disolución de liberación que contiene la proteína.

Vista desde un aspecto adicional, la presente invención proporciona partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables.

Vista desde un aspecto adicional, la presente invención proporciona partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye:

(a) unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero; y

(b) unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero.

Vista desde aún otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para aislar proteínas de una disolución que contiene las proteínas, método que incluye:

(a) poner en contacto la disolución que contiene las proteínas con partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables y dicho contacto ocurre a una temperatura entre 30°C y 80°C para facilitar la retención de las proteínas por las partículas poliméricas reticuladas;

(b) reemplazar la disolución que contiene la proteína por una disolución de aclarado;

(c) reemplazar la disolución de aclarado por una disolución de liberación eficaz para liberar las proteínas de las partículas poliméricas reticuladas en la disolución; y

(d) aislar la disolución de liberación que contiene la proteína.

en donde las etapas (a)-(c) ocurren en una columna cromatográfica que tiene una entrada y una salida.

Vista desde otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables, método que incluye:

(a) proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas;

(b) modificar químicamente las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas para proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización;

(c) poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica que incluye al menos un monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero y al menos un monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero, en donde dicho contacto inicia la polimerización de los monómeros; y

- 5 (d) aislar las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 muestra los isoterms de adsorción de lactoferrina para agarosa funcionalizada con poli(N-isopropilacrilamida-co-terc-butilacrilamida-co-ácido acrílico) (ItBA) y agarosa funcionalizada con carboximetilo (CM) a 20°C y 50°C, respectivamente.

La Figura 2 muestra los isoterms de adsorción de lactoperoxidasa para ItBA a 20°C y 50°C.

La Figura 3 muestra los isoterms de adsorción de papaína para ItBA a 20°C y 50°C.

La Figura 4 muestra el efecto de la concentración salina sobre la retención de lactoferrina en ItBA y CM a 20°C y 50°C, respectivamente.

- 15 La Figura 5 muestra el efecto de la concentración de sodio sobre la retención de lactoferrina en ItBA a 20°C y 50°C. Se muestran los resultados para 13 mM y 20 mM de sodio.

20 La Figura 6 incluye los cromatogramas producidos cuando se carga lactoferrina dinámicamente sobre CM (1) e ItBA (2), A: a 20°C durante 12 minutos (0-12 min), seguido de elución a 20°C durante 10 minutos (12-22 min), seguido de NaCl 0,1 M durante 10 minutos (23-33 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (35-45 min), B: a 50°C durante 12 minutos (0-12 min), seguido de elución a 20°C durante 10 minutos (12-22 min), seguido de NaCl 0,1 M durante 10 minutos (23-33 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (35-45 min), y C: a 50°C durante 12 minutos (0-12 min), seguido de elución a 50°C durante 10 minutos (12-22 min), seguido de NaCl 0,1 M durante 10 minutos (23-33 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (35-45 min).

25 La Figura 7 muestra la cantidad de lactoferrina retenida (mg/ml de resinas y % del total) por cuatro formulaciones de resina diferentes a temperaturas entre 4 y 50°C. Las resinas son poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) (IA), ItBA, poli(N-vinilcaprolactama-co-N-terc-butilacrilamida-co-ácido acrílico) (CtBA) y poli(N-isopropilacrilamida-co-N-terc-butilacrilamida-co-ácido acrílico) (IPhA).

30 La Figura 8 muestra los isoterms de adsorción para lactoferrina sobre agarosa reticulada funcionalizada con poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico). La mezcla de polimerización contenía 5% de ácido acrílico. Se muestran los resultados para 20°C y 50°C.

La Figura 9 muestra los isoterms de adsorción para lactoferrina sobre agarosa reticulada funcionalizada con poli(N-isopropilacrilamida-co-N-fenilacrilamida-co-ácido acrílico). La mezcla de polimerización contenía 5% de ácido acrílico. Se muestran los resultados para 4°C y 50°C.

35 La Figura 10 muestra los isoterms de adsorción para lactoferrina sobre agarosa reticulada funcionalizada con poli(N-isopropilacrilamida-co-N-fenilacrilamida-co-ácido acrílico). La mezcla de polimerización contenía 10% de ácido acrílico. Se muestran los resultados para 4°C y 50°C.

La Figura 11 muestra la cantidad de lactoferrina retenida por resinas poliméricas sensibles a la temperatura de ItBA y Toyopearl funcionalizadas con poli(N-isopropilacrilamida-co-terc-butilacrilamida-co-ácido acrílico) (Toyopearl-ItBA) a 20°C y 50°C.

40 La Figura 12 es el cromatograma producido cuando una mezcla de α -lactoalbúmina (12 mg), β -lactoglobulina (13 mg) y lactoferrina (24 mg) se cargó sobre una columna rellena con ItBA con fase móvil de tampón fosfato 10 mM a 20°C durante 12 min (0-12 min), seguido de elución a 20°C durante 10 min (12-22 min), seguido de aplicación de un gradiente de NaCl de 0 M a 0,1 M durante 30 min (22-52 min), y NaCl 1 M durante 14 min (52-66 min).

45 La Figura 13 es el cromatograma obtenido cuando una mezcla de α -lactoalbúmina (12 mg), β -lactoglobulina (13 mg) y lactoferrina (24 mg) se cargó sobre una columna rellena con ItBA con fase móvil de tampón fosfato 10 mM a 50°C durante 12 min (0-12 min), seguido de elución a 20°C durante 10 min (12-22 min), seguido de aplicación de un gradiente de NaCl de 0 M a 0,1 M durante 30 min (22-52 min), y NaCl 1 M durante 14 min (52-66 min).

La Figura 14 muestra la cantidad de Citocromo C retenido por el ItBA a 20°C y 50°C, respectivamente.

50 La Figura 15 muestra los cromatogramas obtenidos cuando cantidades similares de (i) lactoferrina sin otras proteínas, (ii) lactoferrina en una disolución de suero fresco, y (iii) lactoferrina en una disolución de suero concentrado (aproximadamente 10 veces) se cargaron dinámicamente y eluyeron de ItBA. Las disoluciones de muestra (1 ml) se cargaron sobre una columna rellena con 1,7 ml de ItBA en una fase móvil de tampón fosfato 10

mM a 50°C durante 12 min (0-12 min), seguido de elución con NaCl 0,1 M a 20°C durante 10 minutos (13-23 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (25-35 min).

5 La Figura 16 muestra la cantidad y porcentaje de lactoferrina retenida de una disolución que contiene sólo lactoferrina a diferentes concentraciones. La lactoferrina se cargó sobre una columna rellena con 1,7 ml de ItBA en una fase móvil de tampón fosfato 10 mM a 50°C durante 12 min (0-12 min), seguido de elución con NaCl 0,1 M a 20°C durante 10 minutos (13-23 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (25-35 min).

10 La Figura 17 muestra la cantidad y el porcentaje de lactoferrina retenida de una disolución de suero de cuajo fresco que contenía lactoferrina a diferentes concentraciones. El suero se cargó sobre una columna rellena con 1,7 ml de ItBA en una fase móvil de tampón fosfato 10 mM a 50°C durante 12 min (0-12 min), seguido de elución con NaCl 0,1 M a 20°C durante 10 minutos (13-23 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (25-35 min).

La Figura 18 muestra la cantidad y el porcentaje de lactoferrina retenida de un suero de cuajo concentrado real que contenía lactoferrina a diferentes concentraciones. El suero concentrado se cargó sobre una columna rellena con 1,7 ml de ItBA en una fase móvil de tampón fosfato 10 mM a 50°C durante 12 min (0-12 min), seguido de elución con NaCl 0,1 M a 20°C durante 10 minutos (13-23 min), y NaCl 1 M durante 10 minutos (25-35 min).

15 Descripción detallada de la invención

20 “Proteínas”, como se definen en la presente memoria, son compuestos orgánicos compuestos por aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos aminoácidos adyacentes. Las proteínas están formadas típicamente a partir de los veinte aminoácidos estándar, pero pueden incluir otras variantes, tales como selenocisteína y pirrolisina, u otros restos químicos producidos sintéticamente. Las proteínas pueden ser moléculas únicas, o bien, alternativamente, pueden estar asociadas con una o más otras proteínas o moléculas para formar complejos proteicos estables. Las proteínas en la invención pueden ser nativas, producidas por métodos de ingeniería genética y fermentación de cultivos celulares o pueden haber sido modificadas químicamente o físicamente. Las proteínas usadas en la invención pueden existir en una, dos o múltiples isoformas.

25 La expresión “disolución de proteínas” se interpreta que es cualquier líquido acuoso o no acuoso en el que están presentes moléculas de proteínas. La disolución de proteínas puede incluir o no moléculas biológicas adicionales, solutos, co-disolventes, tampones o aditivos. Puede contener sólo uno o más de un tipo de proteína. La disolución de proteínas puede ser un producto o subproducto de otro proceso, y puede ser un líquido existente en la naturaleza o sintético. Las proteínas en la disolución de proteínas pueden existir en forma simple o en forma agregada. La disolución de suero y disolución de suero concentrado son ejemplos de disoluciones de proteínas.

35 “Polímeros sensibles a la temperatura”, como se definen en la presente memoria, son polímeros que tienen una temperatura de disolución crítica (LCST, por sus siglas en inglés) más baja. La LCST de un polímero es la temperatura a la que se produce una transición de fases de la disolución del polímero, siendo típicamente la temperatura por encima de la cual el polímero ya no es soluble en un disolvente particular. La sensibilidad a la temperatura puede ser manipulada por integración de restos hidrófobos o hidrófilos en la estructura del polímero. La adición de restos hidrófobos o hidrófilos en la estructura se puede producir por modificación post-síntesis del polímero sensible a la temperatura, o mediante el uso de un comonomero en la síntesis del polímero que comunica bien una proporción de grupos hidrófilos o bien una proporción de grupos hidrófobos. La copolimerización de un monómero que da lugar a polímeros sensibles a la temperatura con monómeros hidrófilos conduce a un aumento en la hidrofiliidad del polímero y a un aumento en la LCST del polímero. En contraste, la copolimerización de un monómero que da lugar a polímeros sensibles a la temperatura con monómeros hidrófobos conduce a una disminución en la hidrofiliidad del polímero y a una disminución en la LCST del polímero. Los monómeros típicos que se usan para preparar polímeros sensibles a la temperatura incluyen N-isopropilacrilamida, éter vinilmetílico, N-vinilcaprolactama y N,N-dietilacrilamida. Los ejemplos de polímeros sensibles a la temperatura incluyen poli(N-isopropilacrilamida), poli(éter vinilmetílico).

45 El término “monómero”, como se define en la presente memoria, se interpreta que es cualquier molécula química a partir de la cual se puede formar un polímero que contiene una pluralidad de unidades repetidas derivadas del monómero. Los monómeros usados en la presente invención incluyen típicamente los que tienen un grupo insaturado que puede sufrir polimerización por un mecanismo de radicales, catiónico o aniónico. Los monómeros usados en la invención son típicamente miembros de las familias de los acrilatos, metacrilatos, estirénicos, acrilamida o metacrilamida. Otros monómeros que pueden ser adecuados para el uso con la invención incluyen monómeros de las familias alílicas y vinílicas. El término “unidad monomérica” es para ser interpretado que es la unidad repetida en un polímero o copolímero que surge de la polimerización del monómero correspondiente.

55 La expresión “monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero” se interpreta que hace referencia a cualquier monómero conocido en la técnica por formar un polímero sensible a la temperatura cuando es polimerizado, bien cuando es homo- o bien co-polimerizado. Los ejemplos de monómeros capaces de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero incluyen N-isopropilacrilamida, éter vinilmetílico o N-vinilcaprolactama. En una realización específica el monómero capaz de proporcionar

propiedades de sensibilidad a la temperatura es N-isopropilacrilamida. La expresión “unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero” se interpreta que se refiere a las unidades monoméricas en el copolímero que derivan del monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero.

5 La expresión “grupos químicos ionizables” incluye cualquier resto químico que puede dar lugar a un resto cargado. La especie puede llegar a ser cargada como resultado de protonación (tal como de un grupo amina para formar un grupo amonio), o por desprotonación (tal como de un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico para formar un grupo carboxilato o un grupo sulfonato). Otros grupos químicos ionizables pueden ser grupos químicos que se ionizan en un entorno acuoso, tales como polisales poliméricas de cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos (tales como acrilato de sodio, acrilato de calcio o acrilato de litio).

10 La expresión “monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero” incluye cualquier monómero que, cuando es incorporado en un polímero, proporciona grupos químicos colgantes a o sobre ese polímero que son capaces de llegar a ionizarse y de este modo proporcionar un resto cargado en el polímero. Los ejemplos típicos de unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero incluyen ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico, 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, N,N-dimetilaminopropilacrilamida, metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio. En una realización específica el monómero que proporciona grupos químicos ionizables es ácido acrílico. La expresión “unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero” se refiere a las unidades en el copolímero derivadas del monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero.

20 “Monómero bifuncional” se interpreta que se refiere a monómeros que tienen dos grupos insaturados, cada uno capaz de participar en una reacción de polimerización. Los monómeros bifuncionales pueden ser, pero no se necesita que sean, simétricos. Los monómeros bifuncionales típicos usados en la invención incluyen dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de 1,4-butanodiol, dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de 1,4-butanodiol, diacrilato de 1,6-hexanodiol, y N,N-metilenbisacrilamida. La expresión “unidad monomérica bifuncional” se interpreta que se refiere a la unidad repetida en un polímero o copolímero que surge de la polimerización de la unidad monomérica bifuncional correspondiente.

25 La(s) “unidad(es) monomérica(s) adicional(es)” se interpreta que es (son) cualquier unidad monomérica adicional incorporada en el copolímero sensible a la temperatura. El monómero adicional se puede añadir para variar la hidrofiliidad y/o hidrofobicidad del polímero, o para afectar a la densidad de carga en el copolímero diluyendo las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables al copolímero. Los ejemplos típicos de la unidad monomérica adicional incluyen unidades acrilato de metilo, unidades acrilato de etilo, unidades acrilato de propilo, unidades acrilato de butilo, unidades metacrilato de metilo, unidades metacrilato de etilo, unidades metacrilato de propilo, unidades N-isopropilmetacrilamida, unidades metacrilato de butilo, unidades N-terc-butilacrilamida, unidades N,N-dimetilacrilamida, unidades N,N-dietilacrilamida, y unidades N-fenilacrilamida. En una realización específica, las unidades monoméricas adicionales son unidades N-terc-butilacrilamida.

30 La expresión “columna cromatográfica” incluye cualquier cilindro de vidrio, cerámica, metal o polímero a través del cual se hace pasar la disolución que contiene la proteína a ser separada. La columna cromatográfica puede alojar la pluralidad de partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con el polímero sensible a la temperatura. La columna puede ser parte de un sistema automatizado a través del cual la disolución de proteína, la disolución de aclarado y la disolución de liberación son bombeadas, o se puede usar manualmente, como con alimentación por gravedad y con un grifo convencional. La columna puede ser mantenida a cualquier temperatura específica alojando la columna dentro de una estufa o baño de temperatura controlada, o usando cualquier otro mecanismo de intercambio de calor conocido en la técnica. El baño de temperatura controlada puede ser un baño de agua de temperatura controlada o un baño de aceite de temperatura controlada. El fluido usado en el baño de temperatura controlada puede contener cualquier otro aditivo, como apreciaría el experto en la materia. La columna también puede tener la temperatura controlada conteniendo la columna en una camisa de intercambio de calor, a través de la cual se hace pasar un fluido de temperatura regulada. El fluido puede ser líquido o gaseoso. En algunas realizaciones el fluido es agua líquida. La columna puede tener cualesquiera dimensiones (longitud, diámetro interno, diámetro externo) según se juzgue necesario para una separación eficaz. Las dimensiones específicas usadas serán evidentes para alguien que tenga experiencia en la técnica.

35 La expresión “partícula polimérica”, como se emplea en la presente memoria, incluye cualquier partícula formada principalmente a partir de un polímero basado en carbono. Las partículas poliméricas pueden incluir polímeros sintéticos tales como los formados a partir de la polimerización de monómeros vinílicos, alílicos, acrílicos, metacrílicos, estirénicos, de acrilamido o metacrilamido, o pueden incluir material polisacárido o celulósico. Las partículas poliméricas usadas en la invención pueden ser hidrófilas o hidrófobas. Los ejemplos de partículas poliméricas usadas en la invención incluyen partículas de agarosa reticulada, partículas de celulosa reticulada, partículas poliméricas vinílicas reticuladas hidrófilas y partículas de resinas poliméricas basadas en metacrilato. En algunos ejemplos específicos la partícula polimérica reticulada se selecciona del grupo que consiste en Sepharose, Sephacel, Toyopearl, y Fractogel. En una realización específica de la invención, las partículas poliméricas reticuladas son partículas de agarosa reticulada tales como partículas de Sepharose.

La expresión "partícula polimérica hidroxílica", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier partícula polimérica en la que hay al menos un grupo hidroxilo. Las partículas poliméricas hidroxílicas pueden incluir polímeros sintéticos funcionalizados con hidroxilo, tales como los formados a partir de la polimerización de monómeros vinílicos, alílicos, acrílicos, metacrílicos, estirénicos, de acrilamido o metacrilamido apropiados, o pueden incluir un material polisacárido o celulósico. La funcionalidad hidroxilo puede ser comunicada al polímero por polimerización de un monómero o comonómero que tiene una funcionalidad hidroxilo o que tiene un precursor para una funcionalidad hidroxilo que puede ser convertido posteriormente en una funcionalidad hidroxilo. Alternativamente el polímero puede ser modificado en post-polimerización por cualquier medio químico o físico que pueda comunicar una funcionalidad hidroxilo al polímero. Las partículas poliméricas hidroxílicas para uso con la presente invención pueden ser partículas discretas o pueden estar unidas o fusionadas entre sí, o interconectadas por puentes, para formar una red continua de partículas poliméricas hidroxílicas. En algunas realizaciones de la invención las partículas poliméricas hidroxílicas pueden estar unidas, fusionadas o interconectadas entre sí para formar un llamado monolito. Las conexiones entre las partículas, en tal caso, pueden estar funcionalizadas en sí mismas con un polímero sensible a la temperatura, o pueden ser un material polimérico no modificado. Las partículas poliméricas hidroxílicas usadas en la invención pueden ser hidrófilas o hidrófobas. Los ejemplos de partículas poliméricas hidroxílicas usadas en la invención incluyen partículas de agarosa reticuladas, partículas de celulosa reticuladas, partículas poliméricas vinílicas reticuladas hidrófilas que tienen grupos hidroxilo, y partículas de resinas poliméricas basadas en metacrilato que tienen grupos hidroxilo. En algunos ejemplos específicos la partícula polimérica reticulada se selecciona del grupo que consiste en Sepharose, Sephacel, Toyopearl, y Fractogel. En una realización específica de la invención, las partículas poliméricas reticuladas son partículas de agarosa reticulada, tales como partículas de Sepharose.

En toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, el término "polimerización" y derivados del mismo, tales como "polimerizar" y "polimerizando", se interpreta que significan cualquier procedimiento de formación de moléculas poliméricas a partir de moléculas monoméricas. La polimerización se refiere no sólo a la situación donde hay un único tipo de monómero, sino también a situaciones en las que hay más de un tipo de monómero que conduce a la formación de un llamado "copolímero". La "polimerización" se interpreta que incluye polimerización por radicales libres, polimerización catiónica y polimerización aniónica. La polimerización también se interpreta que incluye aquellas variantes en las que hay aditivos adicionales en la reacción de polimerización, que incluye polimerización por transferencia de átomos, polimerización por radicales con transferencia de átomos, polimerización catalítica con transferencia de cadenas, polimerización con transferencia de cadenas, polimerización con transferencia de grupos, polimerización mediada por yodo, polimerización mediada por nitróxido, polimerización con transferencia de cadenas con fragmentación por adición reversible, polimerización tioiniferter, polimerización iniferter, polimerización por metátesis con apertura de anillos, polimerización por metátesis de dienos acíclicos y polimerización por metátesis de dienos alternantes.

"Grupos funcionales capaces de iniciar polimerización" se interpreta que incluyen cualquier resto químico que pueda dar lugar a una especie que sea capaz de iniciar la polimerización. En el caso de polimerización por transferencia de átomos, polimerización por radicales con transferencia de átomos, polimerización catalítica con transferencia de cadenas, polimerización con transferencia de cadenas, polimerización con transferencia de grupos, polimerización mediada por yodo, polimerización mediada por nitróxido, polimerización con transferencia de cadenas con fragmentación por adición reversible, polimerización por tioiniferter, polimerización iniferter, polimerización por metátesis con apertura de anillos, polimerización por metátesis de dienos acíclicos y polimerización por metátesis de dienos alternantes, los grupos funcionales capaces de iniciar la polimerización son aquellos grupos a partir de los cuales se puede formar un radical. En algunos casos la formación del radical se produce tras la elevación de la temperatura. En otros casos, la formación del radical es desencadenada por la aplicación de radiación ultravioleta. En aún otros casos el radical se forma mediante la aplicación de radiación ionizante, tal como radiación gamma o radiación de rayos X.

La presente invención proporciona métodos discontinuos y cromatográficos para la separación de proteínas. La presente invención también proporciona partículas poliméricas hidrófilas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables, y métodos para preparar las mismas.

A partir de un aspecto, la presente invención proporciona un método para aislar proteínas de una disolución que contiene las proteínas, método que incluye:

(a) poner en contacto la disolución que contiene las proteínas con partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables y dicho contacto ocurre a una temperatura entre 30°C y 80°C para facilitar la retención de las proteínas por las partículas de polímero reticulado;

(b) reemplazar la disolución que contiene la proteína por una disolución de aclarado; y

(c) reemplazar la disolución de aclarado por una disolución de liberación eficaz para liberar las proteínas de las partículas poliméricas reticuladas en la disolución; y

(d) aislar la disolución de liberación que contiene la proteína.

5 En algunas realizaciones, la temperatura de la disolución de liberación es más baja que la temperatura a la que la disolución que contiene las proteínas se puso en contacto con las partículas poliméricas reticuladas. En algunos casos, la disolución de proteínas y la disolución de aclarado están a una temperatura entre 30°C y 60°C. En otros casos, la disolución de proteínas y la disolución de aclarado están a una temperatura entre 40°C y 60°C. En algunas realizaciones la disolución de liberación está a una temperatura entre 0°C y 30°C. En otras realizaciones, la disolución de liberación está a una temperatura entre 0°C y 20°C.

10 En algunas realizaciones, la disolución de liberación contiene un soluto iónico. El soluto iónico puede ser cualquier soluto iónico conocido en la técnica que sea soluble en la disolución de liberación. En algunas realizaciones preferidas el soluto iónico es un haluro de metal alcalino o haluro de metal alcalinotérreo. En una realización más preferida, el soluto iónico es un haluro de litio, sodio o potasio. En una realización incluso más preferida el soluto iónico es cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, bromuro de litio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, yoduro de litio, yoduro de potasio o yoduro de sodio. En algunas realizaciones el soluto iónico se selecciona de cloruro de sodio y cloruro de potasio. En algunas realizaciones específicas el soluto iónico es cloruro de sodio.

15 En aún otra realización de la invención el copolímero sensible a la temperatura incluye:

(i) unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero; y

(ii) unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero.

20 En algunas realizaciones, las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero se pueden seleccionar del grupo que consiste en unidades N-isopropilacrilamida, unidades éter vinilmetílico y unidades N-vinilcaprolactama. En una realización específica, las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero son unidades N-isopropilacrilamida.

25 Los ejemplos preferidos de unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables se pueden seleccionar del grupo que consiste en unidades ácido acrílico, unidades ácido metacrílico, unidades ácido etacrílico, unidades 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, unidades 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, unidades cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, unidades N,N-dimetilaminopropilacrilamida, unidades metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, unidades acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y unidades cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio. En una realización específica las unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables son unidades ácido acrílico.

30 En una realización adicional de la invención, el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica bifuncional. La unidad monomérica bifuncional se puede seleccionar del grupo que consiste en unidades dimetacrilato de etilenglicol, unidades dimetacrilato de 1,4-butanodiol, unidades dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, unidades diacrilato de etilenglicol, unidades diacrilato de 1,4-butanodiol, unidades diacrilato de 1,6-hexanodiol, y unidades N,N-metilenbisacrilamida. En una realización específica las unidades monoméricas bifuncionales son unidades N,N-metilenbisacrilamida.

35 En aún otra realización de la invención el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica adicional. La(s) unidad(es) monomérica(s) adicional(es) se puede(n) seleccionar del grupo que consiste en unidades acrilato de metilo, unidades acrilato de etilo, unidades acrilato de propilo, unidades acrilato de butilo, unidades metacrilato de metilo, unidades metacrilato de etilo, unidades metacrilato de propilo, unidades N-isopropilmetacrilamida, unidades metacrilato de butilo, unidades N-terc-butilacrilamida, unidades N,N-dimetilacrilamida, unidades N,N-dietilacrilamida, y unidades N-fenilacrilamida. En algunas realizaciones específicas, las unidades monoméricas adicionales son unidades N-terc-butilacrilamida. En otras realizaciones específicas las unidades monoméricas adicionales son unidades N-fenilacrilamida.

45 En algunas realizaciones de la invención las partículas poliméricas reticuladas se pueden seleccionar del grupo que consiste en partículas de agarosa reticuladas, partículas de celulosa reticuladas, partículas poliméricas vínicas reticuladas hidrófilas y partículas de resinas poliméricas basadas en metacrilato. En algunas realizaciones de la invención la partícula polimérica reticulada se selecciona del grupo que consiste en Sepharose, Sephacel, Toyopearl, y Fractogel. En una realización específica de la invención, las partículas poliméricas reticuladas son partículas de agarosa reticuladas tales como partículas de Sepharose.

50 En algunas realizaciones, las proteínas son aisladas de la disolución por un método cromatográfico. Por tanto, un aspecto adicional de la invención es proporcionar métodos cromatográficos para la separación de proteínas.

A partir de un aspecto, la presente invención proporciona un método para aislar proteínas de una disolución que contiene las proteínas, método que incluye:

55 (a) poner en contacto la disolución que contiene las proteínas con partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables y dicho contacto ocurre a una temperatura entre 30°C y 80°C para facilitar

la retención de las proteínas por las partículas poliméricas reticuladas;

(b) reemplazar la disolución que contiene la proteína por una disolución de aclarado;

(c) reemplazar la disolución de aclarado por una disolución de liberación eficaz para liberar las proteínas de las partículas poliméricas reticuladas en la disolución; y

5 (d) aislar la disolución de liberación que contiene la proteína.

en donde las etapas (a)-(c) ocurren en una columna cromatográfica que tiene una entrada y una salida.

En algunas realizaciones, la temperatura de la disolución de liberación es más baja que la temperatura a la que la disolución que contiene las proteínas se puso en contacto con las partículas de polímero reticulado. En algunos casos, la disolución de proteínas y la disolución de aclarado están a una temperatura entre 30°C y 60°C. En otros casos, la disolución de proteínas y la disolución de aclarado están a una temperatura entre 40°C y 60°C. En algunas realizaciones la disolución de liberación está a una temperatura entre 0°C y 30°C. En otras realizaciones, la disolución de liberación está a una temperatura entre 0°C y 20°C.

En algunas realizaciones, las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura se incluyen en el camino entre la entrada y la salida.

15 En algunas realizaciones, la disolución que contiene las proteínas, la disolución de aclarado y la disolución de liberación pueden ser introducidas secuencialmente a través de la entrada y recogidas por la salida. En algunas realizaciones, la disolución producto puede ser recogida en alícuotas volumétricas discretas. En aún otras realizaciones se determina la concentración de la proteína en cada alícuota. En aún una realización adicional, la concentración de la proteína en la disolución de liberación se mide continuamente.

20 En algunas realizaciones, la disolución de liberación contiene un soluto iónico. El soluto iónico puede ser cualquier soluto iónico conocido en la técnica que sea soluble en la disolución de liberación. En algunas realizaciones preferidas el soluto iónico es un haluro de metal alcalino o haluro de metal alcalinotérreo. En una realización más preferida, el soluto iónico es un haluro de litio, sodio o potasio. En una realización incluso más preferida el soluto iónico es cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, bromuro de litio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, yoduro de litio, yoduro de potasio o yoduro de sodio. En algunas realizaciones el soluto iónico se selecciona de cloruro de sodio y cloruro de potasio. En algunas realizaciones específicas el soluto iónico es cloruro de sodio.

25 En algunas realizaciones de la invención, la disolución que contiene las proteínas, la disolución de aclarado y la disolución de liberación son introducidas en la columna cromatográfica por bombeo. En otras realizaciones, la disolución que contiene las proteínas, la disolución de aclarado y la disolución de liberación son introducidas por gravedad.

30 En algunas realizaciones de la invención el copolímero sensible a la temperatura incluye:

(i) unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero; y

(ii) unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero.

35 Las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero se pueden seleccionar del grupo que consiste en unidades N-isopropilacrilamida, unidades éter vinilmetílico y unidades N-vinilcaprolactama. En una realización específica las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero son unidades N-isopropilacrilamida.

40 Las unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables se pueden seleccionar del grupo que consiste en unidades ácido acrílico, unidades ácido metacrílico, unidades ácido etacrílico, unidades 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, unidades 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, unidades cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, unidades N,N-dimetilaminopropilacrilamida, unidades metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, unidades acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y unidades cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio. En una realización específica las unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables son unidades ácido acrílico.

45 En una realización adicional de la invención, el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica bifuncional. La unidad monomérica bifuncional se puede seleccionar del grupo que consiste en unidades dimetacrilato de etilenglicol, unidades dimetacrilato de 1,4-butanodiol, unidades dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, unidades diacrilato de etilenglicol, unidades diacrilato de 1,4-butanodiol, unidades diacrilato de 1,6-hexanodiol, y unidades N,N-metilenbisacrilamida. En una realización específica las unidades monoméricas bifuncionales son unidades N,N-metilenbisacrilamida.

50 En aún otra realización de la invención el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica adicional. La(s) unidad(es) monomérica(s) adicional(es) se puede(n) seleccionar del grupo que consiste en unidades acrilato de metilo, unidades acrilato de etilo, unidades acrilato de propilo, unidades acrilato de butilo,

- 5 unidades metacrilato de metilo, unidades metacrilato de etilo, unidades metacrilato de propilo, unidades N-isopropilmetacrilamida, unidades metacrilato de butilo, unidades N-terc-butilacrilamida, unidades N,N-dimetilacrilamida, unidades N,N-dietilacrilamida, y unidades N-fenilacrilamida. En algunas realizaciones específicas, las unidades monoméricas adicionales son unidades N-terc-butilacrilamida. En otras realizaciones específicas las unidades monoméricas adicionales son unidades N-fenilacrilamida.
- 10 En algunas realizaciones de la invención las partículas poliméricas reticuladas se pueden seleccionar del grupo que consiste en partículas de agarosa reticuladas, partículas de celulosa reticuladas, partículas poliméricas vinílicas reticuladas hidrófilas y partículas de resinas poliméricas basadas en metacrilato. En algunas realizaciones de la invención la partícula polimérica reticulada se selecciona del grupo que consiste en Sepharose, Sephacel, Toyopearl, y Fractogel. En una realización específica de la invención, las partículas poliméricas reticuladas son partículas de agarosa reticulada tales como partículas de Sepharose.
- 15 En algunas realizaciones la proteína a ser separada se selecciona del grupo que consiste en Citocromo C, lactoferrina, papaina y lactoperoxidasa. En una realización específica la proteína es lactoferrina.
- Un aspecto adicional de la invención es proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables. En algunas realizaciones, el copolímero sensible a la temperatura incluye:
- (i) unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero; y
- (ii) unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero.
- 20 Las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero se pueden seleccionar del grupo que consiste en unidades N-isopropilacrilamida, unidades éter vinilmetílico y unidades N-vinilcaprolactama. En una realización específica las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero son unidades N-isopropilacrilamida.
- 25 Las unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables se pueden seleccionar del grupo que consiste en unidades ácido acrílico, unidades ácido metacrílico, unidades ácido etacrílico, unidades 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, unidades 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, unidades cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, unidades N,N-dimetilaminopropilacrilamida, unidades metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, unidades acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y unidades cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio. En una realización específica las unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables son unidades ácido acrílico.
- 30 En una realización adicional de la invención, el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica bifuncional. La unidad monomérica bifuncional se puede seleccionar del grupo que consiste en unidades dimetacrilato de etilenglicol, unidades dimetacrilato de 1,4-butanodiol, unidades dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, unidades diacrilato de etilenglicol, unidades diacrilato de 1,4-butanodiol, unidades diacrilato de 1,6-hexanodiol, y unidades N,N-metilenbisacrilamida. En una realización específica las unidades monoméricas bifuncionales son unidades N,N-metilenbisacrilamida.
- 35 En aún otra realización de la invención el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica adicional. La(s) unidad(es) monomérica(s) adicional(es) se puede(n) seleccionar del grupo que consiste en unidades acrilato de metilo, unidades acrilato de etilo, unidades acrilato de propilo, unidades acrilato de butilo, unidades metacrilato de metilo, unidades metacrilato de etilo, unidades metacrilato de propilo, unidades N-isopropilmetacrilamida, unidades metacrilato de butilo, unidades N-terc-butilacrilamida, unidades N,N-dimetilacrilamida, unidades N,N-dietilacrilamida, y unidades N-fenilacrilamida. En algunas realizaciones específicas, las unidades monoméricas adicionales son unidades N-terc-butilacrilamida. En otras realizaciones específicas las unidades monoméricas adicionales son unidades N-fenilacrilamida.
- 40 En algunas realizaciones el polímero hidroxílico reticulado se puede seleccionar del grupo que consiste en agarosa reticulada, celulosa reticulada, polímero vinílico reticulado hidrófilo, polímero vinílico reticulado hidroxifuncional, polímero acrílico reticulado hidroxifuncional y polímero metacrílico reticulado hidroxifuncional. En realizaciones preferidas el polímero hidroxílico reticulado es agarosa reticulada o polímero vinílico reticulado hidrófilo. En una realización específica el polímero hidroxílico reticulado es agarosa reticulada.
- 45 Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un método para preparar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables, método que incluye:
- (a) proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas;
- (b) modificar químicamente las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas para proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización;
- 55

(c) poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica que incluye al menos un monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero y al menos un monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero, en donde dicho contacto inicia la polimerización de los monómeros;

- 5 (d) aislar las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables.

En algunas realizaciones, la etapa de modificar químicamente las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas para proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas activadas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización incluye las etapas de :

- 10 (i) Funcionalizar las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas con un grupo epóxido;
- (ii) Hacer reaccionar el grupo epóxido con amoniaco para proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con grupos amina;
- (iii) Hacer reaccionar los grupos amina con un iniciador de polimerización que tiene al menos un grupo ácido carboxílico.

- 15 En una realización específica de la invención, la etapa de funcionalizar las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas con un grupo epóxido incluye hacer reaccionar partículas poliméricas hidroxílicas con epíclorohidrina en presencia de hidróxido de sodio y borohidruro de sodio. En una realización adicional, la etapa de hacer reaccionar los grupos amina con un iniciador de polimerización que tiene un grupo ácido carboxílico se realiza en presencia de un agente de condensación. En una realización específica el agente de condensación es 1-(etoxicarbonil)-2-etoxi-
20 1,2-dihidroquinolina.

- En algunas realizaciones el iniciador de polimerización que tiene al menos un grupo ácido carboxílico es un iniciador de peroxi con un grupo ácido carboxílico. En otras realizaciones el iniciador de polimerización que tiene al menos un grupo ácido carboxílico es un iniciador azo con un grupo ácido carboxílico. En aún otras realizaciones el iniciador de polimerización que tiene al menos un grupo ácido carboxílico es un fotoiniciador con un grupo ácido carboxílico. En algunas realizaciones de la invención, el iniciador de polimerización que tiene al menos un grupo ácido carboxílico es 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico).
- 25

El monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura se puede seleccionar del grupo que consiste en N-isopropilacrilamida, éter vinilmetílico o N-vinilcaprolactama. En una realización específica el monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura es N-isopropilacrilamida.

- 30 El monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico, 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, N,N-dimetilaminopropilacrilamida, metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio. En una realización específica el monómero que proporciona grupos químicos ionizables es ácido acrílico.

- 35 En una realización adicional de la invención, la disolución monomérica incluye además al menos un monómero bifuncional. El monómero bifuncional se puede seleccionar del grupo que consiste en dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de 1,4-butanodiol, dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de 1,4-butanodiol, diacrilato de 1,6-hexanodiol, y N,N-metilenbisacrilamida. En una realización específica el monómero bifuncional es N,N-metilenbisacrilamida.

- 40 En aún otra realización de la invención la disolución monomérica incluye además al menos un monómero adicional. El (los) monómero(s) adicional(es) se puede(n) seleccionar del grupo que consiste en acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de butilo, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de propilo, N-isopropilmetacrilamida, metacrilato de butilo, N-terc-butilacrilamida, N,N-dimetilacrilamida, N,N-dietilacrilamida, y N-fenilacrilamida. En algunas realizaciones específicas, el monómero adicional es N-terc-butilacrilamida. En otras realizaciones específicas el monómero adicional es N-fenilacrilamida.
- 45

- La etapa de poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica que incluye al menos un monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero y al menos un monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero ocurre típicamente a una temperatura a la cual los grupos capaces de iniciar polimerización inician la polimerización. La temperatura específica elegida dependerá del grupo funcional específico capaz de iniciar polimerización, y será fácilmente evidente para alguien que tenga experiencia en la técnica. En algunas realizaciones la temperatura será la temperatura ambiente. En otras realizaciones la temperatura se puede elegir del grupo que consiste en 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C,
- 50
- 55

94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C y 100°C. En una realización específica la temperatura es 80°C. Como apreciará alguien que tenga experiencia habitual en la técnica, la densidad de los grupos iniciadores en las partículas puede ser variada.

5 En otras realizaciones la etapa de poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica ocurre bajo luz ultravioleta. En aún otras realizaciones la etapa de poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica ocurre bajo radiación ionizante. En aún otras realizaciones la etapa de poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica ocurre bajo radiación gamma. En aún otras realizaciones la etapa de poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución monomérica ocurre bajo radiación de rayos X.

15 El destinatario experto apreciará que la invención puede ser modificada para su aplicación a la separación de proteínas cargadas positivamente y negativamente. Por ejemplo, el uso de un monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero en donde esos grupos ionizables llevan una carga negativa cuando son ionizados será aplicable en la separación de proteínas que tengan una carga positiva. De manera inversa, el uso de un monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero en donde esos grupos ionizables llevan una carga positiva cuando son ionizados será aplicable en la separación de proteínas que tengan una carga negativa.

20 Como apreciará el destinatario experto, la retención de las proteínas por las partículas reticuladas funcionalizadas significa que las proteínas se asocian con las partículas hasta el punto en que son retiradas de la disolución a ser purificada. El destinatario experto apreciará también que, además de interacciones electrostáticas (es decir, positivo/negativo) entre las partículas y las proteínas, pueden ocurrir otras interacciones entre las partículas y las proteínas. Por ejemplo, interacciones metal-ligando, interacciones hidrófobas, interacciones por enlaces de hidrógeno, interacciones de estereocomplejación o interacciones de transferencia de carga también pueden contribuir a la interacción entre las proteínas y las partículas de la invención que causa la retención de las proteínas en las partículas de la invención.

30 La temperatura a la que la disolución de proteínas se pone en contacto con las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables puede ser variada según sea apropiado para el copolímero sensible a la temperatura particular y la proteína particular que se separa. La temperatura será tal que una proporción de la proteína será retenida por las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas. Típicamente la temperatura estará entre 30°C y 80°C. En algunas realizaciones la temperatura estará entre 30°C y 60°C, y en realizaciones adicionales la temperatura estará entre 45°C y 55°C. En algunas realizaciones la temperatura a la que la disolución de proteínas se pone en contacto con las partículas poliméricas reticuladas se elige del grupo que consiste en 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C y 80°C. En otras realizaciones, la temperatura se elige del grupo que consiste en 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C y 60°C. En aún otras realizaciones, la temperatura se elige del grupo que consiste en 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C y 55°C. En algunas realizaciones específicas, la temperatura a la que la proteína se pone en contacto con las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas es 50°C. En otras realizaciones específicas, la temperatura a la que la proteína se pone en contacto con las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas es 40°C. En aún otras realizaciones específicas, la temperatura a la que la proteína se pone en contacto con las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas es 60°C.

50 La exposición posterior de las partículas a la disolución de aclarado puede tener lugar a la misma temperatura que el contacto original con la disolución de proteínas, a temperatura más alta o a temperatura más baja. La temperatura de la disolución de aclarado es tal que una proporción de la proteína será retenida por las partículas poliméricas funcionalizadas mientras las partículas son expuestas a la disolución de aclarado. Típicamente la temperatura de la disolución de aclarado estará entre 30°C y 80°C. En algunas realizaciones la temperatura estará entre 30°C y 60°C, y en realizaciones adicionales la temperatura estará entre 45°C y 55°C. En algunas realizaciones la temperatura de la disolución de aclarado se elige del grupo que consiste en 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C y 60°C. En aún otras realizaciones, la temperatura de la disolución de aclarado se elige del grupo que consiste en 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C y 55°C. En algunas realizaciones específicas, la temperatura de la disolución de aclarado es 50°C. En otras realizaciones específicas, la temperatura de la disolución de aclarado es 40°C. En aún otras realizaciones, la temperatura de la disolución de aclarado es 60°C.

La exposición posterior de las partículas a la disolución de liberación tiene lugar típicamente a una temperatura más baja que el contacto original con la disolución de proteínas. La temperatura de la disolución de liberación es tal que una proporción de la proteína es liberada de las partículas poliméricas funcionalizadas en la disolución de liberación. Típicamente la temperatura de la disolución de liberación estará entre 0°C y 80°C. En algunas realizaciones la temperatura estará entre 0°C y 30°C. En otras realizaciones la temperatura estará entre 0°C y 20°C. En aún otras realizaciones la temperatura estará entre 0°C y 10°C. En algunas realizaciones la temperatura de la disolución de liberación se elige del grupo que consiste en 0°C, 1°C, 2° C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C y 30°C. En otras realizaciones la temperatura de la disolución de liberación se elige del grupo que consiste en 0°C, 1°C, 2° C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C y 20°C. En aún otras realizaciones la temperatura de la disolución de liberación se elige del grupo que consiste en 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C y 10°C. En algunas realizaciones específicas la temperatura de la disolución de liberación es 20°C. En otras realizaciones específicas la temperatura de la disolución de liberación está entre 0°C y 4°C.

En algunos casos la disolución de liberación no contiene soluto iónico. En algunos casos la disolución de liberación contiene un soluto iónico. El soluto iónico puede ser cualquier soluto iónico conocido en la técnica que sea soluble en la disolución de liberación. En algunas realizaciones preferidas el soluto iónico es un haluro de metal alcalino o haluro de metal alcalinotérreo. En una realización más preferida, el soluto iónico es un haluro de litio, sodio o potasio. En una realización incluso más preferida el soluto iónico es cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, bromuro de litio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, yoduro de litio, yoduro de potasio o yoduro de sodio. En una realización muy preferida el soluto iónico es cloruro de sodio.

En algunos casos es deseable variar la concentración del soluto iónico en la disolución de liberación cuando se pone en contacto con las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables. La concentración del soluto iónico en la disolución de liberación puede ser cualquier concentración entre 0 M y 2 M. En algunas realizaciones la concentración del soluto iónico en la disolución de liberación puede ser cualquier concentración entre 0 M y 1 M. En algunas realizaciones particulares la concentración del soluto iónico puede ser variada de 0 M a 0,01 M a 0,1 M a 1,0 M. La variación puede ser continua, incremental o por etapas. En algunas realizaciones específicas la concentración es variada por etapas de 0 M a 0,1 M a 1,0 M de NaCl.

La proporción de unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero, unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero, unidades monoméricas bifuncionales y unidades monoméricas adicionales puede ser variada dependiendo de las condiciones de operación específicas requeridas y/o los requisitos de la proteína a separar. En algunas realizaciones, la unidad monomérica bifuncional puede ser omitida. En otras realizaciones, la unidad monomérica adicional puede ser omitida. En aún otras realizaciones, tanto la unidad monomérica bifuncional como la unidad monomérica adicional son omitidas. En algunas realizaciones, la relación de las unidades monoméricas sensibles a la temperatura a las unidades monoméricas adicionales a las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables es de 80:10:10 a 98:1:1. En otras realizaciones, la relación de las unidades monoméricas sensibles a la temperatura a las unidades monoméricas adicionales a las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables es de 84:8:8 a 96:2:2. En algunas realizaciones específicas, las unidades monoméricas sensibles a la temperatura son unidades N-isopropilacrilamida, las unidades monoméricas adicionales son unidades terc-butilacrilamida y las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables son unidades ácido acrílico y la relación de las unidades N-isopropilacrilamida:unidades terc-butilacrilamida:unidades ácido acrílico es de 80:10:10 a 98:1:1. En otras realizaciones específicas, las unidades monoméricas sensibles a la temperatura son unidades N-isopropilacrilamida, las unidades monoméricas adicionales son unidades N-fenilacrilamida y las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables son unidades ácido acrílico, y la relación de las unidades N-isopropilacrilamida:unidades N-fenilacrilamida:unidades ácido acrílico es de 80:10:10 a 98:1:1. En algunas otras realizaciones específicas, las unidades monoméricas sensibles a la temperatura son unidades N-isopropilacrilamida, las unidades monoméricas adicionales son unidades terc-butilacrilamida y las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables son unidades ácido acrílico, y la relación de las unidades N-isopropilacrilamida:unidades N-fenilacrilamida:unidades ácido acrílico es de 84:8:8 a 96:2:2. En aún otras realizaciones específicas, las unidades monoméricas sensibles a la temperatura son unidades N-isopropilacrilamida, las unidades monoméricas adicionales son unidades N-fenilacrilamida y las unidades monoméricas que proporcionan grupos ionizables son unidades ácido acrílico, y la relación de las unidades N-isopropilacrilamida : unidades N-fenilacrilamida : unidades ácido acrílico es de 84:8:8 a 96:2:2.

Los métodos de la invención se pueden aplicar en la separación de cualquier proteína de interés en las industrias alimentarias, farmacéuticas, químicas y del agua, o cualquier otra industria. Las proteínas que pueden ser adecuadas para la separación por la invención incluyen anticuerpos; proteínas no anticuerpo; inmunoglobulinas; proteínas similares a inmunoglobulinas; factores de crecimiento no humanos; enzimas; hormonas; citocinas; proteínas Fc-derivadas; y antígenos recombinantes. Otros candidatos incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor de células madre, leptina, factores hematopoyéticos, factores de crecimiento no humanos, factores antiobesidad, factores tróficos, factores antiinflamatorios, receptores o receptores solubles, enzimas, variantes, derivados o análogos de cualquiera de estas proteínas. Otros ejemplos incluyen insulina,

gastrina, prolactina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), motilina, interferones (alfa, beta, gamma, omega), interleucinas (IL-1 a IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TNF- β), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico 3 (NT3), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento neurotrófico (NGF), factores de crecimiento de los huesos tales como osteoprotegerina (OPG), factores de crecimiento similares a insulina (IGFs), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF), factor de crecimiento derivado de megacariocitos (MGDF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), eritropoyetina, trombopoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGDF), factores de crecimiento estimulantes de colonias (CSFs), proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa (SOD), urocinasa, estreptocinasa, o kalikreína, receptores o receptores solubles, enzimas, variantes, derivados o análogos de cualquiera de estas proteínas. Otros ejemplos incluyen albúmina, albúmina de suero, insulina, ribonucleasa A, mioglobina, quimotripsina, tripsina, quimotripsinógeno, hemoglobina, hexocinasa, inmunoglobulina G, ARN polimerasa, ADN polimerasa, apolipoproteína B, glutamato deshidrogenasa, lipoproteínas, glicoproteínas, hemoproteínas, flavoproteínas y metaloproteínas. En algunas realizaciones preferidas las proteínas adecuadas para la separación con la invención incluyen lactoferrina, lactoperoxidasa y papaína. En algunas realizaciones específicas de la invención la proteína es lactoferrina.

Un rasgo de la invención es que los grupos ionizables son proporcionados por la incorporación de unidades monoméricas que tienen grupos químicos ionizables como parte del copolímero sensible a la temperatura (es decir, no de o por modificación de la partícula polimérica hidroxilica sustrato). Esto es distinto de otras estrategias en las que puede haber modificación independiente de las partículas sustrato para proporcionar grupos ionizables que sean independientes del copolímero sensible a la temperatura. Por ejemplo, en el caso de partículas de agarosa funcionalizadas con poli(N-isopropilacrilamida-co-terc-butilacrilamida-co-ácido acrílico), los grupos ionizables son proporcionados por las unidades monoméricas ácido acrílico en el polímero, en lugar de por modificación directa de la partícula sustrato de agarosa.

La partícula polimérica funcionalizada con un copolímero sensible a la temperatura que tiene una proporción de grupos químicos ionizables puede ser estable para las condiciones alcalinas de limpieza empleadas en las industrias alimentarias, farmacéuticas, químicas, del agua y otras. Adicionalmente, la naturaleza de la partícula polimérica puede ser variada para adaptarse a variables de proceso, tales como extremos de pH o altas concentraciones de soluto.

Ejemplos

Materiales

Las partículas de agarosa reticuladas (Sephacrose[®] 6 fast flow) se obtuvieron de Pharmacia Biotech (Suecia), la muestra de lactoferrina fue proporcionada por Ford Science Australia (Weribee). La N-isopropilacrilamida (97%), terc-butilamida (97%), ácido acrílico ($\geq 98\%$), 1-(etoxicarbonil)-2-etoxi-1,2-dihidro-quinolina ($\geq 99\%$), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) ($\geq 98\%$), N,N-dimetilformamida ($\geq 99,8\%$) y N,N'-metilbisacrilamida ($\geq 98\%$) se obtuvieron de Sigma Aldrich (EE.UU.).

Preparación de las partículas de agarosa reticuladas de la invención

Un iniciador de polimerización, 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (ACV), fue inmovilizado covalentemente sobre la Sepharose 6 FF aminofuncionalizada usando N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente y 1-(etoxicarbonil)-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) como agente de condensación (adaptado de Yakushiji et al., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1125-1130). Se desarrolló una matriz polimérica reticulada en la Sepharose con ACV inmovilizado por polimerización por radicales usando N-isopropilacrilamida (NIPAAm), ácido acrílico (AAc) y terc-butilacrilamida (tBAAm) como monómeros y N,N'-metilbisacrilamida (MBBA) como agente de reticulación. Las partículas se designaron como ItBA.

Los detalles de las etapas de la síntesis son como se describe a continuación.

1. Aminofuncionalización de Sepharose 6 FF

1.1 Activación de Sepharose 6 FF con epíclorohidrina

Se recogió Sepharose 6 FF (100 g) en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con agua destilada (5 x el volumen de gel húmedo). El gel lavado se secó por succión y se transfirió a una botella Schott de 500 ml. Se añadió una disolución de NaOH 2 M (100 ml) que contenía NaBH₄ (0,187 g) y la suspensión se mezcló a 28°C durante 2 h en una plataforma basculante a una velocidad de 175 rpm. Se añadió epíclorohidrina (60 ml) a la suspensión del gel, que se mezcló después a 28°C durante otras 21 h en una plataforma basculante a una velocidad de 175 rpm. El gel activado con epoxi se recogió después por filtración a vacío y se lavó con agua destilada.

1.2 Acoplamiento de Sepharose activada con epoxi con amoniaco acuoso

Se recogió Sepharose activada con epoxi (95 g) en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con agua destilada (5 x el volumen de gel húmedo). El gel lavado se secó por succión y se transfirió a una botella Schott de 500 ml. Se añadió una disolución de amoniaco acuoso 2 M (95 ml). La suspensión se mezcló a 28°C durante 21 h en una plataforma basculante. El gel de Sepharose aminado se recogió por filtración a vacío y se lavó con cantidades copiosas de agua destilada hasta que el pH del filtrado fue < 8. Después se almacenó el gel en etanol acuoso al 20% en volumen a 4°C hasta uso posterior.

2. Inmovilización del iniciador de polimerización

Se disolvieron ACV (20,25 mmol, 5,67 g) y EEDQ (40,5 mmol, 10,01 g) en DMF (270 ml) en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 500 ml. Se lavó la Sepharose aminofuncionalizada (90 g) con 50%, 75% y 100% de etanol (100 ml cada uno) respectivamente. Se añadió el gel a la disolución que contenía ACV y EEDQ. La mezcla en suspensión fue desgasificada burbujeando nitrógeno durante 45 min seguido de aplicación de vacío (3 min). Después se llevó a cabo la reacción de acoplamiento en una atmósfera de argón a 25°C durante 6 h con agitación constante usando un agitador en cabeza IKA® (RW20, IKA Labortechnik). El gel inmovilizado con ACV se recogió en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con DMF y etanol. Después se almacenó el gel en etanol acuoso al 20% en volumen a 4°C hasta uso posterior.

3. Desarrollo de la matriz polimérica sobre la Sepharose con ACV inmovilizado

Se disolvieron NIPAAm (112,5 mmol, 12,73 g), tBAAm (6,25 mmol, 0,79 g), AAc (6,25 mmol, 0,43 ml) y MBBA (1,25 mmol, 0,19 g) en etanol (125 ml) en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 250 ml. Se añadió Sepharose FF con ACV inmovilizado (25 g, lavada con 20%, 50%, 75% y 100% de etanol) a la mezcla en disolución. La mezcla fue desgasificada burbujeando nitrógeno durante 30 min seguido de aplicación de vacío (3 min). Se llevó a cabo la reacción de polimerización en una atmósfera de argón a 80°C durante 16 h con agitación constante usando un agitador en cabeza IKA®. El gel se recogió en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con 100%, 75%, 50%, 20% de etanol respectivamente y finalmente con agua fría. Después se almacenó el gel en etanol acuoso al 20% en volumen a 4°C hasta uso posterior.

3.1 Caracterización del ItBA usando ¹H NMR

La relación de NIPAAm y tBAAm en el copolímero fue estimada a partir de datos espectrales de ¹H NMR usando un espectrómetro NMR Bruker 400 MHz con CDCl₃ como disolvente. Los espectros de ¹H NMR se obtuvieron usando el copolímero libre del sobrenadante obtenido durante el procedimiento de funcionalización de las partículas. Los espectros de ¹H NMR del copolímero libre en CDCl₃ confirmaron que la relación de NIPAAm a tBAAm en el copolímero libre fue 23:2. Suponiendo que la composición del copolímero libre en disolución examinada era similar a la del copolímero inmovilizado sobre la resina, se podía estimar que la relación de los monómeros (NIPAAm:tBAAm:AA) en la resina ItBA era 86:8:6, que es similar a la relación de monómeros (90:5:5) empleada en el procedimiento de polimerización.

3.2 Caracterización del ItBA usando análisis elemental

El contenido combinado total de NIPAAm y tBAAm del ItBA se determinó usando análisis de nitrógeno elemental (Carlo Erba Elemental Analyser EA 1108, Thermo Fisher Scientific, Milán, Italia). Usando este análisis, se determinó que el contenido combinado total de NIPAAm y tBAAm presentes en el ItBA era 2.060 ±62 μmol/g del gel liofilizado.

3.3 Caracterización de la LCST del ItBA usando espectroscopía UV visible

La temperatura crítica de disolución más baja del copolímero se determinó midiendo la transmitancia óptica de una disolución acuosa del copolímero al 0,5% (en peso) a 50 nm entre 24°C y 38°C usando un espectrómetro UV/visual (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.) con una cámara de cubetas de temperatura controlada. El copolímero caracterizado derivaba del sobrenadante obtenido durante el procedimiento de polimerización de las partículas.

La LCST del ItBA fue estimada investigando la transmitancia óptica del copolímero del sobrenadante obtenido durante el procedimiento de funcionalización de las partículas. La LCST se determinó observando la temperatura a la cual la transmitancia óptica de la disolución del copolímero es 50% del valor máximo, cuando la disolución del polímero es sometida a un gradiente de temperatura. Se encontró que la LCST del copolímero de ItBA libre (en masa) (poli(NIPAAm-co-AAc-co-tBAAm)) producido en la disolución de reacción era 30°C. Suponiendo que la composición del copolímero dentro del ItBA es similar a la de la especie libre en la reacción de disolución, la LCST del copolímero en la resina de ItBA debe ser aproximadamente 30°C.

4. Método para la producción de CM Sepharose

Se recogió Sepharose 6 FF (15 g) en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con agua destilada (5 x el volumen de gel húmedo). El gel lavado se secó por succión y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml. Se añadió NaOH 11 M (15 ml) al tubo y se mezcló durante 45 min usando una rueda giratoria (Ratek, Australia) a 28°C. Después se añadió ácido cloroacético 1,4 M (15 ml) al tubo y se mezcló durante otras 3 h. Finalmente se recogió la resina por filtración a

En el caso de la CM no hubo diferencia significativa entre los perfiles de retención a baja y alta temperatura. A ambas temperaturas, una disolución de NaCl de concentración 0,1 M o superior inhibió casi completamente la retención de lactoferrina en CM. Esto sugiere que hay una interacción iónica entre la CM y la lactoferrina tanto a 20°C como 50°C.

- 5 El ItBA mostró un comportamiento de retención significativamente diferente a 20°C y 50°C cuando la concentración salina fue cambiada. A 20°C se observó una inhibición casi completa de la retención de lactoferrina a 0,1 M, lo que sugiere que a la temperatura más baja la interacción iónica es la fuerza principal para la retención de la proteína sobre la resina. Sin embargo, a 50°C, se requirieron concentraciones de NaCl de 0,25 M o superiores para obtener una caída significativa en la cantidad de proteína retenida por la resina, lo que sugiere que a altas temperaturas hay una interacción iónica más fuerte entre la resina y la proteína. Además, a 50°C y NaCl 1 M hubo todavía retención de proteína. Esto indica que, si bien la interacción iónica es la fuerza principal, hay otras fuerzas que están contribuyendo a la retención de las proteínas, posiblemente interacciones hidrófobas entre regiones hidrófobas de la proteína y la matriz polimérica hidrófoba colapsada.

6.2b Efecto de bajas concentraciones salinas sobre la retención de lactoferrina por ItBA

- 15 El efecto de pequeñas diferencias en la concentración de sodio sobre la retención estática de lactoferrina en ItBA fue investigado mezclando disoluciones de lactoferrina que contenían 20 mM o aproximadamente 13 mM de sodio con la resina (0,05 g) durante 35 min a 20°C y 50°C. Después, se dejaron sedimentar las mezclas durante 10 minutos a 20°C o 50°C y se retiró el sobrenadante. Los sobrenadantes se centrifugaron a 15.000 x g durante 3 min. La concentración de lactoferrina en los sobrenadantes fue determinada midiendo la absorbancia a 280 nm. La capacidad de retención máxima B_{max} se calculó después a partir de los isoterms de adsorción.

La retención de lactoferrina por ItBA fue mayor en la concentración de sodio de aproximadamente 13 mM a 20°C y 50°C que en la concentración de sodio de 20 mM (Figura 5). Por tanto, las concentraciones de sodio más bajas aumentaron la capacidad de retención máxima de la resina tanto a 20°C como a 50°C.

6.3 Retención dinámica y elución de lactoferrina

- 25 Una de las aplicaciones más prometedoras del ItBA implica ponerlo en contacto con una disolución de la proteína diana a 50°C, dando como resultado la retención de la proteína diana y la liberación después de una proporción del material retenido simplemente bajando la temperatura a 20°C.

- 30 Se rellenaron columnas PEEK con las resinas (100 x 4,6 mm d.i.) y se estudiaron las características de retención dinámica y liberación de la lactoferrina a 20°C y 50°C. El sistema usado para los estudios dinámicos fue una bomba Waters 2525 HPLC, un manipulador de muestras Waters 2767 y un detector de matriz de diodos Waters. La temperatura de la columna fue mantenida sumergiendo un tubo metálico en espiral (zona de intercambio de calor) y la columna en un baño de agua fijado a la temperatura requerida. La fase móvil empleada fue tampón fosfato de pH 6,5 o NaCl 1 M.

- 35 Los cromatogramas en la Figura 6 y los datos en la Tabla 1 ilustran el potencial de las resinas de ItBA para retener lactoferrina, y liberar después una gran proporción de la lactoferrina retenida disminuyendo la temperatura. Durante el estudio de retención dinámica y liberación de las resinas desarrolladas, se encontró que para la CM no hubo diferencia significativa entre los cromatogramas a tres diferentes condiciones de ensayo (A - contacto a 20°C y elución a 20°C; B - contacto a 50°C y elución a 20°C, y C - contacto a 50°C y elución a 50°C). El efecto de la temperatura sobre la retención y liberación de la proteína sobre la CM no fue significativo. Sin embargo, para el ItBA los cromatogramas a las tres diferentes condiciones fueron marcadamente diferentes. La capacidad de retención de la resina mejoró significativamente cuando la temperatura de contacto fue aumentada de 20°C a 50°C. Cuando la proteína se puso en contacto a 50°C, casi el 50% de la proteína retenida pudo ser eluida bajando la temperatura de la columna a 20°C. Cuando la liberación se emprendió a 50°C, se requirieron concentraciones de NaCl más altas para liberar la mayor parte de las proteínas retenidas, lo que sugiere que a 50°C hay una interacción más fuerte entre la resina y el analito.

En el caso de la CM no hubo diferencia significativa entre los perfiles de retención a baja y alta temperatura. A ambas temperaturas, una disolución de NaCl de concentración 0,1 M o superior inhibió casi completamente la retención de lactoferrina en CM. Esto sugiere que hay una interacción iónica entre la CM y la lactoferrina tanto a 20°C como 50°C.

- 5 El ItBA mostró un comportamiento de retención significativamente diferente a 20°C y 50°C cuando la concentración salina fue cambiada. A 20°C se observó una inhibición casi completa de la retención de lactoferrina a 0,1 M, lo que sugiere que a la temperatura más baja la interacción iónica es la fuerza principal para la retención de la proteína sobre la resina. Sin embargo, a 50°C, se requirieron concentraciones de NaCl de 0,25 M o superiores para obtener una caída significativa en la cantidad de proteína retenida por la resina, lo que sugiere que a altas temperaturas hay una interacción iónica más fuerte entre la resina y la proteína. Además, a 50°C y NaCl 1 M hubo todavía retención de proteína. Esto indica que, si bien la interacción iónica es la fuerza principal, hay otras fuerzas que están contribuyendo a la retención de las proteínas, posiblemente interacciones hidrófobas entre regiones hidrófobas de la proteína y la matriz polimérica hidrófoba colapsada.

6.2b Efecto de bajas concentraciones salinas sobre la retención de lactoferrina por ItBA

- 15 El efecto de pequeñas diferencias en la concentración de sodio sobre la retención estática de lactoferrina en ItBA fue investigado mezclando disoluciones de lactoferrina que contenían 20 mM o aproximadamente 13 mM de sodio con la resina (0,05 g) durante 35 min a 20°C y 50°C. Después, se dejaron sedimentar las mezclas durante 10 minutos a 20°C o 50°C y se retiró el sobrenadante. Los sobrenadantes se centrifugaron a 15.000 x g durante 3 min. La concentración de lactoferrina en los sobrenadantes fue determinada midiendo la absorbancia a 280 nm. La capacidad de retención máxima B_{max} se calculó después a partir de los isoterms de adsorción.

La retención de lactoferrina por ItBA fue mayor en la concentración de sodio de aproximadamente 13 mM a 20°C y 50°C que en la concentración de sodio de 20 mM (Figura 5). Por tanto, las concentraciones de sodio más bajas aumentaron la capacidad de retención máxima de la resina tanto a 20°C como a 50°C.

6.3 Retención dinámica y elución de lactoferrina

- 25 Una de las aplicaciones más prometedoras del ItBA implica ponerlo en contacto con una disolución de la proteína diana a 50°C, dando como resultado la retención de la proteína diana y la liberación después de una proporción del material retenido simplemente bajando la temperatura a 20°C.

- 30 Se rellenaron columnas PEEK con las resinas (100 x 4,6 mm d.i.) y se estudiaron las características de retención dinámica y liberación de la lactoferrina a 20°C y 50°C. El sistema usado para los estudios dinámicos fue una bomba Waters 2525 HPLC, un manipulador de muestras Waters 2767 y un detector de matriz de diodos Waters. La temperatura de la columna fue mantenida sumergiendo un tubo metálico en espiral (zona de intercambio de calor) y la columna en un baño de agua fijado a la temperatura requerida. La fase móvil empleada fue tampón fosfato de pH 6,5 o NaCl 1 M.

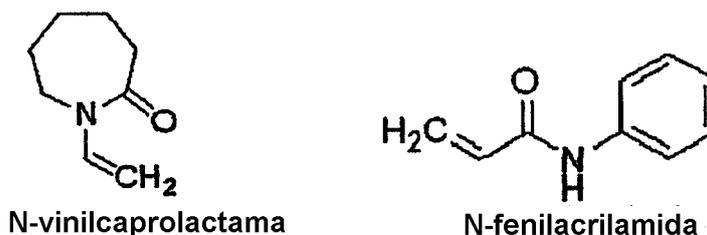
- 35 Los cromatogramas en la Figura 6 y los datos en la Tabla 1 ilustran el potencial de las resinas de ItBA para retener lactoferrina, y liberar después una gran proporción de la lactoferrina retenida disminuyendo la temperatura. Durante el estudio de retención dinámica y liberación de las resinas desarrolladas, se encontró que para la CM no hubo diferencia significativa entre los cromatogramas a tres diferentes condiciones de ensayo (A - contacto a 20°C y elución a 20°C; B - contacto a 50°C y elución a 20°C, y C - contacto a 50°C y elución a 50°C). El efecto de la temperatura sobre la retención y liberación de la proteína sobre la CM no fue significativo. Sin embargo, para el ItBA los cromatogramas a las tres diferentes condiciones fueron marcadamente diferentes. La capacidad de retención de la resina mejoró significativamente cuando la temperatura de contacto fue aumentada de 20°C a 50°C. Cuando la proteína se puso en contacto a 50°C, casi el 50% de la proteína retenida pudo ser eluida bajando la temperatura de la columna a 20°C. Cuando la liberación se emprendió a 50°C, se requirieron concentraciones de NaCl más altas para liberar la mayor parte de las proteínas retenidas, lo que sugiere que a 50°C hay una interacción más fuerte entre la resina y el analito.

Tabla 1 - Porcentaje de proteína (lactoferrina) recogida en diversas fracciones después de la retención dinámica y liberación usando CM o ItBA

% de la lactoferrina inyectada (28 mg) en diversas fracciones de recogida							
Tiempo	Flujo a través	Cambio de temperatura	NaCl 0,1 M	NaCl 1 M	Reequilibrado	Recuperación total	
	0-12 min	12-22 min	23-33 min	35-45 min	47-59 min		
CM							
Contacto a 20°C y elución a 20°C	6	1	89	3	0	99	
Contacto a 50°C y elución a 20°C	9	1	88	2	0	100	
Contacto a 50°C y elución a 50°C	7	0	86	7	0	100	
ItBA							
Contacto a 20°C y elución a 20°C	71	7	16	5	0	99	
Contacto a 50°C y elución a 20°C	4	47	39	4	1	95	
Contacto a 50°C y elución a 50°C	6	1	40	43	1	92	

7. Formulaciones alternativas de partículas de agarosa sensibles a la temperatura

La N-vinilcaprolactama es también un monómero que ha sido empleado para fabricar polímeros sensibles a la temperatura, con valores de LCST similares a los de los polímeros de N-isopropilacrilamida. Es una alternativa más barata a la N-isopropilacrilamida que se puede emplear para fabricar resinas de intercambio iónico sensibles a la temperatura. La N-fenilacrilamida es un monómero más hidrófobo cuando se compara con los comonómeros terc-butilacrilamida y metacrilato de butilo. La N-fenilacrilamida también se puede emplear como comonómero para fabricar resinas de intercambio iónico sensibles a la temperatura, con sensibilidad a la temperatura y capacidad de retención mejoradas.



La posibilidad de fabricar resinas de intercambio iónico sensibles a la temperatura de una manera económica fue explorada usando N-vinilcaprolactama como monómero sensible a la temperatura. El uso de N-fenilacrilamida como comonómero para fabricar resinas de intercambio iónico sensibles a la temperatura con sensibilidad a la temperatura y capacidad de retención mejoradas también fue explorado. El ItBA fue fabricado como se describió anteriormente. Sin embargo, durante el procedimiento de fabricación, se reemplazó el NIPAAm por N-vinilcaprolactama para preparar poli(N-vinilcaprolactama-co-N-terc-butilacrilamida-co-ácido acrílico) (CtBA) basado en Sepharose. En un segundo procedimiento de fabricación se retiró el tBAAm de la formulación y se reemplazó por el monómero más hidrófilo NIPAAm para preparar poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) (IA) basado en Sepharose. En un tercer procedimiento de fabricación, el tBAAm se reemplazó por el monómero más hidrófobo N-fenilacrilamida para preparar poli(N-isopropilacrilamida-co-N-fenilacrilamida-co-ácido acrílico) (IPhA) basado en Sepharose. El efecto de cambiar la composición del polímero sobre el perfil de retención de lactoferrina se examinó usando una metodología de retención estática. Se mezcló la resina (0,1 g) con una disolución de lactoferrina (1 ml de 5 mg/ml) durante 1 h a temperaturas entre 4°C y 50°C. Se dejó sedimentar la resina y la cantidad de proteína no retenida se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 280 nm, lo que a su vez dio la cantidad de proteína retenida por las resinas. Los resultados se muestran en la Figura 7.

El CtBA retuvo más que el 95% de la lactoferrina disponible a todas las temperaturas ensayadas. A 4°C, las otras tres resinas (IA, ItBA y IPhA) retuvieron menos que 20% de la lactoferrina disponible. A 50°C, las mismas tres resinas retuvieron 80% o más de la lactoferrina disponible. Entre estas resinas sensibles a la temperatura, la IA retuvo la menor cantidad de lactoferrina a todas las temperaturas, mientras que la IPhA retuvo la mayor cantidad de lactoferrina a todas las temperaturas. Además, la IPhA alcanzó el estado de máxima retención a la menor temperatura (40°C). Estos resultados sugieren que (a) la retención en CtBA de lactoferrina no era sensible a la temperatura en las condiciones estudiadas, (b) se puede emplear N-fenilacrilamida para fabricar resinas de intercambio iónico sensibles a la temperatura basadas en Sepharose, (c) la temperatura de retención y liberación para las resinas de intercambio iónico sensibles a la temperatura puede ser alterada incorporando diferentes monómeros (NIPAAm o N-fenilacrilamida) en la estructura del polímero.

7a. Sepharose modificada con poli(N-isopropilacrilamida-co-N-fenilacrilamida-co-ácido acrílico) (IPhA)

Se sintetizaron nuevas resinas usando métodos similares a la síntesis de ItBA. Sin embargo, el tipo y concentraciones de los monómeros fueron variados. Brevemente, se activó Sepharose 6 FF con epíclorohidrina como se bosquejó anteriormente. La resina epoxiactivada fue después aminofuncionalizada usando amoniaco acuoso mediante el método descrito en la presente memoria. Se inmovilizó un iniciador de polimerización por radicales libres (ACV) sobre la Sepharose aminofuncionalizada usando EEDQ como agente de acoplamiento y DMF como disolvente. Finalmente, se llevó a cabo la polimerización de los monómeros presentes en la tabla a continuación más el agente de reticulación N,N-metilenbisacrilamida (MBBA) a 80°C durante 16 h en una atmósfera inerte.

Las diversas composiciones monoméricas que se prepararon se tabulan a continuación:

Monómeros	Relación	Abreviatura
NIPAAm:AA	95:5	(I5A)
NIPAAm:PhAAm:AA	90:5:5	(IPh5A)
NIPAAm:PhAAm:AA	85:5:10	(IPh10A)

Se obtuvieron isotermos de adsorción de lactoferrina para el I5A a 20°C y 50°C (Figura 8) y para el IPh5A y IPh10A a 4°C y 50°C (Figuras 9 y 10). Se usó el siguiente método. Se prepararon disoluciones de lactoferrina (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, y 40 mg/ml) en tampón fosfato 10 mM (pH 6,5) y se mezclaron alícuotas de 1 ml con muestras de resina de 0,1 g durante 35 min a la temperatura requerida. La lactoferrina retenida fue calculada usando el balance de masas. Se calculó después la capacidad de retención máxima B_{max} a partir de los isotermos de adsorción.

Para el I5A hubo una diferencia significativa en los isotermos de adsorción y los valores B_{max} a 20°C ($B_{max} = 43$ mg/ml) y a 50°C ($B_{max} = 90$ mg/ml). Esto es demostrado en la Figura 8.

Para el IPh5A, hubo una diferencia significativa en los isotermos de adsorción y los valores B_{max} a 4°C ($B_{max} = 14$ mg/ml) y a 50°C ($B_{max} = 83$ mg/ml) (Figura 9). Este también fue el caso para el IPh10A, donde hubo una diferencia significativa en los isotermos de adsorción y los valores B_{max} a 4°C ($B_{max} = 84$ mg/ml) y a 50°C ($B_{max} = 133$ mg/ml) (Figura 10).

Aumentar el contenido de ácido acrílico en la alimentación causó que la capacidad de retención de las resinas aumentara tanto a baja como alta temperatura. Sin embargo, la sensibilidad a la temperatura (diferencia de retención y valor B_{max} entre altas y bajas temperaturas) disminuyó cuando el contenido de ácido acrílico en la alimentación y por tanto el contenido de ácido acrílico del copolímero unido a la resina fue aumentado.

8. Partículas poliméricas alternativas para la invención

El método empleado para desarrollar ItBA fue adaptado para desarrollar una resina de intercambio iónico sensible a la temperatura basada en Toyopearl (Toyopearl-ItBA). Se inmovilizó ACV sobre Toyopearl® AF-Amino-650M y el polímero se desarrolló usando la misma técnica que la empleada para el ItBA (véase anteriormente). La sensibilidad a la temperatura del Toyopearl-ItBA fue examinada usando la metodología de retención estática empleada en el Ejemplo 6.1 a 20°C y 50°C. Como con el ItBA, el Toyopearl-ItBA retuvo un 250% más de proteína a 50°C en comparación con a 20°C (Figura 11). Estos resultados sugieren que la resina de intercambio iónico sensible a la temperatura basada en Toyopearl rinde de una manera similar a la resina de intercambio iónico sensible a la temperatura basada en Sepharose.

9. Capacidad de fraccionamiento del ItBA

La capacidad de fraccionamiento del ItBA fue examinada usando una disolución modelo de proteína de suero de leche (una mezcla de α -lactoalbúmina (13 mg/ml), β -lactoglobulina (15 mg/ml) y lactoferrina (27 mg/ml)). El método empleado para el estudio fue similar al empleado en el Ejemplo 6.3. Los cromatogramas en la Figura 12 y 13 muestran los perfiles de retención y elución de la disolución de proteínas modelo. Cuando la disolución de proteínas modelo se cargó sobre la columna a 20°C, la mayoría de las proteínas no fueron retenidas, y eluyeron de la columna en la fracción de flujo que la atraviesa. Sin embargo, cuando la disolución de proteínas modelo se cargó sobre la columna a 50°C, el 50% de la lactoferrina fue retenida por la resina, mientras que ninguna de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina fue retenida. Por el contrario, la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina fueron eluidas de la columna en la fracción de flujo que la atraviesa. La mayoría (52%) de la lactoferrina retenida fue eluida reduciendo la fase móvil y la temperatura de la columna de 50°C a 20°C. La mayor parte de la lactoferrina retenida restante (44%) fue eluida de la columna con NaCl 0,1 M a 20°C (véanse las Tablas 2 y 3). Estos resultados indican que el ItBA retiene mínimas proteínas catiónicas y aniónicas a 20°C, y que el ItBA es capaz de retener selectivamente proteínas catiónicas (p.ej. lactoferrina) a 50°C y liberar después la mayoría de las proteínas catiónicas retenidas con un cambio de temperatura (p.ej. disminución a 20°C) y sal.

Tabla 2 - Cantidad de cada proteína en cada fracción eluida como porcentaje de la cantidad total de cada proteína cargada sobre la columna de ItBA a 20°C seguido de elución a 20°C y después un gradiente de NaCl de 0 M a 1 M.

	Flujo a través	Cambio de temperatura	NaCl 0 - 0,1 M	NaCl 0,1 - 1 M	Reequilibrado
Tiempo	0-12 min	12-22 min	22-52 min	52-66 min	66-76 min
α -lactoalbúmina	100	0	0	0	0
lactoferrina	99	0	1	0	0
β -lactoglobulina	100	0	0	0	0

Tabla 3 - Cantidad de cada proteína en cada fracción eluida como porcentaje de la cantidad total de cada proteína cargada sobre la columna de ItBA a 50°C seguido de elución a 20°C y después un gradiente de NaCl de 0 M a 1 M.

	Flujo a través	Cambio de temperatura	NaCl 0 - 0,1 M	NaCl 0,1 - 1 M	Reequilibrado
Tiempo	0-12 min	12-22 min	22-52 min	52-66 min	66-76 min
α -lactoalbúmina	100	0	0	0	0
lactoferrina	48	25	21	2	0
β -lactoglobulina	100	3	0	0	0

10. Retención de Citocromo C

5 Para investigar el perfil de retención de otras proteínas básicas por ItBA a 20°C y 50°C, se realizaron experimentos de retención estática usando Citocromo C (pl: 10-10,5). Se mezcló ItBA (0,1 g) con una disolución de Citocromo C (1 ml de 5 mg/ml) durante 1 h a temperaturas de 20°C y 50°C. La resina se dejó sedimentar y la cantidad de proteína no retenida se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 280 nm, lo que a su vez dio la cantidad de proteína retenida por las resinas. Se encontró que el ItBA retuvo 50% más Citocromo C a 50°C en comparación con a 20°C (Figura 14).

10 11. Estudios sobre retención de proteínas y liberación de ItBA

15 Las características de retención dinámica de lactoferrina del ItBA se examinaron además usando una disolución de lactoferrina pura (0,9 a 45 mg/ml), una disolución de suero fresco que contenía proteínas de suero y lactoferrina (0,2 a 21,8 mg/ml) y una disolución de suero concentrado que contenía proteínas de suero concentrado (aproximadamente un concentrado de 10 veces) y lactoferrina (0,6 a 22,2 mg/ml). El método empleado fue similar al empleado en el Ejemplo 6.3, sin embargo, el contacto se emprendió sólo a 50°C y la liberación se emprendió con NaCl 0,1 M a 20°C.

20 Los cromatogramas en la Figura 15 muestran los perfiles de retención y elución de las disoluciones de proteínas examinadas. Es evidente a partir de estos cromatogramas que la lactoferrina es retenida por el ItBA y puede ser liberada por el ItBA cuando está presente sola, en suero fresco o en suero concentrado. Cuando se cargaron 0,9 a 45 mg de lactoferrina sobre la columna sin otras proteínas presentes, fue retenida más del 95% de la lactoferrina cargada (Figura 16). El porcentaje de lactoferrina retenida no formó una meseta, lo que indica que la resina no había alcanzado la capacidad de retención total (Figura 16). Cuando se cargaron 0,2 a 21,8 mg de lactoferrina sobre la columna en presencia de proteínas de suero (a su concentración normal), fue retenida más del 70% de la lactoferrina cargada (Figura 17). También hubo una relación muy lineal entre la cantidad de lactoferrina en la alimentación y la cantidad de lactoferrina retenida, lo que indica de nuevo que la resina no había alcanzado la capacidad de retención total (Figura 17). Cuando se cargaron 0,6 a 22,2 mg de lactoferrina sobre la columna en presencia de proteínas de suero concentrado (concentrado aproximadamente 10 veces), fue retenida aproximadamente el 50% de la lactoferrina cargada (Figura 18). También se observó una relación lineal entre la cantidad de lactoferrina en la alimentación y la cantidad de lactoferrina retenida cuando se usó suero concentrado (Figura 18).

30 Estos resultados indican que el ItBA retiene lactoferrina sola y en presencia de proteínas de suero a su concentración normal y cuando está concentrado aproximadamente 10 veces.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar proteínas de una disolución que contiene las proteínas, método que incluye:
 - a. poner en contacto la disolución que contiene las proteínas con partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye una proporción de grupos químicos ionizables y dicho contacto ocurre a una temperatura entre 30°C y 80°C para facilitar la retención de las proteínas por las partículas poliméricas reticuladas;
 - b. reemplazar la disolución que contiene la proteína por una disolución de aclarado;
 - c. reemplazar la disolución de aclarado por una disolución de liberación eficaz para liberar las proteínas de las partículas poliméricas reticuladas en la disolución;
 - d. aislar la disolución de liberación que contiene la proteína.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde la temperatura de la disolución de liberación es más baja que la temperatura a la que la disolución que contiene las proteínas se puso en contacto con las partículas poliméricas reticuladas, preferiblemente a una temperatura entre 0°C y 30°C y más preferiblemente entre 0°C y 20°C.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la disolución de proteínas y la disolución de aclarado están a una temperatura entre 30°C y 60°C, preferiblemente entre 40°C y 60°C.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la disolución de liberación contiene un soluto iónico, preferiblemente un haluro de metal alcalino o un haluro de metal alcalinotérreo, lo más preferiblemente cloruro de sodio.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye:
 - a. unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero seleccionadas del grupo que consiste en unidades N-isopropilacrilamida, unidades éter vinilmetílico o unidades N-vinilcaprolactama; y
 - b. unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero seleccionadas del grupo que consiste en unidades ácido acrílico, unidades ácido metacrílico, unidades ácido etacrílico, unidades 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, unidades 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, unidades cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, unidades N,N-dimetilaminopropilacrilamida, unidades metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, unidades acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y unidades cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio, preferiblemente unidades ácido acrílico.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica bifuncional seleccionada del grupo que consiste en unidades dimetacrilato de etilenglicol, unidades dimetacrilato de 1,4-butanodiol, unidades dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, unidades diacrilato de etilenglicol, unidades diacrilato de 1,4-butanodiol, unidades diacrilato de 1,6-hexanodiol, y unidades N,N-metilenbisacrilamida.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica adicional seleccionada del grupo que consiste en unidades acrilato de metilo, unidades acrilato de etilo, unidades acrilato de propilo, unidades acrilato de butilo, unidades metacrilato de metilo, unidades metacrilato de etilo, unidades metacrilato de propilo, unidades N-isopropilmetacrilamida, unidades metacrilato de butilo, unidades N-terc-butilacrilamida, unidades N,N-dimetilacrilamida, unidades N,N-dietilacrilamida, y unidades N-fenilacrilamida, preferiblemente unidades N-terc-butilacrilamida, y el copolímero sensible a la temperatura comprende o bien:
 - a. unidades N-isopropilacrilamida, unidades terc-butilacrilamida y unidades ácido acrílico en una relación de 84:8:8 a 96:2:2, o bien
 - b. unidades N-isopropilacrilamida, unidades N-fenilacrilamida y unidades ácido acrílico en una relación de 84:8:8 a 96:2:2.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las partículas poliméricas reticuladas se seleccionan del grupo que consiste en partículas de agarosa reticuladas, partículas de celulosa reticuladas, partículas poliméricas vinílicas reticuladas hidrófilas y partículas de resinas poliméricas basadas en metacrilato.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las etapas (a)-(c) ocurren en una columna cromatográfica que tiene una entrada y una salida, en donde las partículas poliméricas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura se incluyen en el camino entre la entrada y la salida y la disolución que contiene las proteínas, la disolución de aclarado y la disolución de liberación se introducen

secuencialmente a través de la entrada y se recogen por la salida.

10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en lactoferrina, lactoperoxidasa, papaína y citocromo C.

5 11. Partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye:

- a. unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero; y
- b. unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables al copolímero.

10 12. Partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas según la reivindicación 11, en donde las unidades monoméricas que proporcionan propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero se seleccionan del grupo que consiste en unidades N-isopropilacrilamida, unidades éter vinilmetílico o unidades N-vinilcaprolactama, y las unidades monoméricas que proporcionan grupos químicos ionizables se seleccionan del grupo que consiste en unidades ácido acrílico, unidades ácido metacrílico, unidades ácido etacrílico, unidades 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, unidades 3-acrilamido-3-metilbutanoato de sodio, unidades cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, unidades N,N-dimetilaminopropilacrilamida, unidades metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, unidades acrilato de N,N-dimetilaminoetilo, y unidades cloruro de 4-vinilbenciltrimetilamonio, preferiblemente unidades ácido acrílico.

15

13. Partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas según la reivindicación 11 o 12, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica bifuncional seleccionada del grupo que consiste en unidades dimetacrilato de etilenglicol, unidades dimetacrilato de 1,4-butanodiol, unidades dimetacrilato de 1,6-hexanodiol, unidades diacrilato de etilenglicol, unidades diacrilato de 1,4-butanodiol, unidades diacrilato de 1,6-hexanodiol, y unidades N,N-metilenbisacrilamida, preferiblemente unidades N,N-metilenbisacrilamida.

20

14. Partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el copolímero sensible a la temperatura incluye además al menos una unidad monomérica adicional seleccionada del grupo que consiste en unidades acrilato de metilo, unidades acrilato de etilo, unidades acrilato de propilo, unidades acrilato de butilo, unidades metacrilato de metilo, unidades metacrilato de etilo, unidades metacrilato de propilo, unidades N-isopropilmetacrilamida, unidades metacrilato de butilo, unidades N-terc-butilacrilamida, unidades N,N-dimetilacrilamida, unidades N,N-dietilacrilamida, y unidades N-fenilacrilamida, preferiblemente unidades N-terc-butilacrilamida, y preferiblemente el copolímero sensible a la temperatura incluye o bien:

25

- a. unidades N-isopropilacrilamida, unidades terc-butilacrilamida y unidades ácido acrílico en una relación de 84:8:8 a 96:2:2, o bien
 - b. unidades N-isopropilacrilamida, unidades N-fenilacrilamida y unidades ácido acrílico en una relación de 84:8:8 a 96:2:2.
- 30

15. Partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el polímero hidroxílico reticulado se selecciona del grupo que consiste en agarosa reticulada, celulosa reticulada, polímero vinílico reticulado hidroxifuncional, polímero acrílico reticulado hidroxifuncional, y polímero metacrílico reticulado hidroxifuncional.

35

16. Un método para preparar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, método que incluye:

- a. proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas;
 - b. modificar químicamente las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas para proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización, incluyendo preferiblemente las etapas de:
 - i. Funcionalizar las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas con al menos un grupo epóxido;
 - ii. Hacer reaccionar el grupo epóxido con amoníaco para proporcionar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con grupos amino; y
 - 45 iii. Hacer reaccionar los grupos amino con un iniciador de polimerización que tiene al menos un grupo ácido carboxílico, preferiblemente 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico);
 - c. poner en contacto las partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas que tienen grupos funcionales capaces de iniciar polimerización con una disolución de monómero que incluye al menos un monómero capaz de proporcionar propiedades de sensibilidad a la temperatura al copolímero y al menos un monómero capaz de proporcionar grupos químicos ionizables al copolímero, en donde dicho contacto inicia la polimerización de los monómeros; y
 - d. aislar partículas poliméricas hidroxílicas reticuladas funcionalizadas con un copolímero sensible a la temperatura
- 50

que tiene una proporción de grupos químicos ionizables.

Figura 1

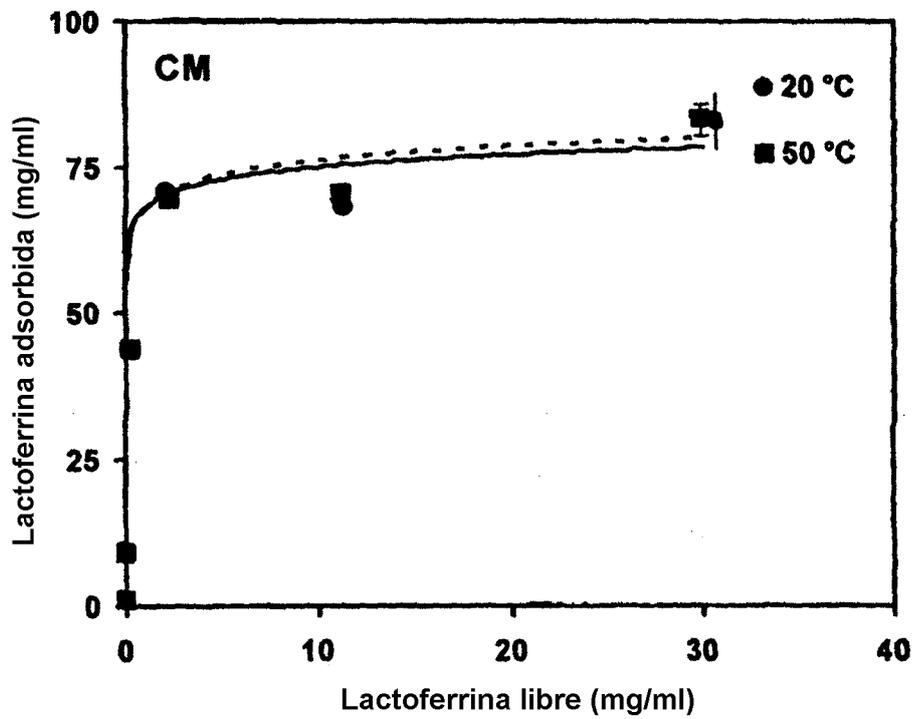
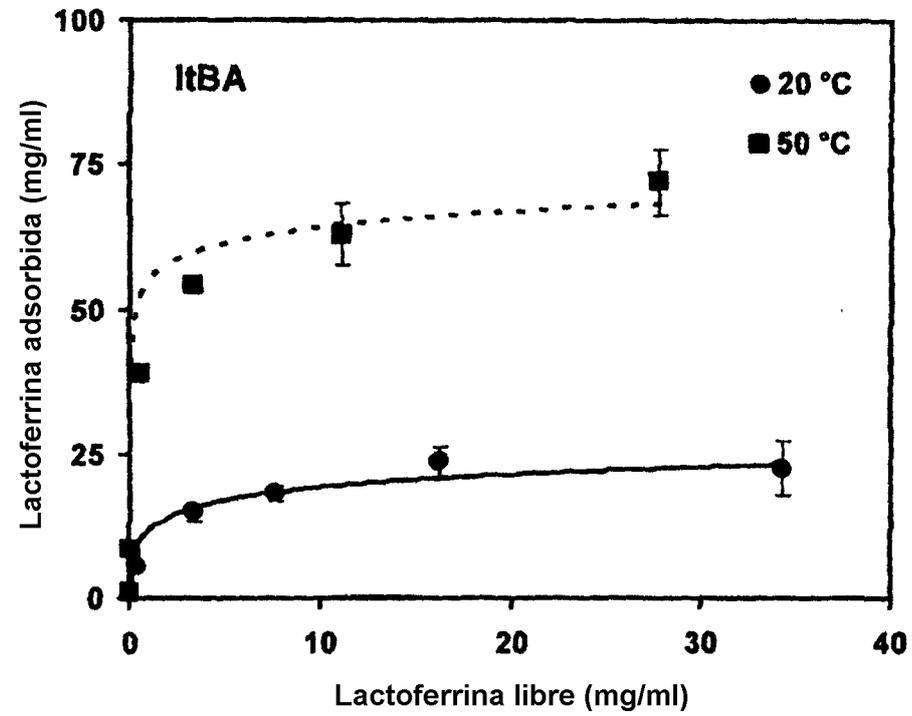


Figura 2

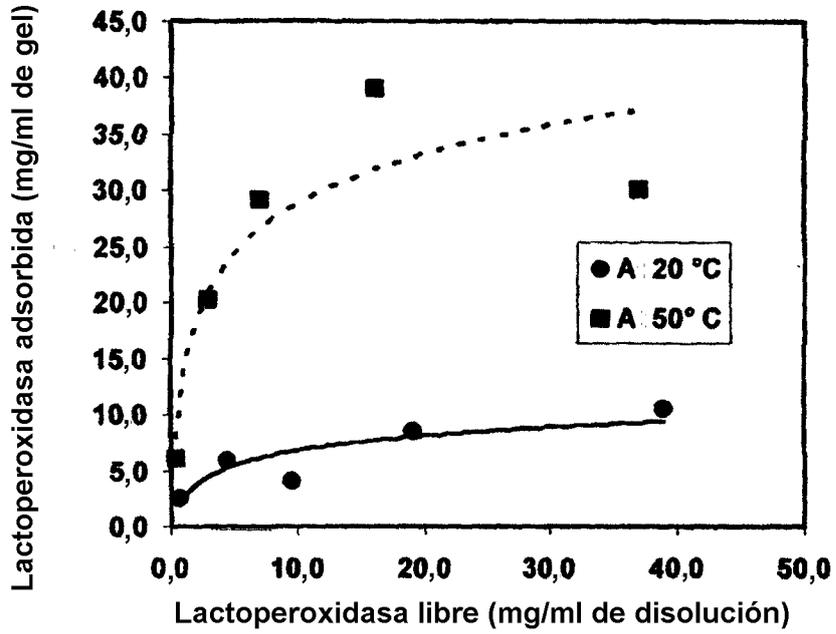


Figura 3

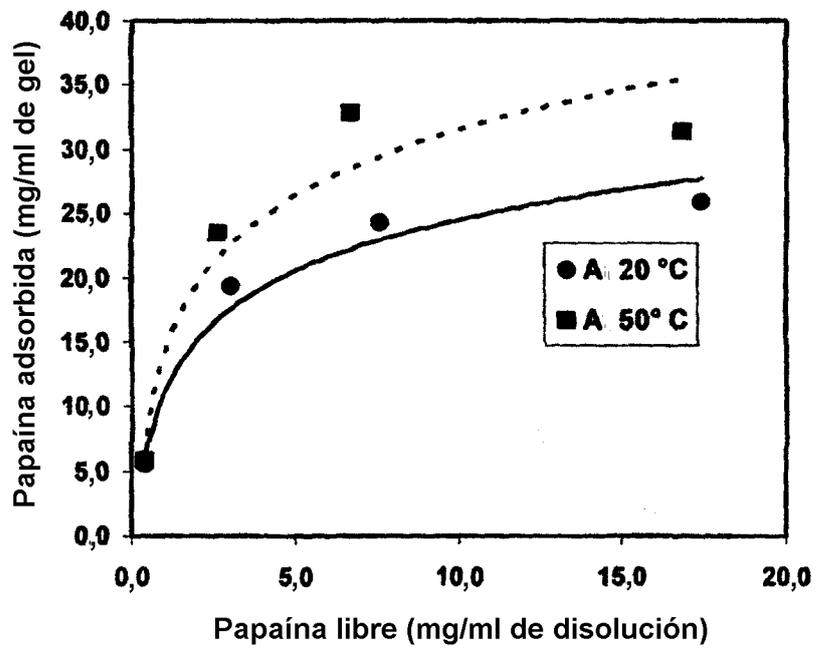


Figura 4

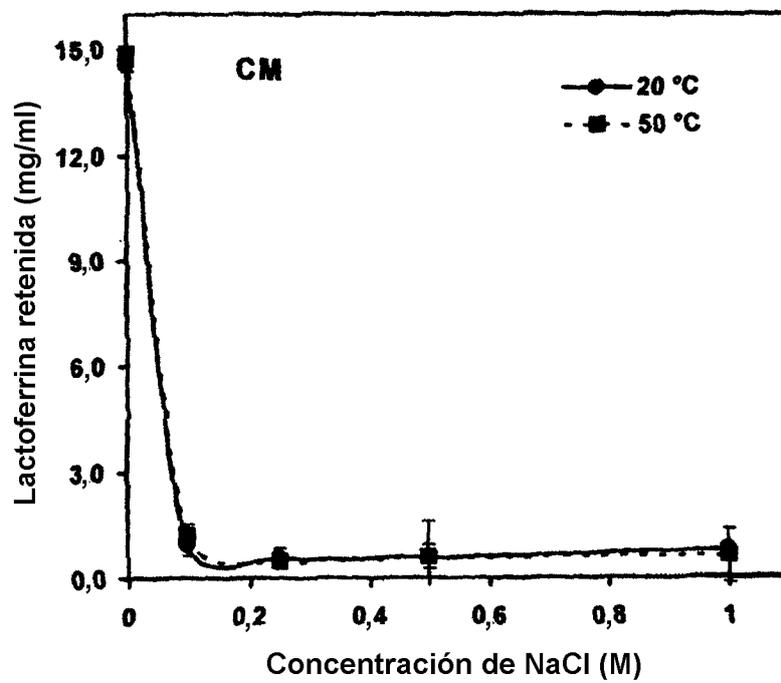
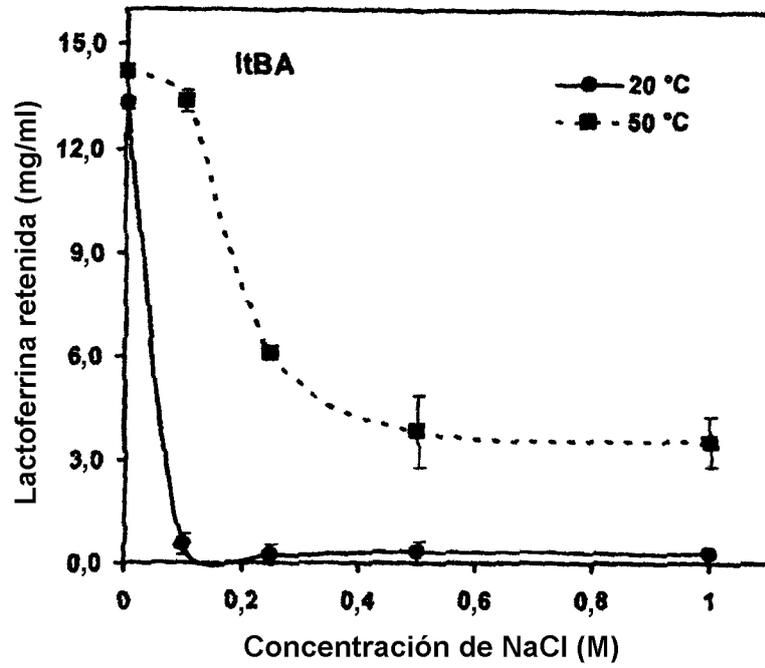


Figura 5

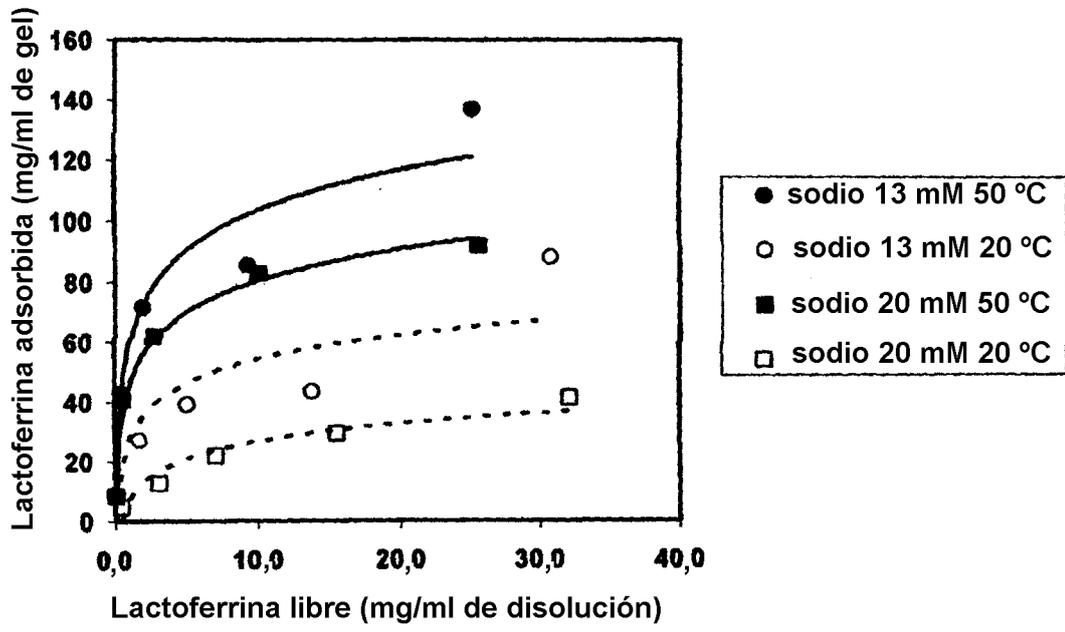


Figura 6

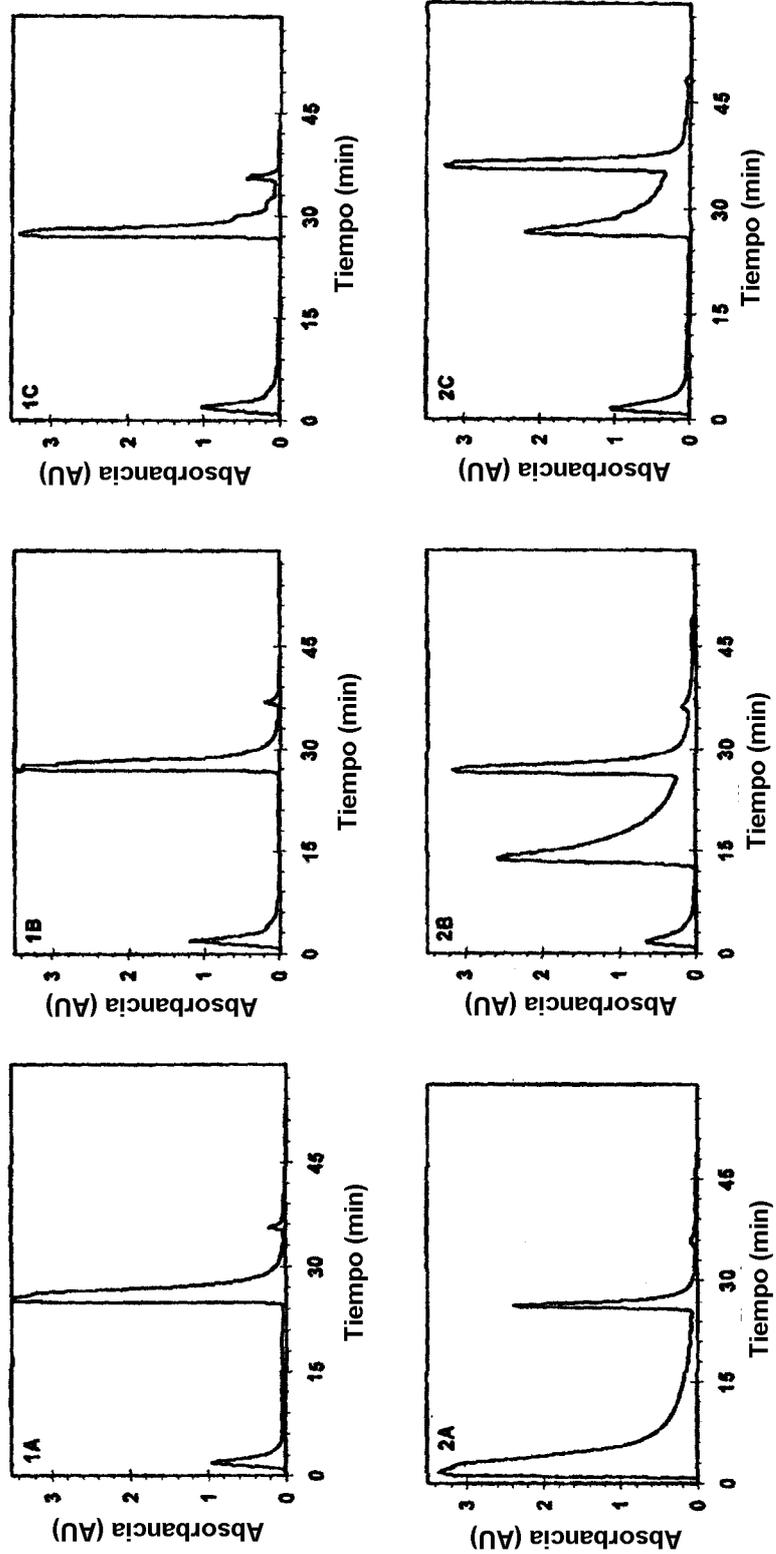


Figura 7

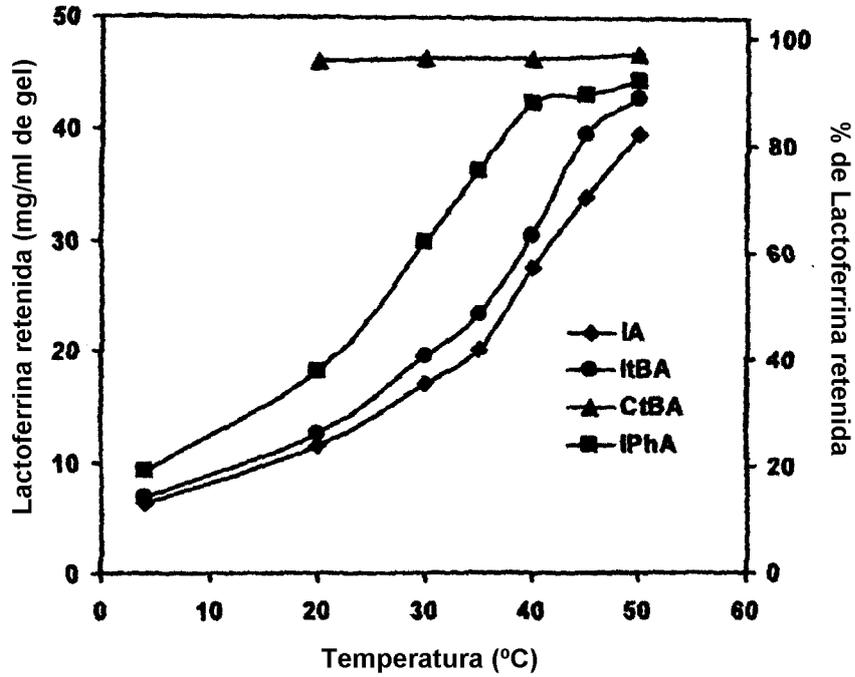


Figura 8

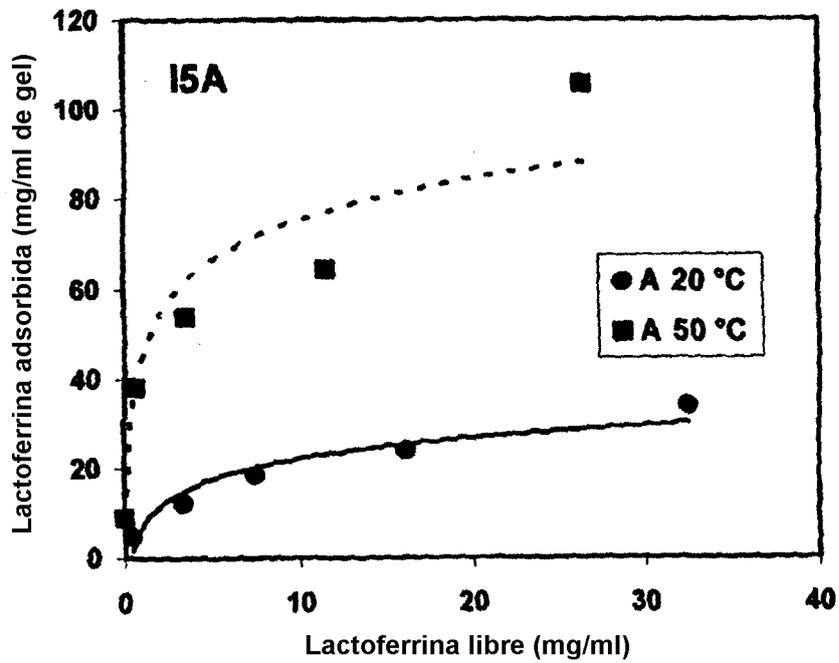


Figura 9

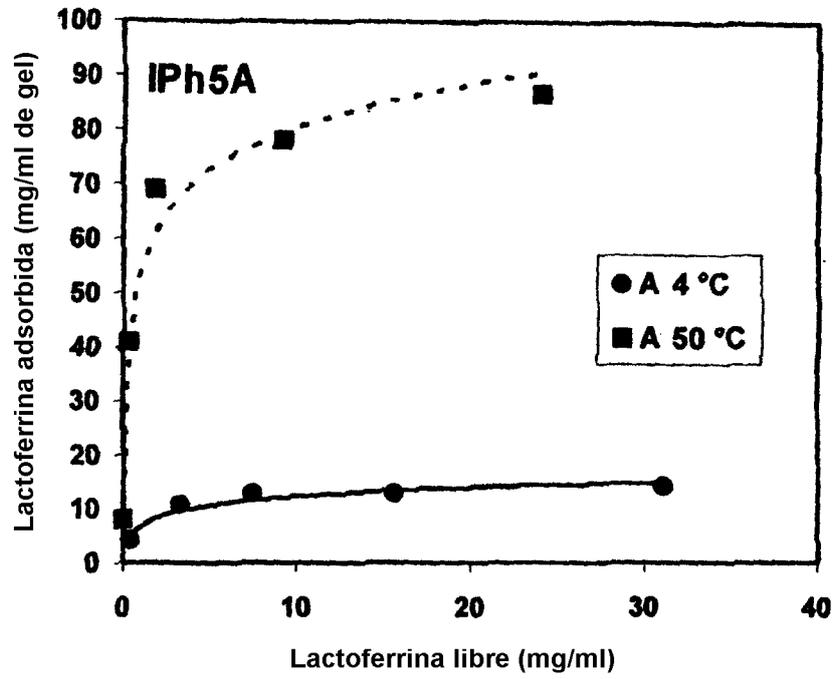


Figura 10

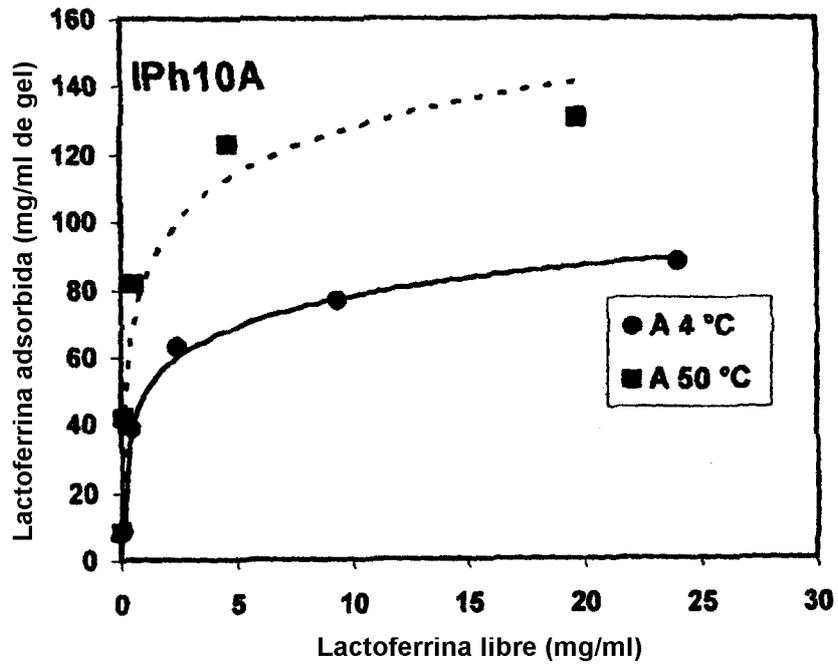


Figura 11

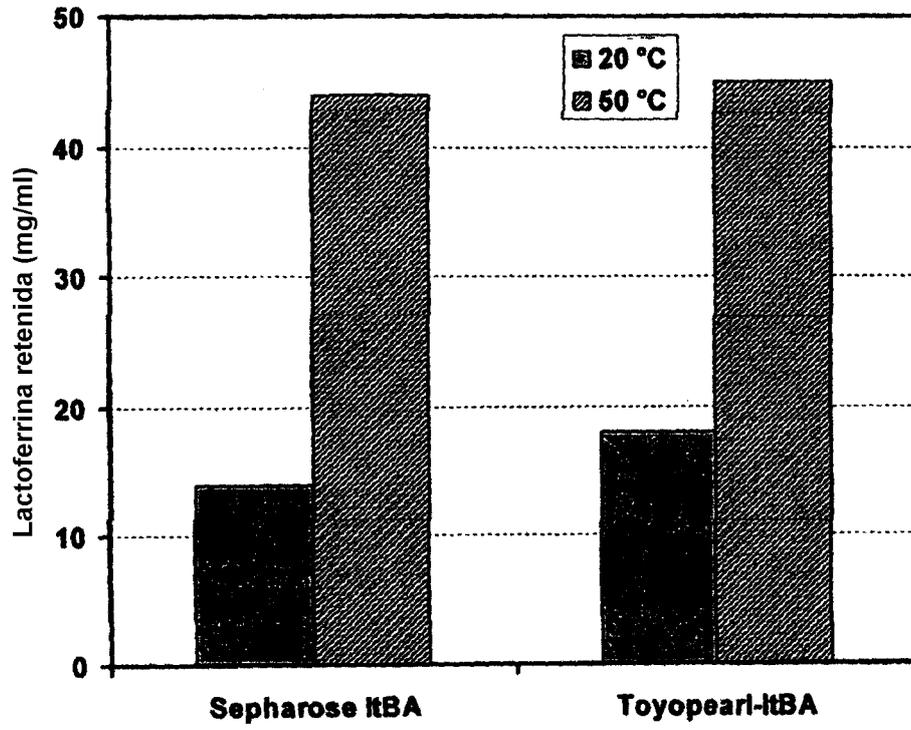


Figura 12

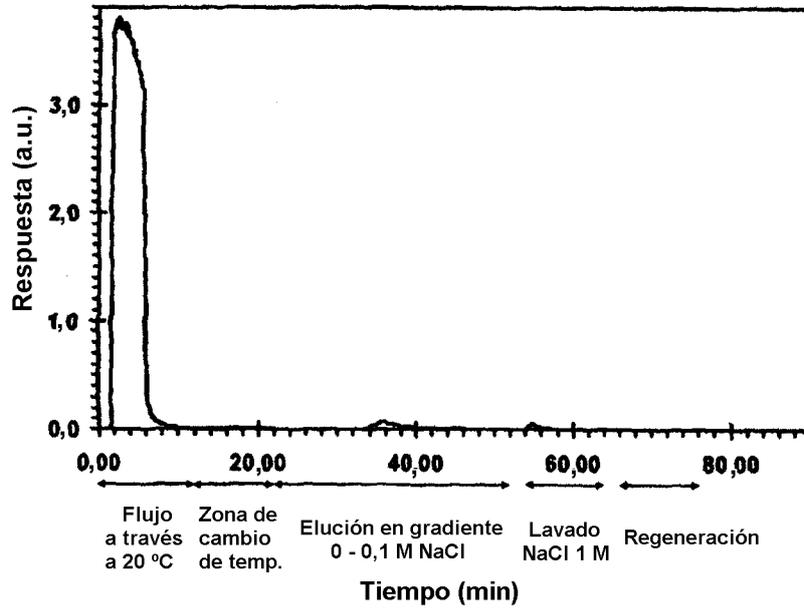


Figura 13

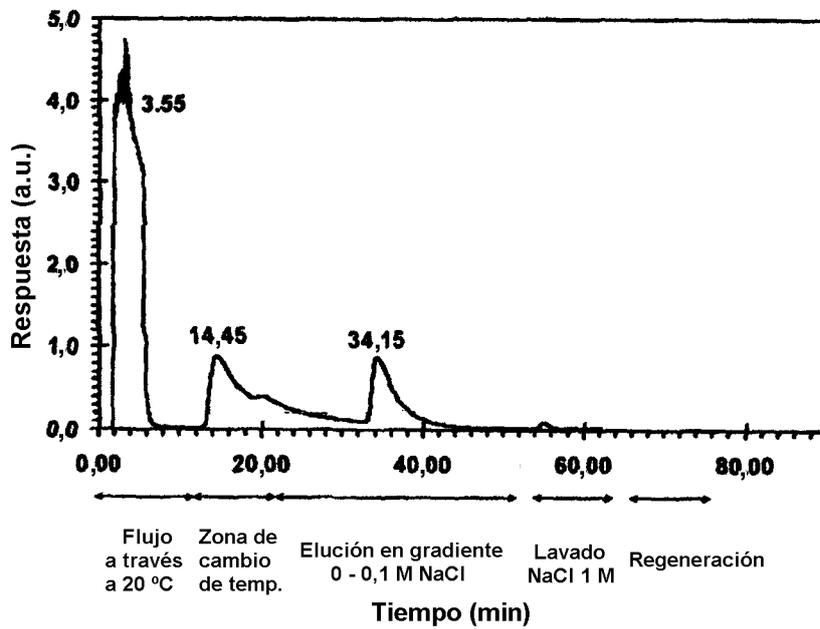


Figura 14

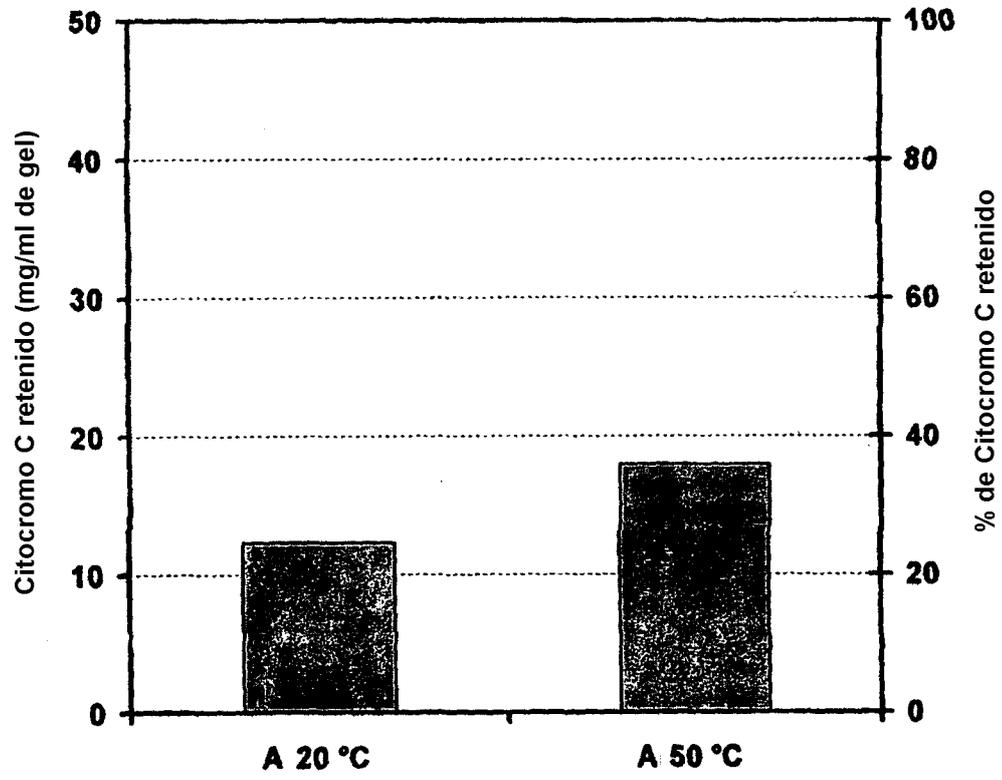


Figura 15

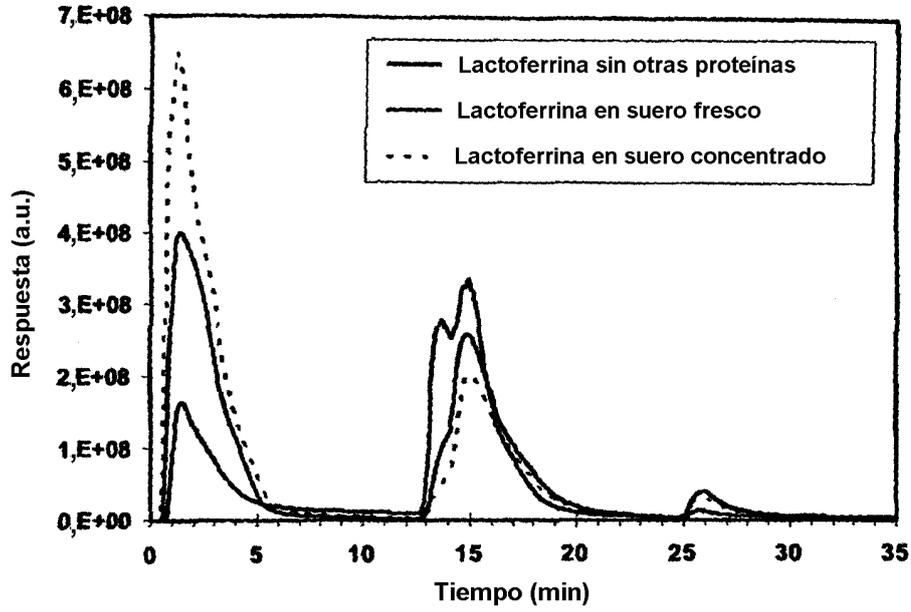


Figura 16

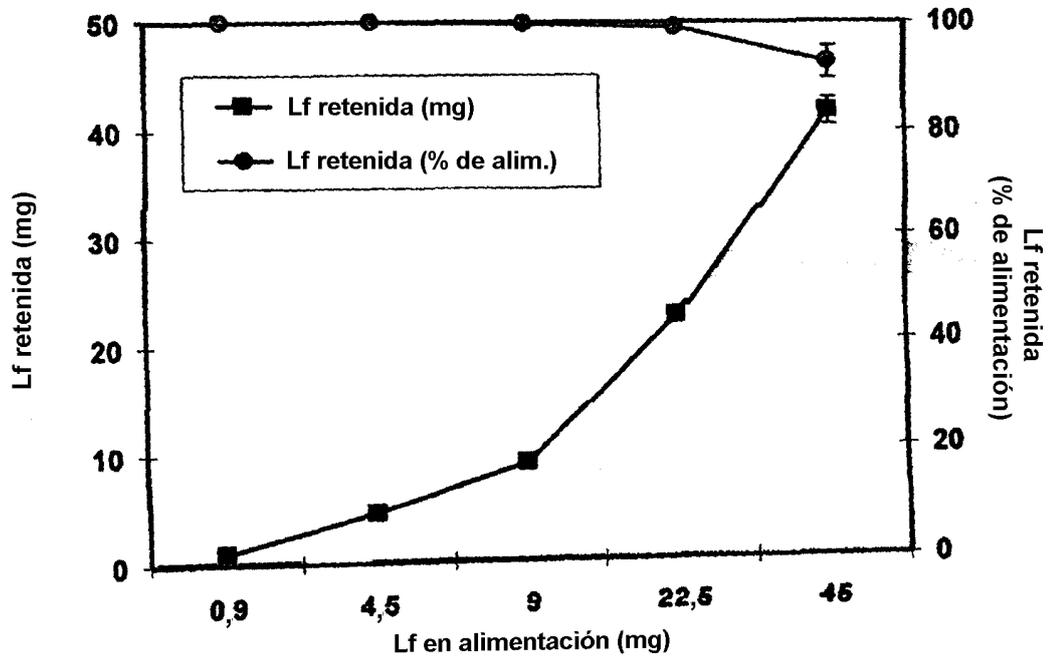


Figura 17

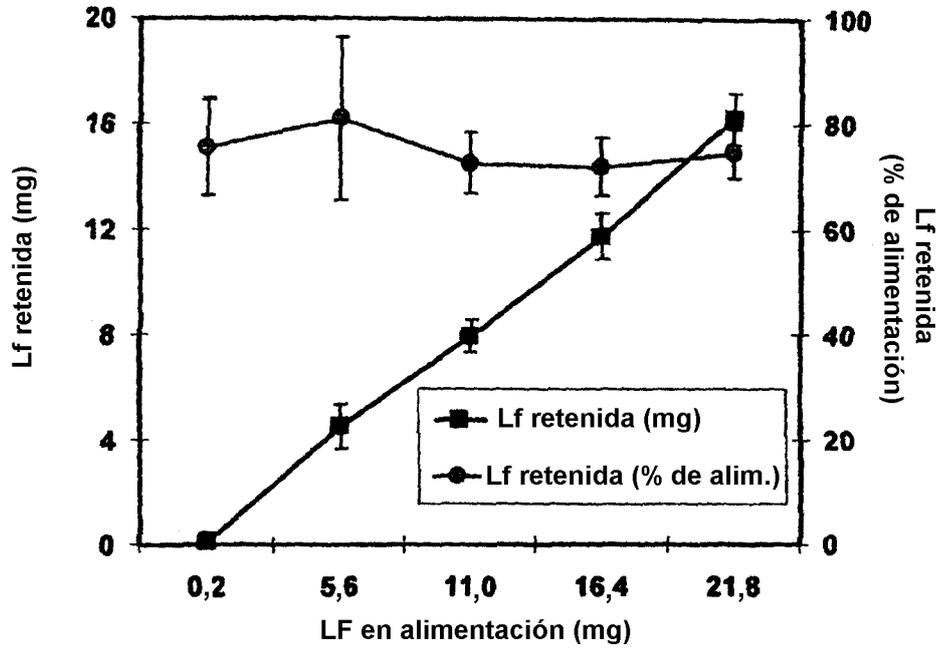


Figura 18

