

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 069**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2004 E 04722855 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 1613420**

54 Título: **Procedimiento para la ligazón selectiva de un sustrato a sorbentes mediante ligazón por lo menos bivalente**

30 Prioridad:

25.03.2003 DE 10313324

15.12.2003 DE 10358696

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

08.09.2015

73 Titular/es:

INSTRUCTION GMBH (100.0%)

Janderstrasse 3

68199 Mannheim, DE

72 Inventor/es:

GOTTSCHALL, KLAUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 545 069 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

Procedimiento para la ligazón selectiva de un sustrato a sorbentes mediante ligazón por lo menos bivalente

5 La invención se refiere a un procedimiento para la ligazón bivalente selectiva de un sustrato con por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón, a un sorbente. El mismo se selecciona de una colección de sorbentes, en cuya superficie se encuentran en cada caso por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón, que se obtienen por la descomposición de sustratos sintéticos o naturales situados en bloques estructurales que contienen estos grupos. El procedimiento de la ligazón bivalente selectiva es especialmente adecuado para el aislamiento de materiales sintéticos o también naturales, como también para la caracterización e identificación de la función y propiedades de estos materiales. El procedimiento de la ligazón bivalente selectiva puede usarse para la detección de las interacciones entre sustrato y receptor, para la selección sistemática de sustancias activas, para la separación selectiva de compuestos isoméricos, para la separación selectiva como también para la limpieza de sustratos.

10 De la cromatografía de bioafinidad ya se sabe inmovilizar químicamente sustancias en la superficie de un vehículo insoluble de elevado peso molecular, las cuales sustancias poseen una afinidad especialmente elevada con respecto a determinadas biomoléculas. Seguidamente permiten ligar estas o bien refinarlas.

15 En cuanto a estos vehículos, suele tratarse de sustancias inmovilizadas en biopolímeros. Sin embargo, por otra parte también es posible anclar sustancias de bajo peso molecular sobre la superficie, mediante las cuales sustancias es posible efectuar la ligazón o bien refinación de biopolímeros.

20 Al respecto, en estos casos se presenta entonces por lo general una afinidad suficientemente elevada solamente cuando el sorbente y el sustrato presentan grupos complementarios entre sí, que pueden formar una ligazón entre sí. Los grupos complementarios son normalmente grupos hidrófilos, que por medio de puentes de hidrógeno o dipolos o polipolos pueden interactuar entre sí, con lo cual tiene lugar la ligazón.

Ya es sabido que los sistemas biológicos pueden interactuar simultáneamente entre sí por medio de uno o más lugares de contacto moleculares (M. Whitesides et al., Angew. Chem. 1998, 110, 2908-2953).

25 Por otra parte, del documento WO 00/32649 se conocen polímeros como sorbentes para la separación de sustratos como también procedimientos para la separación de sustratos con ayuda de estos sorbentes. De esta manera se posibilita la separación por medio de por lo menos dos tipos distintos de interacciones. En este contexto, en cuanto a los grupos que intervienen en la ligazón, del sorbente que oficia de receptor, puede tratarse de un único tipo de grupos, pero sin embargo también de dos o más tipos distintos de grupos.

30 Por otra parte, en los documentos patente WO 00/32648, WO 01/38009 como también WO 00/78825 se divulgan interacciones entre sorbente y sustrato, que proveen buenas premisas para por lo menos una ligazón bivalente.

35 En estos procedimientos, para la ligazón selectiva de un sustrato es también necesario que el biopolímero adecuado para ello sea conocido y preparable, cuando se lo ha de usar como una parte del sorbente. Inversamente, si deben ligarse biopolímeros sobre el sorbente por medio de sustancias de bajo peso molecular, en tal caso es necesario que estas sean conocidas y pueden ser inmovilizadas sin modificar sus propiedades de ligazón sobre el vehículo.

40 También se conoce un procedimiento para preparar grupos sintéticos sobre un compuesto polímero para la ligazón de sustancias biológica y farmacológicamente activas. En este caso se fijan moléculas plantilla, que son sustancias biológica o farmacológicamente activas, en el compuesto polímero. Después de la unión por acoplamiento con grupos reactivos funcionales al compuesto polímero para la ligazón de sustratos, se desprenden nuevamente las moléculas plantilla (WO 00/13016).

45 Además se conoce un procedimiento para la separación selectiva de un compuesto orgánico elegido. En este caso, sobre la superficie de un vehículo se aplican grupos que son complementarios con respecto al compuesto que debe ser separado. En cuanto al compuesto a ser separado se trata preferiblemente de macromoléculas, que poseen grupos ionizables. Los grupos ligantes situados sobre la superficie del vehículo tienen una carga inversa a la de la macromolécula. Sin embargo, sobre el solvente se halla solamente un tipo de grupos por medio del que tienen lugar la ligazón (WO 93/19844).

Por otra parte, en el documento US 2002/0155509 A1 se divulga un procedimiento que puede en última instancia puede usarse para la separación selectiva de un sustrato a partir de una mezcla de sustratos. En este caso, se

pone en contacto la mezcla de sustratos con diferentes sorbentes y agentes de elución. Mediante espectrometría de desorción puede seguidamente establecerse si y con qué intensidad los sustratos combinados de sorbente/agente de elución elegidos están ligados a los sorbentes. Los sorbentes y agentes de elución pueden variar hasta que se encuentre una combinación adecuada de sorbente/agente de elución, que permita la separación selectiva de un sustrato (en este caso, los conceptos de "sorbente" y "sustrato" se apartan de la definición usada en el documento US 2002/0155509 A1, base de la presente solicitud y que se explican con mayor detalle en lo que sigue.

También ya se sabe inmovilizar grupos polares con radicales alquilo de larga cadena sobre la superficie del vehículo, con lo que se forman sorbentes con por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón. En este caso, en una primera etapa de reacción se convierten clorosilanos que están sustituidos con un radical alquilo que preferiblemente es de cadena mediana o larga, por ejemplo, un radical alquilo C₈ o C₁₈, con grupos OH de la superficie del vehículo, por ejemplo silanol de gel de sílice, en donde los radicales alquilo mencionados sobre la superficie del vehículo son inmovilizados. En una segunda etapa se hace seguidamente reaccionar la superficie del vehículo con trimetoxi o trietoxisilanos, a lo que se acopla una etapa de hidrólisis bajo separación de alcohol bajo formación de un grupo silanol. Además, también es posible hacer reaccionar compuestos de silicio tales como alquiltrialcoxisilanos, como por ejemplo octadeciltrimetoxisilano, con grupos OH de la superficie del vehículo, con lo cual en primera instancia se inmoviliza el radical alquilo. Los radicales alcoxi que no han reaccionado pueden seguidamente ser hidrolizados bajo formación de grupos silanol, con lo que se genera el segundo grupo, capaz de ligazón. Éstos sorbentes deberían ser especialmente adecuados para la ligazón de sustratos a partir de soluciones acuosas (Column Watch, LC*GC Europe, Diciembre de 2002, páginas 780-786).

Por lo general, en el caso en que mediante sorbentes han de separarse sustratos de estructura y/o propiedades de ligazón todavía desconocidas, estos procedimientos descritos del estado de la técnica no permiten predecir específicamente de antemano hasta qué punto un determinado sorbente es adecuado para la ligazón selectiva del sustrato, o no. En este caso, debe investigarse mediante investigaciones generalmente laboriosas si los sorbentes conocidos son adecuados para la ligazón selectiva del sustrato o no. Por ello el descubrimiento de un sorbente adecuado es más bien fortuito.

Por ello la invención tenía el objetivo de proporcionar un procedimiento para preparar un sorbente mediante el que un sustrato o también diversos sustratos sean ligados mediante ligazón bivalente.

Estos objetivos pudieron alcanzarse con ayuda de por lo menos un sorbente, que presenta un polímero no ligado de manera no covalente, aplicado sobre un vehículo, y que está provisto con por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón, que pueden interactuar de manera complementaria y bivalente con por lo menos dos grupos en el sustrato. De esta manera, y a diferencia de la interacción monovalente, que varía entre poco selectiva o no selectiva en absoluto, se presenta un refuerzo. Seguidamente el compuesto deseado es conservado por el sorbente con mayor firmeza que en el caso de los competidores que solamente ligan de manera monovalente, con lo que a diferencia de estos competidores se logra la ligazón selectiva. En comparación con otros sustratos competidores polivalentes es posible lograr la ligazón selectiva mediante un sorbente optimizado, cuyas propiedades necesarias para ello pueden determinarse con ayuda de una colección de solventes.

Por lo tanto, el objeto de la invención es un procedimiento para la ligazón bivalente selectiva de un sustrato sintético o natural con por lo menos dos grupos capaces de ligazón en un sorbente, que comprende un vehículo sólido y por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón con el sustrato sintético o natural, en donde el procedimiento comprende las etapas (i) a (iv):

- (i) determinación de por lo menos dos grupos capaces de ligazón con un sorbente, de un sustrato sintético o natural;
 - (ia) ligazón de un polímero no derivatizado por medio de interacciones no covalentes en el vehículo;
 - (ii) introducción en cada caso de por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón con el sustrato sintético o natural por intermedio de por lo menos dos grupos funcionales, iguales o diferentes, del polímero, en este polímero bajo formación de por lo menos un sorbente; en cuanto a los grupos, se trata de grupos que son complementarios con respecto a los grupos determinados en la etapa (i), con lo que se origina un polímero derivatizado con por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón, y los correspondientes por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón se hallan presentes ligados covalentemente en el polímero, en donde
 - (a) los grupos se determinan de manera tal que las contribuciones de las energías de Gibbs de los grupos individuales para la ligazón no covalente con el sustrato dan un valor negativo de la energía de Gibbs ΔG , de manera tal que se presenta un refuerzo de la ligazón, que tiene como consecuencia una selectividad de separación α mejorada, con el que se separa de manera selectiva a partir de una mezcla de sustratos el sustrato a ser ligado con los por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón al por lo menos un sorbente usando por lo menos un sorbente.
- (ii) puesta en contacto del sustrato con el sorbente de la etapa (ii);

(iii) Ensayo de la intensidad de ligazón al sorbente de la etapa (iii).

De esta manera, la invención permite reforzar de manera selectiva la ligazón entre sorbentes y sustratos o también bloquearla de manera selectiva, con lo cual es también posible mejorar Intencionalmente la selectividad de la ligazón de un sorbente con respecto a un sustrato que ha de ser separado de una mezcla de sustratos.

- 5 Por lo tanto, la invención establece un nuevo principio para la separación de un sustrato a partir de una mezcla de sustratos, que se diferencia fundamentalmente de los principios de separación de los procedimientos del estado de la técnica, por cuanto desarrolla e implementa una prometedora selectividad de separación para un par arbitrario de sustratos que debe ser separado.

10 El principio de separación de la presente invención se basa en la predicción, la evaluación cuantificable o en la medición de la intensidad de la ligazón no covalente forma de manera correspondiente entre por lo menos dos grupos distintos capaces de la ligazón consistentes en sorbente y sustrato. Los principios de separación de los procedimientos del estado de la técnica se basan en que la separación tenga lugar mediante procedimientos empíricos clasificados empíricamente y de manera aproximada en las categorías polar/no polar o bien hidrófilo/hidrofóbico y que por lo tanto son propensos a una aleatoriedad. Esto también ha sido documentado por
15 resultados de separación cuyo éxito hasta ahora ha sido frecuentemente no satisfactorio.

De acuerdo con la invención, los grupos en las etapas (ii) y los grupos de la etapa (i) son complementarios entre sí.

Dentro de los alcances de la invención, la designación sustrato se refiere a todas las sustancias del origen natural o sintético que puedan ser ligadas de manera selectiva. Es preferible que se trate de materiales, es decir de compuestos con una efectividad fisiológica y/o biológica en los organismos vegetales o animales vivientes. En
20 principio esto incluye la totalidad de los compuestos químicos y/o biológicos, naturales y sintéticos, que presenten dos o más grupos capaces de ligazón. Se trata preferiblemente de aminoácidos, oligopéptidos, nucleótidos, nucleósidos, proteínas, glucoproteínas, antígenos, antígenos-determinantes, anticuerpos, carbohidratos, enzimas, coenzimas, fermentos, hormonas, alcaloides, glicósidos, esteroides, vitaminas, metabolitos, virus, microorganismos, materiales contenidos en tejidos vegetales y animales, células, fragmentos de células, compartimentos de células,
25 residuos celulares, lecitinas, compuestos de flavilio, flavonas e isoflavonas, como también de materiales sintéticos tales como productos farmacéuticos y agentes fitoprotectores.

En la literatura pertinente, si los materiales a ser ligados son de bajo peso molecular, reciben también frecuentemente la denominación de ligandos. Los materiales ligantes que son de tipo proteína o que son de elevado peso molecular reciben frecuentemente la denominación de receptores.

30 Bajo la designación "sustrato" se incluyen también las etapas preliminares, que eventualmente puede ser útiles como material después de una modificación ulterior. Tales materiales potenciales reciben frecuentemente la denominación de "hits" o de "leads", cuando han sido derivatizados mediante procedimientos de selección sistemática usados para su determinación, o como "scaffolds (andamios)", "Needles (agujas)" o "farmacóforos" cuando han sido derivatizados a partir de características estructurales

35 Bajo la designación "sustrato" recaen además materiales cuya aislamiento, remoción u obtención a partir de mezclas pueden ser de utilidad económica. Entre estos figuran también materiales de bajo concentración y productos secundarios como, por ejemplo, procedentes de corrientes de proceso o de desechos. Los materiales puede también ser orgánicos, tales como péptidos, o productos metabólicos procedentes de fluidos corporales.

40 Bajo el concepto vehículo deben entenderse materiales que sirven base de asiento o armazón para los grupos ligantes. Durante la aplicación de estos grupos sobre el vehículo se forma el sorbente. Para usos cromatográficos se designa el sorbente también como fase estacionaria.

El concepto sorbente abarca cualquier combinación de vehículo con por lo menos dos grupos distintos capaces de ligarse a un sustrato.

45 El concepto bloque estructural se refiere a partes o bien fragmento de sustratos, preferentemente materiales que de manera correspondiente presenten por lo menos un grupo capaz de ligazón. Los ejemplos de tales bloques estructurales comprenden los epítopes. El concepto de bloque estructural puede también ser idéntico con el concepto de grupos capaces de ligazón. La disposición espacial de los bloques estructurales dentro de un sustrato recibirá en lo que sigue frecuentemente la denominación de sitio de ligazón. A título de ejemplo, la histidina es un bloque estructural que como grupo capaz de ligazón lleva un radical imidazol, que a su vez contiene grupos amidina o imina como grupos capaces de ligazón.
50

El concepto epítope se refiere a regiones moleculares de sustratos. A título de ejemplo, el concepto de epítope designa una región molecular de un antígeno, que puede ligarse a un anticuerpo. Tales lugares de ligazón de un anticuerpo también llevan la denominación de "antígeno-determinante".

El concepto de (diversos) grupos capaces de ligazón abarca la totalidad de los grupos que están en condiciones de ligarse con el sorbente y/o sustrato por intermedio de interacciones covalentes o no covalentes. En la literatura anglosajona, este concepto también lleva la designación de binding site residue. Por lo demás, esto abarca todos estos compuestos o radicales de compuestos que en la literatura especializada se describen como adecuados para la formación de ligaciones no covalentes. El concepto de ligazón no covalente es explicado más adelante en la presente.

Los grupos capaces de ligazón comprenden preferiblemente radicales hidroxilo, carboxilo, amida, amino, i-butilo, felino, nitrofenilo, naftilo, pero también diol, hidroxilfenilo, carbonilo, imina, alquileo, alquinilo, indoilo e imidazoilo. Por lo tanto, un grupo capaz de ligazón puede contener también por lo menos un grupo funcional. Sin embargo, los grupos capaces de ligazón no se limitan a los grupos funcionales.

Un grupo capaz de ligazón también puede ejercer más de una forma de la interacción energética, es decir, puede llevar a cabo más de un tipo de ligazón no covalente. A título de ejemplo, el radical indol está fundamentalmente en condiciones de ejercer simultáneamente con sustancias a ser ligadas, interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, interacciones $-\pi-\pi-$ e interacciones dispersivas. En cambio, al radical indeno le falta la capacidad de interacción iónica, y su interacción dispersiva es menos acentuada.

Las contribuciones individuales para la ligazón también dependen del medio solvente. Es posible influir de manera selectiva sobre estas contribuciones mediante la elección de la composición del solvente, del valor del pH y de la temperatura. En términos generales, las interacciones de van der Waals en los solventes orgánicos son menos acentuadas que en las mezclas de solventes acuosos. En cambio, las interacciones por puente de hidrógeno dominantes en los solventes apróticos disminuyen fuertemente al aumentar el contenido de agua.

El término diferente significa que o bien los grupos poseen una composición elemental diferente, o bien que a igualdad de composición elemental los elementos presentes en los grupos están anudados de distinta manera, o bien que los grupos están ligados entre sí químicamente de distinta manera. Al respecto, la diferenciabilidad entre por lo menos dos de los grupos capaces de ligazón incluye también la disposición estérica con respecto a una sustancia a ser ligada. Una disposición de este tipo se refiere por ejemplo a la diferenciación entre estereoisómeros, en especial diastereómeros y enantiómeros. Por ejemplo, los grupos hidroxilo en posición cis son diferentes de los grupos hidroxilo en posición trans, o los grupos hidroxilo de forma R son diferentes de los de una forma S. Estas diferencias pueden ser detectadas mediante procedimientos físicos, por ejemplo mediante espectroscopia de RMN, por cuanto tales grupos no son magnéticamente equivalentes y en espectro RMN resultan en señales de resonancia distintas. La detección también puede tener lugar mediante análisis estructural con rayos X. Estos grupos también se caracterizan porque pueden poseer una diferente reactividad frente a los reactivos a los que son expuestos.

Por lo tanto, los diferentes grupos capaces de ligazón son en especial aquellos grupos que frente a la sustancia (sustrato) a ser ligada aportan de manera controlada correspondientes contribuciones distintas a la energía de interacción. Esta energía de interacción lleva también la denominación de energía de Gibbs de interacción ΔG . Tales grupos pueden por demás ser iguales en cuanto a su constitución, configuración y conformación, pero diferentes en cuanto a su incidencia numérica en la interacción. Por ejemplo, los grupos carboxilo en los derivatizados de ácido glutámico pueden presentar una interacción distinta. También es posible que radicales ramnosa diferentemente ligados presenten una incidencia numérica en la interacción, que puede usarse por ejemplo para la separación de la naringina y rutina.

A su vez, las diferentes contribuciones a la energía de Gibbs de interacción ΔG pueden presentar de manera correspondiente componentes de entalpía y de entropía de diferentes magnitudes. Por lo tanto es posible que si bien dos interacciones iónicas de los grupos carboxilo contenidos en la sustancia a ser ligada presenten contribuciones casi iguales en cuanto a la interacción entalpía ΔH , el segundo sitio de ligazón presente sin embargo una contribución a la entropía ΔS negativa relativamente mayor.

Inversamente, también sucede que en un sustrato haya por lo menos dos grupos capaces de ligazón situados físicamente inmediatamente adyacentes entre sí que son químicamente iguales o equivalentes. Sus contribuciones a la interacción se diferencian eventualmente de una manera sólo gradual o ya no cabe diferenciarlas dentro de la exactitud de la medición. La ligazón estequiométrica de tales grupos entre sí o con respecto a otros grupos capaces de ligazón se tiene en cuenta durante la preparación del sorbente, por medio del grado de derivación. Para las soluciones o suspensiones del sorbente, este grado de derivación es también la medida para indicar las concentraciones respectivas.

Un ejemplo de una acumulación de grupos capaces de ligazón iguales o aproximadamente equivalentes desde el punto de vista energético es el representado por los receptores de esteroides. Para el contacto con estradiol o progesterona tales receptores contienen hasta siete radicales leucina, que por medio de sus radicales alquilo se ligan al ligando. A esto se añaden hasta tres lugares de ligazón polares, consistentes en arginina, glutamina (ácido glutámico) e histidina. De acuerdo con la invención, estos receptores podrían simularse de manera simplificada, introduciendo en relaciones de concentración adecuadas radicales i-pentilo de ácido metilvaleriánico y grupos

polares como amida de ácido succínico como también grupos básicos tales como amina o imidazol.

De una manera utilizable, tales sorbentes no solamente tienen la capacidad de ligarse fuertemente a la molécula objetivo estradiol, sino también a una serie de sustancias sintéticas y naturales, que en ensayos fisiológicos e *in vivo* despliegan una acción similar a la de los estrógenos. Entre éstas figuran por ejemplo el dietilestilbestrol como también genistina.

En tales casos, el sorbente es preferiblemente calibrado como receptor polimérico sintético con sustancias activas de este tipo, pero también con sustancias estructuralmente relacionadas, pero no efectivas, tales como tamoxifeno, testosterona o catequina. Resulta una utilidad práctica cuando las sustancias que se ligan bien al receptor natural también muestran una fuerte ligazón al sorbente, a diferencia de sustancias que ya en el modelo se ligan débilmente o de una manera no específica. En el caso de recurrirse a una optimización estructural, además de la relación entre los grupos capaces de ligazón también se ajusta el grado de reticulación, que controla la magnitud y la aptitud espacial de los puntos de ligazón.

Los sorbentes de este tipo se ligan a aquellas sustancias procedentes predominantemente o aun exclusivamente de mezclas de sustancias disueltas, que también se ligan fuertemente al modelo-proteína biológica. De esta manera es posible aislar en forma pura sustancias potencialmente activas de manera rápida y sencilla a partir de mezclas de sustancias de procedencia natural o sintética.

Un aspecto importante de la invención es la elección, ampliamente libre, de solventes para el procedimiento o bien uso de acuerdo con la invención. La secuencia y los órdenes de magnitud de las diferencias en la energía de ligazón entre las sustancias fuertemente ligantes y débilmente ligantes permanece ampliamente sin variar, lo que es sorprendente, cuando al eluyente acuoso se le añaden grandes cantidades de alcohol y adicionalmente ácidos o tampones. La adición de metanol bloquea preferentemente la ligazón y de manera considerable la ligazón para la totalidad de las sustancias usadas en la calibración, sin que se afecte la clasificación en los grupos de las sustancias que ligan fuertemente y débilmente. La consecuencia de ello es una elución considerablemente más temprana bajo condiciones de cromatografía. De esta manera es posible ensayar o aislar las sustancias de interés en un tiempo aceptable, ya que gracias a la adición de solventes orgánicos se reducen las constantes de ligazón en comparación con agua pura o tampón fisiológico, en potencias de 10.

La expresión ligazón no covalente significa que los grupos capaces de ligazón pueden ligarse entre sí preferentemente por medio de pares de iones, por medio de ligaciones por puentes de hidrógeno, por medio de interacciones dipolo—dipolo, por medio de interacciones de transferencia de carga, por medio de interacciones π - π , por medio de interacciones de cationes- π -electrones, por intermedio de interacciones de van der Waals y de interacciones dispersas, por intermedio de interacciones hidrofóbicas (lipofílicas), por medio de formación de complejos, preferiblemente formación de complejos de cationes de metales de transición, como también las combinaciones de estas interacciones.

Mediante el término complementario se da entender que pueden ligarse entre sí solamente aquellos grupos que hacen juego entre sí. Al respecto, la unión causada por la ligazón ha de ser energéticamente favorable. Cuánto más acentuada sea la ligazón no covalente de los grupos mencionados entre sí, tanto más fuertemente se ligará el sustrato al por lo menos un sorbente. Al respecto es también posible que con respecto a un grupo haya varios grupos complementarios. Como ejemplo, para los grupos hidroxilo pueden ser complementarios los grupos carboxilo, los grupos amina y los grupos amida.

El concepto grupos complementarios también abarca que tales grupos pueden ser reemplazados por grupos que son similares desde el punto estructural a los grupos complementarios o que estén relacionados estructuralmente con éstos. A título de ejemplo, en una ligazón no covalente, basada en la interacción- π - π , es posible reemplazar un radical naftilo por un grupo antraceno, con lo cual es posible modular o acrecentar en mayor grado la contribución del compuesto aromático a la intensidad de ligazón de la ligazón no covalente. De una manera análoga a ésta, es posible elevar más aún la contribución de un radical indol en una ligazón no covalente dispersiva mediante su reemplazo con un radical acridina.

La intensidad de la interacción entre grupos complementarios, que por ejemplo puede ser medida y expresada como constante de ligazón, resulta de las contribuciones de los grupos individuales capaces de ligazón. Estas contribuciones individuales a las constantes de ligazón dependen no solamente del tipo de interacción no covalente, sino también de las distancias y de la orientación (ángulo) de los grupos que interactúan entre sí como también de la composición del agente solvente. Los tipos de interacción individuales se diferencian considerablemente desde el punto de vista energético, y la ligazón y con ello la energía de Gibbs disminuye en diversos grados al aumentar la separación entre estos grupos.

Los grupos complementarios entre sí también se destacan porque las contribuciones de energías de Gibbs de los grupos individuales para la ligazón no covalente tiene como resultado una modificación del ΔG de la energía de Gibbs, que adopta un valor negativo (correspondientemente grande). Al respecto, de acuerdo con la invención se

eligen los grupos de manera tal que la modificación de la energía de Gibbs ΔG conduce a un refuerzo de la ligazón, de lo que resulta una selectividad de separación mejorada con respecto a las sustancias que han de ser separadas.

5 En términos completamente generales, tiene lugar una mejora de la selectividad de separación cuando el valor de ΔG para la ligazón entre los grupos complementarios elegidos y del sustrato (el sustrato objetivo) es suficientemente más negativo (o se vuelve más negativo en un grado suficiente) que el valor de ΔG entre este sorbente y una sustancia ser separada. En este caso, durante la cromatografía se eluye la sustancia a ser separada más tempranamente, y se liga más débilmente. Sin embargo, también se presenta una mejor selectividad de separación cuando la sustancia a ser separada es ligada selectivamente en mayor grado que el sustrato (sustancia objetivo) mediante la introducción de otros grupos complementarios, es decir debido a la modificación concomitante del valor de ΔG .

De acuerdo con la invención, el objetivo de la separación en cuanto a una suficiente selectividad de separación se logra siempre cuando en el complejo sorbente-sustrato interviene por lo menos un grupo complementario en la ligazón con el sustrato en mayor grado o con mayor intensidad (por ejemplo, en el caso de los estereoisómeros) que en el complejo entre el sorbente y la por lo menos una sustancia que debe ser separada.

15 Como ejemplos de valores típicos para la mencionada energía de interacción ΔG (kJ/mol), que es función del agente solvente, tenemos:

- para la interacción iónica de -4 a -6, en donde la intensidad o bien amplitud de esta interacción disminuyen de manera inversa con respecto a la separación. Un ejemplo de una interacción de este tipo es la interacción entre un ácido carboxílico y un nitrógeno aminico cuaternario en agua;
- 20- para la interacción ion-cuadrupolo -1, en donde la intensidad o bien amplitud disminuye a la tercera potencia en función de la separación. Un ejemplo es la interacción entre nitrógeno cuaternario de los compuesto amonio y un grupo areno en agua;
- para la interacción dispersiva (dipolo inducido) -1,75, en donde la amplitud o intensidad disminuye con la sexta potencia de la separación. Un ejemplo es la interacción entre dos grupos areno en cloroformo;
- 25- para puentes de hidrógeno de -4 a -6. Un ejemplo es la interacción entre dos grupos amida en cloroformo. En tetracloruro de carbono, la energía de interacción entre tales grupos es de aproximadamente -10;
- para el efecto hidrofóbico -2,3, como resulta entre alcano y radical metileno en agua.

30 Si de acuerdo con la invención se ligan hidantoínas bivalentemente a grupos amonio en cloroformo, se medirán valores de ΔG de hasta -22 kJ/mol. En cambio, en el caso de la ligazón monovalente de un derivatizado de succinimida, los valores de ΔG serán en promedio de solamente -9 kJ/mol. La diferencia entre ambos valores de ΔG es por lo tanto de aproximadamente 13 kJ/mol; el valor correspondiente para la selectividad de separación es de aproximadamente 200. Éstos valores permiten llegar a conclusiones sobre la existencia de ligaciones de puentes de hidrógeno y a un refuerzo entrópico en especial de la interacción bivalente.

35 En un dado sistema de agentes de solución, para cada tipo de interacciones no covalentes pueden las energías de Gibbs función de la separación, estar compuestos de diferentes maneras en una contribución de entalpía y una contribución de entropía.

40 De acuerdo con la invención, estas contribuciones individuales son determinadas mediante el ensayo de las intensidades o fuerzas de ligazón de un primer sustrato, que contiene 1, 2,3,... n grupos capaces de ligazón, con por ejemplo una cantidad de segundos sustratos, cuyos grupos capaces de ligazón están elegidos de manera tal que es posible efectuar predicciones en cuanto a un determinado tipo de interacción. De esta manera, es posible usar primeros sustratos, que preferentemente contienen radicales amino, acetilo, bencilo, nitrofenilo e isopentilo, como también combinaciones de dos o tres de éstos. En este caso, los segundos sustratos consisten en derivatizados de preferiblemente alanina, ácido asparagínico y ácido glutámico. Los grupos protectores N-terminales de estos derivatizados son preferiblemente sea alifáticos sea aromáticos.

45 Las energías de ligazón pueden determinarse preferiblemente como valores de k' a partir de ensayos de HPLC socráticos. Cuando se conoce la concentración de los grupos capaces de ligazón en el primer sustrato y la relación volumétrica de fases entre la fase inmovilizada (estacionaria) y la fase móvil, es posible determinar, a partir del valor de k' , la constante de ligazón K_A y nuevamente, a partir de esta, la variación de la inercia de Gibbs ΔG . La variación de la entalpía ΔH y la variación de la entropía ΔS pueden determinarse por ejemplo mediante microcalorimetría o mediante la medición, función de la temperatura, de las constantes de equilibrio, que también llevan la denominación de t Hoff-Plot. Seguidamente, y mediante comparación de las correspondientes energías de interacción entre las variantes de receptor seleccionadas y ligandos, es posible verificar en qué medida las contribuciones de interacción se suman, refuerzan o debilitan. Por supuesto, los procedimientos para la determinación de la ligazón no se limitan a

los mencionados en lo que precede. Además, es posible usar todos los procedimientos de determinación usuales tales como ensayos competitivos, resonancia de plasmón de superficie o titulación de RMN. La determinación de las energías de interacción puede tener lugar en forma de ensayos miniaturizados y en forma de una determinación en paralelo.

5 Bajo condiciones estéricamente favorables se adicionan las contribuciones a la energía de Gibbs para los grupos capaces de ligazón. De esto se desprende que las contribuciones a las constantes de ligazón se multiplican. Además de ello, son posibles efectos de cooperación, que contribuyen a un mayor refuerzo de la ligazón. También bajo condiciones estéricas menos favorables puede lograrse por lo general por lo menos un refuerzo de ligazón bivalente. Esto es de gran utilidad para usos prácticos, dado que el refuerzo de la ligazón, en caso de una elección adecuada de los radicales capaces de ligazón, tiene como efecto una selectividad de separación prácticamente mejorada por completo con respecto a las sustancias que han de ser separadas (sustancia de acompañamiento/componente secundario).

15 Bajo la expresión no complementario se entiende que en la ligazón pueden intervenir grupos que proveen contribuciones que son más débiles para la ligazón no covalente que las contribuciones de los grupos complementarios. Por lo tanto, la intensidad o fuerza de ligazón entre los grupos no complementarios está expresada más débilmente que la ligazón entre grupos complementarios. Dentro de los alcances de la invención, los grupos que no son complementarios entre sí conducen a un bloqueo de la ligazón no covalente formada entre estos grupos o a debilitamiento del sitio de ligazón conjunto afectado, o carecen de efecto de ligazón. Se destacan preferiblemente por el hecho que las contribuciones de energías de Gibbs de los grupos individuales para la ligazón no covalente tienen como resultado una variación de la energía de Gibbs ΔG , que es nula o adopta un valor positivo.

20 Mediante el término determinación se entiende una selección selectiva, por ejemplo una selección selectiva de grupos capaces de ligazón.

25 El por lo menos un sorbente preparado de acuerdo con este procedimiento puede usarse para reconocer las interacciones entre sorbente y sustrato. Como procedimiento para el reconocimiento es especialmente adecuado el procedimiento de acuerdo con la invención para la ligazón bivalente selectiva del mencionado sustrato al mencionado por lo menos un sorbente. Como medida para el reconocimiento puede recurrirse a la intensidad o fuerza de la ligazón. Si se presenta una ligazón suficientemente fuerte entre sorbente y sustrato, se obtiene una predicción acerca de cuáles grupos del sustrato y cuáles grupos del sorbente pueden ligarse entre sí.

30 Si no se conocen los grupos del sustrato, podrá en caso de necesidad llegarse a la conclusión de cuáles grupos capaces de ligazón pueden estar presentes en el sustrato, en el sitio de ligazón.

Sin embargo, también es posible descomponer regiones moleculares de un sustrato de estructura desconocida en forma de bloques estructurales adecuados, por ejemplo epítopes, y reajustar esta estructura, o una estructura complementaria con respecto a ésta, mediante disposiciones adecuadas de los bloques estructurales, al sorbente.

35 En este contexto, la descomposición puede efectuarse indistintamente basándose en procedimientos químicos, físicos o químico-físicos, como por ejemplo mediante reacciones de desintegración química o mediante ultrasonido, pero también mediante experimentos virtuales. Para estos experimentos virtuales también es posible recurrir a procedimientos apoyados por computadora, con cuya ayuda es posible obtener informaciones acerca de las posibilidades de ligazón presentes en los bloques estructurales del sustrato.

40 La descomposición parte del hecho de que la cantidad de todos los bloques estructurales capaces de interacción y el número de grupos capaces de ligazón es finito y limitado y que es posible delimitarlos de manera correspondiente para un planteo concreto del problema. A partir de cualquier cantidad aleatoriamente elegible de tales grupos es posible establecer categorías arbitrarias de combinaciones con en cada caso m elementos ($m = 2, 3, 4, m, \dots$). Un ejemplo de ello sería la categoría 3 con todas las combinaciones posibles de cada caso tres grupos capaces de ligazón de entre una selección $n = 5$, con, por ejemplo grupos fenilo, alquilo, amino, carboxilo y amida.

45 De esta manera es posible descomponer cada proteína en 20 bloques estructurales, a saber los aminoácidos, de los cuales nuevamente de $n = 6$ a $n = 9$ grupos capaces de ligazón son relevantes en una primera aproximación para la interacción no covalente con un segundo sustrato. Esta reducción se debe al hecho de que el mismo grupo capaz de ligazón, o un grupo equivalente, se halla contenido en varios aminoácidos, como por ejemplo los grupos hidroxilo, carboxilo y amida, y no interesa una función básica si se trata de un escalonamiento gradual entre lisina, arginina o histidina.

50 De manera similar es posible usar como bloques estructurales las 8 cetoheptosas isoméricas o las 16 aldohexosas estereoisoméricas y las piranosidas y furanosidas, que representan oligosacáridos.

En este sentido, cada sustrato arbitrario desconocido consiste en una cantidad enumerable de bloques estructurales, que a su vez contienen una cantidad definida de grupos capaces de ligazón. Los bloques estructurales y los grupos

capaces de ligazón provienen del conocimiento químico y por lo general son conocidos en función de tipo y propiedades. Esto rige en especial cuando están asociados con la química orgánica o la química de los complejos.

5 Dado que para cada combinación de los bloques fundamentales conocidos y de grupos capaces de ligazón es posible preparar de antemano bibliotecas de una amplitud arbitraria de sorbentes complementarios a estos e idénticos, puede fundamentalmente cada bloque estructural tomado de una región molecular o de un lugar de vinculación de un sustrato de estructura desconocida, estar contenida en una biblioteca o ser incluida en ésta. Rige lo mismo para las combinaciones de grupos capaces de ligazón.

10 En el caso de la modalidad de procedimiento de acuerdo con la invención, puede también haber un contenido de varios sorbentes, es decir una colección de sorbentes. En este caso un segundo sustrato, conocido o desconocido, diferente del primer sustrato, y cuyos grupos capaces de ligazón son conocidos, puede ser puesto en contacto con esta colección de sorbentes a efectos de determinar las fuerzas de ligazón. De esta manera se obtiene una predicción de cómo están dispuestos los bloques estructurales en el sitio de ligazón del segundo sustrato, y de cómo está hecha la estructura espacial del sitio de ligazón. De esta manera es también posible usar el nuevo procedimiento para tener una idea clara de la estructura.

15 Además, el nuevo procedimiento para la ligazón bivalente selectiva del sustrato mencionado es también sumamente útil para el desarrollo de sustancias activas, preferiblemente para el desarrollo de medicamentos. De manera conocida, la actividad de un medicamento se basa en que está ligado bajo condiciones fisiológicas a un receptor natural, que por ejemplo puede ser una hormona o una enzima. Es ahora posible descomponer los lugares de ligazón del receptor natural de la manera anteriormente descrita y generar una colección de sorbentes. Cada sorbente de la colección de sorbentes contiene entonces bloques estructurales (o partes de bloques estructurales) de estos lugares de ligazón. Es preferible que también se reajuste la disposición espacial de los bloques estructurales, más preferentemente la disposición espacial de los bloques estructurales en su conjunto. Si ahora se determina la fuerza de la ligazón de un sustrato arbitrario, por ejemplo de un medicamento, en correspondencia a cada una de estas partes de receptor sintético, de las cuales en cada caso solamente otra parte estructural representa el receptor natural, se obtiene, a partir de los datos de ligazón, una información acerca de si este sustrato puede entrar o no en una interacción con el receptor natural, y en caso afirmativo, con cuáles grupos del receptor dispuestos espacialmente. Mediante correspondiente modificación química es seguidamente posible optimizar el sustrato, es decir el medicamento a ser desarrollado, hasta que esté dada la máxima ligazón al receptor.

20 El procedimiento es adecuado para aislar biopolímeros, preferentemente proteínas o glicoproteínas, desconocidos o solamente postulados debido a una función determinada, y para validarlos en cuanto a sus propiedades.

De manera comparable es posible sintetizar - a partir de péptidos de displays de fagos, a partir de oligonucleótidos o a partir de otras matrices una estructura sorbente complementaria, que puede emplearse directamente para el aislamiento de moléculas de sustancias activas tomadas de mezclas.

35 Inversamente, mediante la representación de los criterios estructurales típicos para sustancias activas sobre la superficie del sorbente, a partir de mezclas de sustratos es posible en cada caso ligar el correspondiente sustrato, y caracterizarlo. Por ejemplo, un sustrato de este tipo es un receptor.

40 En la etapa (i) tiene lugar la selección de por lo menos dos grupos distintos, que son capaces de ligar un sustrato sintético o natural a un sorbente, mediante la determinación de los grupos mencionados de sustrato sintético o natural. La determinación de por lo menos dos grupos distintos, que son capaces de ligar un sustrato sintético o natural a un sorbente, puede tener lugar de cualquier manera posible, es decir, pueden elegirse grupos arbitrarios mediante procedimientos arbitrarios, en la medida que esto sea compatible para la ligazón. En una forma de realización preferida, la selección tiene lugar en función de las interacciones no covalentes previsibles con el sustrato.

45 En esta forma de realización de la invención, la determinación de acuerdo con la etapa (i) abarca preferiblemente la descomposición de un sustrato sintético o natural en por lo menos dos bloques estructurales con por lo menos dos grupos capaces de ligarse con un sorbente.

Dentro de los alcances de la invención, en una forma de realización, en la etapa (i) es posible descomponer el sustrato sintético o natural meramente en dos bloques estructurales, con en cada caso un grupo capaz de ligazón, en donde en la etapa (ii) se obtiene meramente un sorbente.

50 Sin embargo, también es posible descomponer el sustrato sintético o natural en tres bloques estructurales, cuya combinación de a pares en la etapa (ii) conduce a tres sorbentes.

En la descomposición en cuatro bloques estructurales, por medio de la combinación de a pares en la etapa (ii) se obtienen seis sorbentes.

Sin embargo también es posible, en caso de hallarse presentes tres bloques estructurales distintos además de la combinación de a pares en la etapa (ii), que sea posible aplicar estos tres bloques estructurales conjuntamente como un triplete sobre un sorbente. Además de los tres sorbentes anteriormente mencionados se obtiene entonces también un cuarto sorbente. De manera análoga a esto, es también posible, en caso haber cuatro bloques
 5 estructurales distintos diferentes además de la combinación de a pares en la etapa (ii), que conduce a seis sorbentes, obtener adicionalmente cuatro sorbentes, cada uno de los que contiene tres bloques estructurales distintos, yo un sorbente adicional, que contiene la totalidad de los cuatro bloques estructurales en forma de un cuarteto.

Basándose en ello, la invención también se caracteriza porque la selección de por lo menos dos grupos capaces de
 10 ligarse con un sorbente tomados de un sustrato sintético o natural en la etapa (i) conduce a dos bloques estructurales cada uno de los cuales con o por lo menos un grupo capaz de ligarse con el sorbente, y en la etapa (ii) se obtiene un sorbente; o, la selección de por lo menos dos grupos capaces de ligarse con un sorbente tomados de un sustrato sintético o natural en la etapa (i) conduce a tres bloques estructurales cada uno de los cuales con por lo
 15 menos un grupo capaz de ligarse con el sorbente y en la etapa (ii) se obtienen por lo menos 3 sorbentes; o, la selección de por lo menos dos grupos capaces de ligarse con un sorbente tomados de un sustrato o sintético o natural en la etapa (i) conduce a cuatro bloques estructurales cada uno de los cuales con por lo menos grupo capaz de ligarse con el sorbente, y en la etapa (iii) se obtienen por lo menos seis sorbentes.

De manera similar es también posible, de una cantidad mayor de i bloques estructurales seleccionar n bloques
 20 estructurales y a partir de ellos combinar múltiples multiplétes de cada caso m grupos capaces de ligarse. A título de ejemplo, a partir de la mezcla de aminoácidos naturales es posible seleccionar los bloques estructurales fenilalanina, tirosina, isoleucina, ácido asparagínico, serina, lisina, triptófano e histidina ($n = 9$), de los cuales los tipos más importantes pueden estar recubiertos contra interacción no covalente. La combinación de correspondientes $m = 4$ grupos distintos capaces de ligazón de esta selección provee 126 variantes distintas de sorbentes, que también pueden emplearse de manera combinatoria o como ensayo para fines de ligazón y estudios de ligazón.

Cada una de estas n contribuciones de interacción no covalente provee para cada sorbente individual un valor
 25 característico para la interacción conjunta con una sustancia que debe ser ligada. Esta contribuciones individuales de cada uno de los grupos capaces de ligazón ($m = 1$) pueden determinarse en función de la solución dentro de un intervalo de variación que es desdeñable para el uso, para una sustancia arbitraria a ser ligada. De la misma manera es posible obtener los datos de medición para las interacciones de doblete con $m = 2$, para las interacciones de
 30 triplete con $m = 3$, etc.

De esta manera se obtiene un conjunto amplio de incrementos energéticos para las diferentes formas y
 combinaciones de interacciones no covalentes, que posibilita seguidamente la predicción para las fuerzas de ligazón entre dos sustratos o bloques estructurales arbitrarios. Al respecto, también se aprovecha el hecho que las diferentes
 35 interacciones no covalentes dependen del medio de solución y del valor del pH. En este contexto, las interacciones de puentes de hidrógeno se expresan fuertemente en los agentes solventes orgánicos apróticos, pero en los solventes polares apáticos o el agua apenas lo hacen. Los grupos carboxilo con radicales básicos en solventes orgánicos proveen fuertes puentes de sal; en cambio, por lo general en el agua se comprueba una interacción impulsada por entropía, comparativamente menor.

Esta interrelación ha sido comprobada por ejemplo con ayuda de la ligazón de derivatizados de aminoácidos en
 40 diferentes sorbentes. En este caso, y como ya se estableció, para una concentración conocida de los bloques estructurales aplicado al sorbente o para los grupos capaces de ligazón, a partir del valor k' de la medición cromatográfica, es posible llegar a conclusiones acerca de la constante de ligazón K_A . De esta manera se dispone de un procedimiento rápido y paralelizable para obtener constantes de ligazón de sustrato que compiten entre sí por el sitio de ligazón, aun cuando dichos sustratos se encuentran presentes en una mezcla compleja.

A partir de los valores de las constantes de ligazón y de las energías de ligazón, obtenibles para las combinaciones
 45 de interacciones multivalentes, es posible llegar a conclusiones de la manera descrita, en cuanto al tipo y número de los grupos capaces de ligazón de una sustancia a ser ligada, estructuralmente desconocida, o bien postular el fallo de otros grupos. De esta manera, permiten efectuar predicciones acerca de la cantidad de grupos carboxilo, grupos básicos o radicales alifático o aromáticos en un derivatizado de aminoácido o péptido, ligados.

De manera similar es posible efectuar predicciones acerca del comportamiento de ligazón predecible o posible,
 50 función de la estructura, entre dos sustratos de estructura desconocida, en cuanto se conozcan sus grupos capaces de ligazón. Esto puede aplicarse a péptidos o a fragmentos de proteína, cuando se conozca solamente su composición en aminoácidos.

También es posible predecir o describir el comportamiento de ligazón entre dos sustratos de una estructura
 55 desconocida, cuando adoptan una estructura espacial estable en el sistema solvente elegido. Dos proteínas o glicoproteínas con una estructura terciaria definida, que pueden iniciar una interacción entre sí en por lo menos un sitio de ligazón, ingresarán junto con los correspondientes representantes complementarios en una biblioteca de

sorbentes con una fuerza o secuencia de rango similares.

En otro caso de aplicación importante se describe la preparación de sorbentes, que representan un conjunto completo de todas las combinaciones de los grupos capaces de ligazón, que en un sitio de ligazón son complementarios con respecto a una proteína o glicoproteína. Esta biblioteca de sorbentes es seguidamente sometida a ensayo con un conjunto completo de ligandos, que representa por ejemplo todas las combinaciones de dos, tres y cuatro de exactamente los grupos capaces de ligazón en el sitio de ligazón de la proteína. En los sorbentes con la correspondiente ligazón más fuerte se encuentran entonces aquellos grupos capaces de ligazón que deberían estar preferentemente contenidos en una sustancia activa en desarrollo. Por supuesto, a estos sorbentes es también posible ligar las proteínas que han servido como muestras para los grupos complementarios.

De manera análoga es posible sacar conclusiones a partir de la muestra de ligazón de un péptido cíclico obtenido mediante ensayos de fagos, en cuanto al sitio de ligazón en el correspondiente objetivo proteína. Además de ello es posible, mediante representación complementaria de un péptido de este tipo, generar una matriz, respaldada por sorbente, para el descubrimiento de nuevas sustancias activas con una configuración y conformación adecuadas, es decir, que se corresponden a dicho péptido.

Por lo tanto, es posible usar el procedimiento también para la ligazón, caracterización y validación de objetivos proteína desconocidos y de puntos de ligazón para sustancias activas no competitivas o de acción moduladora. Además es posible convertir sustancias flexibles e inestables tales como los péptidos, en estructuras rígidas con una posibilidad de administración satisfactoria.

En todos los casos mencionados se posibilita el pronóstico de la estructura por el hecho que el sustrato es puesto en contacto con una selección de sorbentes bajo medición de los datos de ligazón. Al respecto, para deducir una estructura de sustrato complementaria, las interacciones faltantes o débiles son tan importantes como una ligazón fuerte. Si por ejemplo el sustrato contiene un grupo amino, la ligazón al sorbente que contiene grupos carboxilo tendrá una incidencia característica mayor que la ligazón del mismo sustrato a un sorbente que lleva grupos hidroxilo o aun grupos hidroxilo.

Un valor esencialmente práctico de esta modalidad de proceder consiste en la exclusión de la pluralidad de posibilidades posibles de la ligazón, teniendo lugar por lo menos una delimitación de los trabajos de experimentación a una cantidad, más investigable, de combinaciones de ligazón probables. Se usa el mismo principio durante la selección sistemática, durante el ensayo de una mezcla de sustancias en cuanto a las sustancias contenidas en ella con características estructurales prefijados. En este caso la gran utilidad práctica consiste en la exclusión, logrado sin trabajos de experimentación adicionales, de la gran pluralidad de sustancias no utilizables.

Es preferible que la descomposición tenga lugar en forma de bloques constructivos de manera tal que se obtienen bloques constructivos que en el sitio de ligazón del sustrato natural o sintético sean espacialmente directamente adyacentes entre sí. En este caso, la disposición del sitio de ligazón, en caso de descomposición en dos bloques constructivos puede caracterizarse mediante una representación lineal de estos bloques constructivos, en el caso de descomposición en tres bloques constructivos mediante un triángulo, y en el caso de descomposición en cuatro bloques constructivos mediante un tetraedro (distorsionado).

Si el sitio de ligazón mencionado está configurado de manera tal que en el mismo se hallan preferiblemente presentes tres o cuatro grupos constructivos cada uno de ellos con por lo menos un grupo capaz de ligazón, en el sitio de ligazón mencionado los sustratos estereoisoméricos, más o menos como se encuentran presentes en mezclas racémicas, estarán por lo general ligadas con fuerzas distintas.

En virtud de ello, también los sustratos estereoisoméricos obtenidos mediante el procedimiento inventivo con ayuda del por lo menos un sorbente pueden estar ligados con distintas fuerzas. Esta propiedad puede usarse para el desarrollo de sustancias activas, ya que de manera conocida los compuestos estereoisoméricos pueden presentar distintas acciones fisiológicas.

El novedoso procedimiento representa por lo tanto un procedimiento útil para la separación selectiva de uno o varios compuestos estereoisoméricos a partir de una mezcla de compuestos estereoisoméricos. A título de ejemplo, puede usarse para la división en racematos.

A título de compuestos estereoisoméricos adicionales que pueden ser ligados selectivamente, pueden mencionarse los diastereómeros, confórmeros, isómeros geométricos tales como los isómeros cis y trans, los epímeros, como también los anómeros tales como los azúcares α y β glicosídicos.

Pero, no solamente los compuestos estereoisoméricos pueden ser ligados selectivamente con ayuda del nuevo procedimiento, sino también los isómeros de constitución, es decir, los compuestos que tienen la misma composición elemental, pero en los que los elementos están dispuestos de distinta manera entre sí.

Puede darse por posible por ejemplo la separación de compuestos aromáticos de anillo, que por lo demás tienen la misma fórmula global pero que se diferencian por el tipo de anudamiento de los anillos de carbono.

5 Durante la introducción de dos grupos distintos capaces de ligazón con el sustrato de acuerdo con la etapa (ii) en el procedimiento de acuerdo con la invención, por lo general no se puede evitar que en el por lo menos un sorbente formado no solamente se formen regiones ligantes, en las que los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón deseados están dispuestos adyacentemente en una distribución estática, sino que también se originen regiones en las que esencialmente solamente se encuentren regiones iguales, o regiones enriquecidas en dichos grupos, en donde dichos grupos están enriquecidos. Sin embargo, tales regiones no molestan en la separación selectiva del sustrato mencionado, ya que una región de este tipo en el sustrato por lo general se liga más débilmente que una región que contiene los por lo menos dos grupos distintos. Por lo general, una región de este tipo, que en lo esencial solamente contiene un tipo de grupos capaces de ligazón, llega a aun a repeler dicho sustrato. En especial, dicha región actúa a modo de repulsión cuando se enfrentan grupos que no son complementarios entre sí.

15 En términos generales, en su conjunto los grupos no complementarios enfrentados debilitarán la ligazón. Este efecto se presenta ya en el caso de ligaciones bivalentes. Cuando para grupos capaces de ligazón se eligen por ejemplo el radical carboxilo por un lado como también el radical amino por otro lado como también un radical fenilo por un lado y un radical fluorenilo por otro lado, entonces cada disposición espacial será relativamente menos favorable desde el punto de vista energético, en el que por lo menos uno de los radicales polares se enfrenta a un radical no polar. Debido a la disposición móvil de las cadenas poliméricas se asienta espontáneamente el sustrato a ser ligado al sorbente, de una manera que se obtiene la máxima energía posible de Gibbs.

20 En términos generales, este estado de cosas puede expresarse diciendo que un par de grupos capaces de ligazón en el sorbente debe estar opuesto a un par de grupos complementarios. Una ligazón entre un sorbente y un ligando alcanza su máxima fuerza cuando todos los grupos participantes pueden ser dispuestos de manera correspondiente de a pares o bien como multiplete.

25 Ya en el apareamiento bivalente de dos sustratos se hace manifiesta la dependencia con respecto a la dirección. Este giro estérico se refuerza considerablemente en la transición a interacciones trivalentes y tetravalentes. Para obtener un elevado rendimiento en sitios de ligazón energéticas óptimas se usan derivatizados poliméricos con una movilidad conformativa especialmente elevada. Al respecto son posibles copolímeros en los que entre los grupos capaces de interacción ligados se han incorporado regiones parciales con elevada movilidad conformativa, por ejemplo, cadenas de alquilo.

30 La relación molar o bien la relación local entre las concentraciones de los por lo menos dos grupos diferentes capaces de ligazón, que se han aplicado sobre el por lo menos un sorbente, es especialmente importante para la ligazón selectiva de un sustrato. Es preferible que cada grupo a ser ligado en el sustrato sea ligado también a un grupo adecuado para la ligazón.

35 Por ello es preferible que sobre el sorbente se apliquen los por lo menos dos grupos diferentes capaces de ligazón en una relación molar que corresponde de manera óptima a los requerimientos estructurales del sustrato que debe ser ligado.

40 Es preferible que sobre el sorbente los por lo menos un dos grupos capaces de ligazón diferentes, que son complementarios con respecto a los grupos del sustrato, sean aplicados en la misma relación que en el sustrato a ser ligado. Los procedimientos preparativos preferentemente usados para ello se explican en lo que sigue.

Los sustratos sintéticos o naturales de la etapa (i) pueden ser de bajo peso molecular, preferiblemente con un peso molecular inferior a los 1.000 Dalton. Al respecto, también puede tratarse de oligómeros o de polímeros, preferiblemente biopolímeros.

45 El por lo menos un sorbente adecuado para la ligazón de sustratos que son preferentemente biológicos, presenta preferiblemente grupos capaces de ligazón, que también sean responsables de la ligazón de las estructuras de presentación natural o para la ligazón de partes determinantes de tales estructuras, y que pueden entrar en una interacción con el sustrato que preferiblemente es biológico. En lo que sigue, los grupos reciben también la denominación de receptores o de grupos receptores.

50 Los por lo menos dos grupos capaces de ligazón son preferentemente partes componentes de bloques constructivos o partes o fragmentos de sustratos con grupos funcionales. Al respecto cabe mencionar en especial grupos de enzima, de aminoácido, péptido, azúcar, amino azúcar, ácido sacárico como también oligosacáridos, o sus derivatizados, como también nucleósidos y nucleótidos. Otras sustancias adecuadas abarcan: bases de pirimidina y purina, tales como citosina, uracilo, timina, purina, adenina, guanina, ácido úrico, hipoxantina, 6-purintiol, 6-tioguanina, xantina. Los fragmentos de molécula abarcan por ejemplo radicales fenilo, fenol o indol de fenilalanina, tirosina o triptófano, como también grupos hidroxilo, carboxilo, amino o amida. Lo esencial para los grupos

55

mencionados es exclusivamente que el principio de ligazón que se presenta en la naturaleza de un receptor con un sustrato se conserva o bien se aproxima, de manera tal que mediante el novedoso procedimiento es posible emplear por ejemplo enzimas sintéticas, dominios ligantes de anticuerpos o cualesquiera epítopes fisiológicos, también regiones moleculares, hospedantes terminados, péptido, glicopéptidos, epítopes de proteínas, glicoproteínas, como también oligonucleótidos.

5

Como aminoácidos cabe mencionar preferentemente:

. aminoácidos con radicales alifáticos tales como por ejemplo glicina, alanina, leucina, isoleucina;

- aminoácidos con una cadena lateral alifático, que comprende uno o varios grupos hidroxilo, tales como por ejemplo serina, treonina;

10 :aminoácidos, que presentan una cadena lateral aromática, tal como por ejemplo fenilalanina, tirosina, triptófano;

- aminoácidos que comprenden cadenas laterales básicas, tales como por ejemplo lisina, arginina, histidina;

- aminoácidos que presentan cadenas laterales ácidas, tales como por ejemplo ácido asparágico, ácido glutámico;

- aminoácidos que presenten cadenas laterales amida, como por ejemplo asparagina, glutamina;

- .aminoácidos que presentan cadenas laterales que contienen azufre, tales como por ejemplo cisteína, metionina;

15- aminoácidos modificados, como por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxilglutamato, O-fosfoserina;

- derivatizados de los aminoácidos mencionados, o de eventualmente otros aminoácidos, por ejemplo en los que o eventualmente los grupos carboxilo puede estar sustituidos con por ejemplo radicales alquilo o arilo, que eventualmente pueden estar sustituidos de manera adecuada, aminoácidos esterificados.

20 En lugar de los aminoácidos es también posible recurrir al uso de uno o varios di- u oligopéptidos, por ejemplo, pueden usarse aminoácidos beta, gamma o de alguna otra, estructura isomérica, y los derivatizados a partir de ellos como por ejemplo los depsipéptidos.

También es posible es posible introducir al mismo tiempo junto con un bloque constructivo por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón.

25 Basándose en ello, el procedimiento inventivo se caracteriza porque un bloque constructivo lleva por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón.

Si deben aplicarse más de cuatro grupos capaces de ligazón en el mismo sorbente, en este caso una forma de realización preferida consiste en introducir de manera correspondiente por lo menos dos de estos grupos capaces de ligazón conjuntamente mediante un bloque constructivo ya preparado en una disposición espacial definida. A tal efecto se usan preferentemente aquellos grupos capaces de ligazón en un bloque constructivo, que ya eran adyacentes de igual manera en el primer sustrato.

30

Por supuesto es posible combinar varios de estos por lo menos bloques constructivos bivalentes consecutivamente o simultáneamente en un sorbente, y además combinarlos con bloques constructivos monovalentes.

Un ejemplo sencillo de un bloque constructivo bivalente es el fluorenilmetoxicarbonil-glutamina, que también lleva la deligazón de Fmoc-glutamina. En este caso se usa el grupo carboxilo para la ligazón al sorbente, siendo el radical amida capaz de ligarse a un ligando para la ligazón polar, y el grupo fluorenilo para la interacción π - π . De manera similar es posible emplear oligopéptidos, pero también derivatizados de oligómeros de forma de peine.

35

Es preferible que la ligazón de los mencionados sustratos en el por lo menos un sorbente tenga lugar por intermedio de radicales o grupos de aminoácidos, azúcares, nucleótidos y nucleósidos como también bases de pirimidina y de purina, que se hallan sobre el sorbente.}

40

En consecuencia la invención también se caracteriza también porque los por lo menos dos grupos capaces de ligazón del por lo menos un sorbente son elegidos entre grupos, que son parte componente de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina o de purina.

En otra forma de realización, los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón, del sustrato, son elegidos entre grupos que son componentes de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina o de purina.

45

Mediante la introducción de otros grupos de procedencia natural o sintética, en especial de procedencia sintética, es posible variar selectivamente, en especial reforzar, la capacidad de ligazón no covalente, del solvente.

A título de ejemplo, los aminoácidos que están provistos de grupos de protección sintéticos, pueden ser usados en el nuevo procedimiento. A título de ejemplo, es posible emplear aminoácidos que estén protegidos con el radical fluorenilo. Además del radical fluorenilo también puede usarse radicales tales como el radical antraceno o el radical naftilo. En este caso, mediante la configuración de otras ligaciones no covalentes entre los anillos aromáticos de los grupos protectores y los grupos ligantes del sustrato es posible lograr un refuerzo de la acción ligante. A título de otros ejemplos pueden mencionarse los radicales nitrofenilo y radicales oligofluorfenilo y otros compuestos aromáticos ricos en electrones o pobres en electrones, que pueden configurar interacciones π - π .

El sorbente de la etapa (ii) abarca un vehículo que puede estar hecho de materiales inorgánicos u orgánicos o de materiales inorgánicos y orgánicos. Como materiales vehículos son adecuados todos los materiales sobre los cuales es posible introducir los por lo menos dos grupos distintos de la etapa (ii) mediante procedimientos adecuados.

El material del vehículo es un sólido, por lo que su superficie puede ser lisa o plana, como por ejemplo placas de vidrio o de metal, pero también ser alabeado o estar incorporado en cuerpos porosos, por ejemplo, de tipo tubular o de tipo esponja, como por ejemplo zeolitas, gel de sílice o perlas de celulosa. Además, los materiales de los vehículos pueden ser de origen natural o de naturaleza sintética. Como ejemplos se mencionan entre otros las gelatinas, colágeno o agarosa. También pueden usarse resinas porosas y no porosas tales superficies de materiales sintéticos o de materiales cerámicos.

De acuerdo con la invención, los correspondientes por lo menos dos grupos distintos de la etapa (ii) sobre el vehículo se hallan presentes en forma covalentemente ligada en un polímero.

Al respecto, bajo el término "polímero" recaen también todos los compuestos de elevado peso molecular, que en la química de los polímeros reciben la denominación de "oligómeros". A tal efecto puede usarse tanto un polímero como también una mezcla de polímeros. Si bien no deseamos limitarnos a determinados polímeros, a título de polímeros posibles se mencionan entre otros:

-polisacáridos, como por ejemplo celulosa, amilosa y dextrano;

-oligosacáridos tales como por ejemplo ciclodextrina;

-alcohol polivinílico, politreonina, poliserina;

-polietilenimina, polialilamina, polivinilamina, polivinilimidazol, polianilina, polipirrol, polilisina;

-(éster de) ácido poli(met) acrílico, ácido poliitaconico, poliasparagina;

-policisteína.

De la misma manera en principio son adecuados no solamente los homopolímeros, sino también los copolímeros y en especial los copolímeros de bloque y los copolímeros estadísticos, para ser usados en el procedimiento de la presente. Al respecto cabe mencionar tanto los copolímeros con proporciones no funcionalizables tales como coestireno o coetileno como también los copolímeros tales como por ejemplo copirrolidona.

Al respecto, los polímeros mencionados presentan por lo menos dos grupos funcionales iguales o diferentes, sobre los cuales pueden ligarse los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón de la etapa (ii) al polímero.

En virtud de ello, la invención se caracteriza porque los correspondientes por lo menos dos grupos distintos en la etapa (ii) se hallan presentes ligados de manera covalente a un polímero.

Como otros grupos funcionales preferidos de los polímeros que presentan por lo menos dos grupos funcionales iguales o distintos pueden mencionarse entre otros los grupos OH, grupos amina eventualmente sustituidos, grupos SH, grupos OSO_3H , grupos SO_3H , grupos OPO_3H_2 , grupos PO_3H_2 , grupos CO-OH y mezclas de dos o más de estos, en donde R representa preferiblemente un radical alquilo. También pueden los polímeros que presentan por lo menos dos grupos funcionales iguales o distintos contener otros grupos polares, como por ejemplo-CN.

De acuerdo con la invención, en la etapa (ii) los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón son introducidos en primera instancia por intermedio de los por lo menos dos grupos funcionales, iguales y distintos, del polímero en éste, originándose un polímero derivatizado con los grupos mencionados.

Al respecto, la derivación de los polímeros funcionalizados con los por lo menos dos grupos puede tener lugar mediante procedimientos conocidos tanto en fase homogénea como también en fase heterogénea.

Si los polímeros que presentan por lo menos dos grupos funcionales iguales o diferentes son derivatizados en fase homogénea líquida con dichos por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón, en tal caso, para lograr una óptima solubilidad se emplean preferiblemente polímeros que son funcionales en estado mezclado. A título de

ejemplo pueden mencionarse entre otros:

-celulosas parcial o totalmente sililados, alquilados o acilados;

-acetato de polivinilo/alcohol polivinílico;

-poliviniléter/alcohol polivinílico;

5 -N-butilpolivinilamina/polivinilamina.

También es posible usar mezclas de polímeros/copolímeros. Al respecto pueden emplearse todas las mezclas de polímeros/copolímeros adecuadas, por ejemplo mezclas de los polímeros y copolímeros anteriormente mencionados, entre los cuales pueden mencionarse entre otros

-ácido poli(acrílico)-co-acetato de vinilo;

10 -alcohol polivinílico-co-etileno:

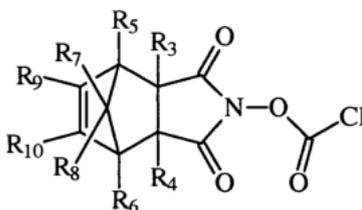
-polioximetileno-co-etileno;

-poliestirenos modificados, como por ejemplo copolímeros de estireno con (ésteres de) ácido (met)acrílico;

-polivinilpirrolidona y su copolímeros con poli(met)acrilatos.

15 Los polímeros que presentan por lo menos dos grupos funcionales iguales o distintos pueden hacerse reaccionar antes de la derivación con los por lo menos dos grupos distintos mediante un reactivo de activación. Tales reactivos, y los procedimientos para su uso, se han descrito por ejemplo en el documento WO 0/32649.

Por ejemplo, como reactivo de activación pueden usarse compuestos que se derivan del elemento estructural de la succinimida, en donde el átomo de hidrógeno situado junto al átomo de nitrógeno ha sido reemplazado por un grupo -OCO-Cl. Un ejemplo de ello es el compuesto que se presenta a continuación:



20 En este contexto, R_3 a R_{10} pueden representar preferiblemente hidrógeno, hidrógeno, radicales alquilo, arilo, cicloalquilo y heterocíclicos. Si los radicales R_3 a R_{10} representan hidrógeno, en tal caso en lo que sigue el compuesto recibe también la denominación de ONB-Cl.

25 Si el polímero que presenta por lo menos dos grupos funcionales iguales o diferentes es convertido mediante un reactivo de activación, en tal caso puede este producto de conversión ser convertido mediante compuestos adecuados, que posean los grupos requeridos para la activación del sustrato mencionado.

30 También es posible hacer reaccionar el polímero que presenta por lo menos dos grupos funcionales iguales o diferentes con una mezcla consistente en dos o más reactivos de activación adecuados. Estos pueden ser convertidos simultáneamente con el polímero. De la misma manera es también convertir los dos o más reactivos de activación consecutivamente con el polímero.

Al respecto, en principio es posible usar todos los compuestos que pueden reaccionar con el polímero activado y que de manera inmediata o indirecta permitan obtener el polímero deseado, el que seguidamente es objeto de derivación. Entre otros, para la derivación pueden usarse compuestos que presenten por lo menos un grupo nucleófilo.

35 Otra posibilidad consiste en hacer reaccionar el polímero activado con un alcohol o bien tiol mono o polivalente que contenga grupos amino. Si el polímero que contiene por lo menos dos grupos funcionales es activado por ejemplo con ONB-Cl, en tal caso el alcohol mono o polivalente que contiene grupos amino o el tiol mono- o polivalente que contiene grupos amino reacciona selectivamente con el grupo amino. Los grupos OH o SH introducidos de esa manera en el polímero pueden seguidamente ser activados nuevamente en una etapa ulterior con por ejemplo uno
40 de los reactivos de activación anteriormente descritos, con lo cual se modifican las longitudes y ramificaciones de las cadenas, en función de la valencia de los alcoholes o tioles originalmente usados.

En otra forma de realización es también posible hacer reaccionar compuestos, cada uno de los que contenga por lo menos un grupo distinto capaz de ligazón, con un reactivo de activación, y seguidamente se hace reaccionar nuevamente con el polímero mencionado.

- 5 Preferiblemente se hacen reaccionar derivatizados activados de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina y de purina, con el polímero que presenta por lo menos dos grupos funcionales, iguales o distintos. Al respecto, y nuevamente en una forma de realización preferida, se activan los compuestos con ONB-Cl o con un compuesto con este tipo de estructura.

Las reacciones mencionadas pueden usarse para la reticulación polimérica, estabilización polimérica o ramificación polimérica.

- 10 Además, las reacciones mencionadas permiten preparar derivatizados poliméricos, que presentan disposiciones espaciales sumamente diversas y que por lo tanto son utilizables en una pluralidad de aplicaciones en las que esta disposición espacial es de una importancia decisiva.

De esa manera es posible realizar disposiciones tal como por ejemplo Hairy Rods, polímeros en peine, redes, canastos, cáscaras, tubos, embudos o nasas.

- 15 Al respecto, las reacciones pueden tener lugar en solventes apróticos-dipolares y/o polares-apróticos o en mezclas de solventes tales como por ejemplo mezclas de solventes acuosos. En función del polímero a ser convertido y del tipo de reactivo de activación usado y/o de los compuestos, que contienen los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón, pueden en estas mezclas de solventes, además del agua, hallarse presentes diversos otros solventes. Al respecto, se usan preferentemente otros solventes tales como solventes apróticos-dipolares tales como
20 por ejemplo DMSO, DMF, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, tetrahidrofurano o éter metil-t-butílico.

En este contexto, el valor del pH que puede elegirse para las reacciones, se halla por lo general en el intervalo de 4 a 14, preferiblemente en el intervalo de 8 a 12, y más preferiblemente en el intervalo de 8 a 10. Para el ajuste de un intervalo determinado del valor del pH puede trabajarse con soluciones tampón adecuadas.

- 25 Por medio del solvente y del valor del pH es posible ajustar de manera selectiva las propiedades de hinchado y de retracción de la red, con lo cual y por intermedio de la red es posible influir sobre el acceso del sustrato al sorbente.

Es posible influir sobre el grado de derivación del polímero, es decir el grado en el que el polímero funcionalizado es derivatizado con los por lo menos dos grupos capaces de ligazón, de manera de lograr la mejor interacción posible con el sustrato.

- 30 Se prefiere un grado de derivación en el intervalo 1 a 70 %, más preferentemente en el intervalo de 3 a 60 %, y de manera especialmente preferida en el intervalo de 5 a 50 %.

- 35 Por lo tanto, es también posible que por lo menos dos de los grupos funcionales, iguales o diferentes, estén derivatizados de manera tal que interactúan como grupos receptores con el sustrato y por lo menos un grupo funcional, sin acción específica para el sustrato, y/o una unidad monomérica sin grupos funcionales, que esté dispuesta entre dos de estos grupos funcionalizados, y en donde los grupos funcionales son iguales o distintos entre sí y son seleccionados entre los grupos anteriormente mencionados.

También es posible que los grupos funcionales todavía presentes en forma no derivada en el polímero, provean una contribución a la interacción con el sustrato

- 40 También es posible el uso de un derivatizado de un polímero que presente por lo menos dos grupos funcionales, iguales o distintos, en el que otro grupo funcional, sin acción específica para con el sustrato, esté derivatizado con un grupo de remate extremo.

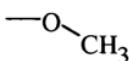
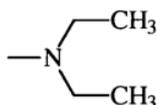
Mediante la elección adecuada del grupo de remate extremo es también posible influir sobre la solubilidad del grupo de remate extremo o del derivatizado polimérico provisto de grupos de remate extremo, y ajustarla a las exigencias en caso de eventuales reacciones posteriores.

- 45 En principio, como grupo de remate extremo puede elegirse cualquier grupo que haga que un grupo funcional sea inerte o ampliamente inerte contra interacciones con el sustrato. En este contexto, el concepto "inerte" significa que las interacciones en las que incurre el sustrato con los grupos receptores del polímero derivatizado, en comparación con las interacciones en las que incurre este sustrato con uno o varios grupos funcionales derivatizados por los grupos de remate extremo, son tan fuertes, que el sustrato es ligado esencialmente solamente por los grupos
50 receptores.

Si se desea, por intermedio de la interacción entre sustrato y grupo receptor, separar dos o más sustratos distintos,

por ejemplo, en un proceso cromatográfico, en tal caso el grupo de remate extremo no ha de inertizar por completo los grupos funcionales contra posibles interacciones, como anteriormente descrito. En este caso es por ejemplo suficiente que el grupo de remate extremo incurra con los dos o más estratos a ser separados, en interacciones suficientemente débiles o no específicas, que para el proceso de separación no desempeñan ningún papel.

- 5 Al respecto, como grupo de remate extremo es posible usar cualquier grupo adecuado de acuerdo con el estado de la técnica. En función del sustrato es posible por ejemplo, que como grupo de remate extremo se elija un grupo que no sea un donante de H. En este aspecto se prefiere usar:



- 10 Como receptor, en un polímero que presente por lo menos dos grupos funcionales, iguales o distintas, pueden introducirse cualquier otro radical anteriormente descrito, que puede obtenerse por reacción del polímero con por lo menos dos reactivos de derivación activados, cada uno de los que comprende por lo menos un grupo nucleófilo, o por reacción del polímero activado con por lo menos dos de tales reactivos de derivación.

- 15 Se prefiere un derivatizado de un polímero que contiene por lo menos dos grupos funcionales, iguales o diferentes, como anteriormente descrito, en el que por lo menos dos receptores comprenden radicales de compuestos o grupos en compuestos son responsables de la ligazón, estando los compuestos elegidos del grupo que comprende aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, base de pirimidina y de purina.

- 20 Al efecto de derivar el polímero que presenta grupos funcionales con los compuestos mencionados, derivatizados de estos compuestos o grupos que contienen dicho compuestos, o sus mezclas, puede implementarse el procedimiento anteriormente descrito. De esta manera es posible empezar por llevar a cabo la reacción de por ejemplo un compuesto de aminoácido con un reactivo de activación adecuado y seguidamente hacer reaccionar el producto de reacción con el polímero. Por supuesto también existe la posibilidad de añadir directamente el polímero, los aminoácidos y el reactivo de activación.

De manera análoga, es posible la introducción de radicales de azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina y de purina o de grupos ligantes, que estén contenidos en los compuestos mencionados, o sus mezclas.

- 25 En función de la elección de los aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina y de purina, o de los correspondientes radicales o derivatizados o de los grupos ligantes, que estén contenidos en estos compuestos, puede ser necesario proteger los grupos funcionales eventualmente presentes en ellos durante la derivación y/o durante la activación, mediante grupos protectores. A tal efecto son posibles todos los grupo protectores adecuados conocidos del estado de la técnica. En función del uso posterior del polímero, después de la derivación estos grupos protectores pueden permanecer en el radical aminoácido, de azúcar, nucleótidos, nucleósidos, de pirimidina y de purina, o ser posteriormente separados nuevamente.

En lugar de los aminoácidos es también posible el uso de uno o varios oligopéptidos.

A efectos de optimizar la interacción con sustrato, es posible conformar el derivatizado de polímero líquido o disuelto en un solvente o bien mezcla de solventes, en la presencia del sustrato, que en este caso actúa como plantilla.

- 35 En este caso, para la conformación se procede a añadir en un solvente adecuado, o en una mezcla adecuada de solventes, un polímero derivatizado, arriba descrito, junto con el sustrato, y de esta manera se confiere al polímero la posibilidad de adoptar una conformación más favorable desde el punto de vista energético.

- 40 En este contexto también es posible añadir un polímero derivatizado a diversos sustratos, y conformarlo. Además es posible, en caso de necesidad, añadir diversos polímeros derivatizados a uno o varios sustratos distintos, y conformarlos.

También es posible que el derivatizado del polímero que presenta por lo menos dos grupos funcionales, iguales o distintos, sea conformado sin plantilla.

A continuación de la conformación es posible fijar la conformación del derivatizado polimérico, que se ha formado por

medio de la conformación en la presencia de la plantilla.

En este contexto es también posible aplicar el polímero conformado antes de la fijación, sobre un vehículo.

En principio, para la fijación puede emplearse cualquier procedimiento posible. En especial, en este contexto cabe mencionar: variación de la temperatura, intercambio de solventes, precipitación y reticulación. Es preferible que la conformación sea fijada por reticulación.

Al respecto, el material del vehículo y la forma del vehículo son pueden elegirse de una manera esencialmente arbitraria; sin embargo el material del vehículo debe estar hecho de manera tal que el polímero puede ser aplicado de manera permanente sobre el vehículo. Es preferible que el material del vehículo, después de haberse aplicado el polímero, ya no lleve a cabo ninguna interacción con los materiales a ser separados, o a lo sumo una o varias interacciones no específicas.

Como material del vehículo pueden usarse los materiales anteriormente mencionados. En este contexto la forma del material del vehículo puede estar adaptada a las exigencias del procedimiento, y no está sometida a ninguna restricción. Por ejemplo, son posibles vehículos en forma de comprimidos, pellets o en forma de tiras.

La aplicación sobre el material del vehículo es predominantemente libremente elegible. Son posibles por ejemplo la aplicación por impregnación, inmersión del vehículo en una solución polimérica correspondiente, rociado del polímero o por rotación.

También es posible aplicar el polímero derivatizado sobre diversos vehículos adecuados. También es posible aplicar dos o más polímeros derivatizados distintos entre sí sobre uno o más vehículos adecuados.

En otra forma de realización del procedimiento de la presente el polímero derivatizado, conformado y fijado, es elaborado de manera de obtener un material poroso. De esta manera forma simultáneamente el vehículo, de manera que no se necesite ningún material para el vehículo. De esta manera pueden obtenerse por ejemplo perlas, partículas irregulares, esponjas, discos, varillas o membranas.

En este contexto, es posible fijar una conformación que ha sido formada a partir de un tipo de polímeros derivatizados. Sin embargo, también es posible que la conformación haya sido formada a partir de dos o más tipos distintos de polímeros derivatizados. La expresión "diversos tipos de polímeros derivatizados" da a entender que los polímeros se diferencian entre sí por ejemplo en cuanto a los polímeros de base o del tipo de reactivo de activación o del tipo de grupos receptores introducidos por derivación o del grado de activación o del grado de derivación, o de una combinación de dos o más de estas características.

Al respecto, la reticulación puede lograrse por ejemplo haciendo reaccionar directamente entre sí dos o más cadenas principales de polímeros derivatizados. Esto puede lograrse por el hecho que los grupos introducidos por derivación están hechos de manera tal que entre estos grupos es posible anudar ligaciones covalente y/o no covalentes. En términos muy generales es posible que estas ligaciones covalente y/o no covalentes se configuren entre grupos que cuelgan de una cadena principal del polímero, y/o estén configurados entre grupos que cuelgan de dos o más cadenas principales de polímero, de manera tal que debido a la reticulación es posible anudar dos o más cadenas principales de polímero por medio de uno o varios lugares.

Para la reticulación también cabe la posibilidad de emplear uno o varios agentes de reticulación adecuados, con lo que, como arriba descrito, es posible reticular de manera covalente y/o no covalente grupos dentro de una cadena principal del polímero y/o grupos que cuelgan de varias cadenas principales de polímeros derivatizados eventualmente distintos.

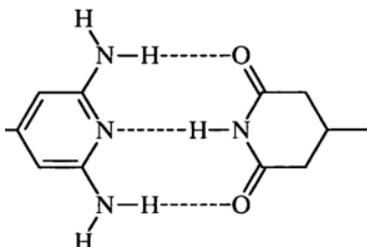
Como reactivos de reticulación en principio pueden tenerse en cuenta todos los compuestos adecuados conocidos en el estado de la técnica. De acuerdo con ello puede la reticulación tener lugar por ejemplo de una manera covalente-reversible, de una manera covalente-no reversible o de una manera no covalente, en donde para la reticulación de manera no covalente cabe mencionar por ejemplo las reticulaciones por medio de interacción iónica o por medio de interacción de transferencia de carga.

Como reactivos de reticulación que pueden conducir a una reticulación covalente-irreversible, cabe mencionar entre otros los compuestos dos o varias veces funcionales tales como por ejemplo los dioles, diaminas o ácidos carboxílicos. En este aspecto, se hacen reaccionar por ejemplo agentes de reticulación bivalentes con el derivatizado de polímero activado o el reactivo de reticulación por lo menos bivalente activado con el derivatizado del polímero no activado.

Una reticulación covalente-irreversible puede realizarse por ejemplo mediante anudamiento de la ligazón azufre-azufre a un puentes disulfuro entre dos grupos que cuelgan de una o dos cadenas principales de polímero.

Una reticulación por medio de interacción iónica puede originarse por ejemplo por medio de dos radicales de los que uno presenta como unidad estructural un ión de amonio cuaternario y el otro presenta como unidad estructural por ejemplo $-\text{COO}^-$ o $-\text{SO}_3^-$.

5 Puede formarse una reticulación por puentes de hidrógeno por ejemplo entre dos pares de bases complementarias, por ejemplo, por medio de la siguiente estructura:



10 En términos muy generales, los derivatizados de polímero a ser ligados de manera no covalente pueden estar configurado de manera complementaria con respecto a los lugares de reticulación, en donde las unidades estructurales complementarias entre sí son por ejemplo ácido/triamina o uracilo/melamina. De la misma manera, en el caso de una reticulación no covalente puede el reactivo de reticulación ser complementario con respecto a los lugares de reticulación en la cadena principal del polímero. Como ejemplo de ello pueden mencionarse por ejemplo un grupo amina en la cadena principal del polímero y un ácido dicarboxílico como reactivo de reticulación.

15 A partir del carboxilato y con ayuda de los reactivos de acoplamiento conocidos de la química de los péptidos, es posible preparar una ligazón de amida a los grupos amino del polímero. De la misma manera, un grupo carboxilo ligado covalentemente a un polímero es reticulado con grupos amino en polivinilamina e inversamente un grupo amino ligado con carboxilo, por ejemplo, de poliacrilato.

El grado de reticulación puede esencialmente elegirse de manera arbitraria, y adaptarse por ejemplo en función de los campos de aplicación que se describen a continuación.

20 En la etapa (ii) puede la reacción de los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón con el polímero que contiene por lo menos grupos dos grupos, también tener lugar en fase heterogénea, es decir sobre la superficie sólida del polímero. En este caso es conveniente que el polímero mencionado esté suspendido en un solvente, que para el polímero aplicado tenga solamente un reducido poder de disolución.

25 Para la derivación del polímero como también para la aplicación del polímero obtenido sobre el vehículo, pueden usarse las etapas de activación y de derivación, como también los procedimientos de reticulación y de recubrimiento, anteriormente descritos.

Por otra parte también es posible usar el polímero preferentemente derivatizado en fase heterogénea como vehículo, sin material vehículo adicional.

30 Los polímeros derivatizados anteriormente descritos preparados en fase homogénea o heterogénea pueden ser aplicados de a etapas sobre el vehículo. En este caso en por lo menos una etapa se liga una capa del por lo menos un polímero al material del vehículo y en por lo menos otra etapa se aplica por lo menos otra capa del por lo menos un polímero sobre la por lo menos una capa de polímero ligada al material del vehículo. Los correspondientes procedimientos adecuados han sido descritos en el documento WO 01/388009.

35 Al respecto, la aplicación de a etapas del por lo menos un polímero puede tener lugar de acuerdo con la totalidad de los procedimientos adecuados que aseguren que por cada etapa se aplique por lo menos una capa de polímero, de manera tal que sobre la estructura polimérica se aplique una estructura polimérica en forma de capas.

40 En el contexto de estos procedimientos, en la por lo menos una etapa en la que se liga por lo menos una capa del por lo menos un polímero sobre el material del vehículo, en una primera forma de realización se pone en contacto una solución del por lo menos un polímero con el material del vehículo bajo condiciones reactivas en las que el por lo menos un polímero no se liga sobre el material del vehículo, y seguidamente se varían las condiciones de reacción de manera tal que el por lo menos un polímero se liga sobre el material del vehículo, o, en una segunda forma de realización se pone en contacto la solución del por lo menos un polímero con el material del vehículo bajo condiciones reactivas, en donde la solución del por lo menos un polímero se encuentra presente bajo condiciones Theta.

En este caso, la solución que de acuerdo con la primera forma de realización es puesta en contacto con el material

del vehículo, puede presentar uno o también varios solventes adecuados, en donde el por lo menos un polímero puede estar disuelto en el solvente o en la mezcla de solventes o también puede estar disuelto coloidalmente o también en suspensión, por ejemplo en forma de una nanosuspensión.

5 En tal caso se eligen las condiciones reactivas de manera tal que al ser puesta en contacto la solución con el material del vehículo por de pronto no tienen lugar ninguna ligazón del por lo menos un polímero con el material del vehículo. Estas condiciones reactivas se ajustan por ejemplo mediante uno o varios solventes adecuados. En este aspecto, es posible usar solventes en los que el por lo menos un polímero es tan bien soluble, que no se presente la ligazón al material del vehículo.

10 Dentro de los alcances de la presente invención, la expresión "el polímero no se liga al material del vehículo" da a entender que mediante la medición de los coeficientes de distribución no es esencialmente posible comprobar ninguna ligazón.

Además, esas condiciones de reacción puede lograrse mediante el ajuste adecuado del valor del pH de la solución de polímero, en el caso en que la ligazón del por lo menos un polímero al material del vehículo sea función del valor del pH.

15 También puede considerarse que mediante una combinación adecuada de dos o más de estos procedimientos es posible en una primera instancia inhibir la ligazón del por lo menos un polímero al material del vehículo

Mediante este tipo específica de control de la marcha de la reacción se logra entre otras cosas que se evitan condiciones reactivas en las que el por lo menos un polímero contenido en la solución se precipite.

20 En lo que se refiere a la puesta en contacto de la solución del por lo menos un polímero con el por lo menos un material del vehículo, es en principio recurrir a la totalidad de ejecuciones de procedimiento adecuadas.

25 Así, es por ejemplo posible poner en contacto una solución que contiene el por lo menos un polímero, con el material del vehículo. También puede darse por posible poner en contacto el material del vehículo en primera instancia con el por lo menos un solvente y seguidamente en el por lo menos un solvente introducir el por lo menos un polímero. También es posible poner en primera instancia el material del vehículo en contacto con por lo menos un solvente y seguidamente añadir una solución que contiene el por lo menos un polímero. Si se emplean dos o más polímeros, puede darse por posible disolver cada uno de ellos por separado o conjuntamente con uno u otros polímeros adicionales en correspondientes solventes o mezclas de solventes y, poner en contacto las soluciones individuales, de las cuales cada una contiene por lo menos un polímero, conjuntamente o por separado, con el material del vehículo, que eventualmente ya se halla presente disuelto o disuelto coloidalmente o en suspensión en por lo menos un solvente.

30

En principio son adecuados los materiales vehículos ya anteriormente descritos sobre los que es aplicar el por lo menos un polímero por ligazón. Si se emplean dos o más polímeros distintos entre sí, en tal caso es suficiente que uno de los polímeros pueda ser aplicado por ligazón sobre material del vehículo. También es posible aplicar dos o más polímeros distintos obligazón sobre el material del vehículo.

35 Además, si se usan dos o más polímeros distintos entre sí y dos o más materiales vehículos distintos entre sí, puede darse por posible entre otros la aplicación de todos los polímeros sobre la totalidad de los materiales vehículos. También puede considerarse que uno o más polímeros puedan ser aplicados sobre uno o más materiales vehículos y uno o varios polímeros distintos de ellos sobre uno o más materiales vehículos distintos de estos.

40 Por otra parte, es posible aplicar otros polímeros y compuestos, como por ejemplo los adyuvantes generalmente usuales, en donde la ligazón del polímero al material del vehículo también puede lograrse mediante otras interacciones y/o procedimientos. Además, es posible que los polímeros o compuestos disponibles en la solución no se han aplicado sobre el vehículo y por ejemplo permanezcan en la solución. Entre otras consideraciones, es posible que en otra etapa por lo menos uno de estos polímeros sea aplicado por ejemplo sobre un material del vehículo que antes de esta etapa ha sido puesto en contacto con la solución que abarca este polímero.

45 De acuerdo con la primera forma de realización, después de la puesta en contacto se modifican las condiciones reactivas de manera tal que ahora tiene lugar la ligazón del por lo menos un polímero al material del vehículo. Como se describió en lo que precede, se da por posible, que en el caso en que se empleen dos o más polímeros diversos y/o dos o más materiales vehículos, que se ligue un polímero a un material del vehículo.

50 En lo que atañe a la variación de las condiciones reactivas, pueden imaginarse la totalidad de las modificaciones que sean adecuadas para posibilitar la ligazón de por lo menos uno de los polímeros al material del vehículo.

En el caso en que la ligazón depende de la temperatura, es posible por ejemplo sea elevar la temperatura sea reducirla, en función de cuál modificación favorezca la ligazón. En otras formas de realización también preferidas se modifica la composición de la solución, que contiene el por lo menos un polímero, o se concentra dicha solución

lentamente.

- 5 En otra forma de realización se modifica la composición de la solución añadiéndole por lo menos un compuesto ácido o por lo menos un compuesto básico o una mezcla de dos de éstos, por los que el valor del pH se modifica de manera tal que se hace posible la ligazón de por lo menos uno de los polímeros. Por supuesto también es posible añadir una o más soluciones tampón con las que el valor del pH de la solución se modifica de manera tal que se hace posible la ligazón de por lo menos uno de los polímeros.

Además, es posible añadir compuestos adecuados tales como por ejemplo sales, que por ejemplo comprenden cationes de metal, o compuestos orgánicos adecuados, mediante cuya adición tiene lugar la libre ligazón de por lo menos uno de los polímeros.

- 10 La solución que contiene el por lo menos un polímero, también puede ser reconcentrada de manera tal que la concentración del por lo menos un polímero, que ha de ser ligado al material del vehículo, se mantiene predominantemente constante en la solución. Esta reconcentración de la solución tiene entonces lugar mediante una marcha correspondientemente lenta del procedimiento, mediante la que la concentración de polímero se mantiene ampliamente constante.

- 15 Además, es posible combinar de manera adecuada dos o más de los procedimientos anteriormente mencionados bajo inclusión de la variación de la temperatura. Así por ejemplo es posible tanto variar la composición de la solución como anteriormente descrito, y como respaldo reconcentrar la solución lentamente y/o variar la temperatura de manera adecuada

- 20 En función de las condiciones reactivas elegidas es posible aplicar un polímero o varios polímeros distintos entre sí, sobre el material del vehículo. Entre otras consideraciones, es posible variar las condiciones reactivas de manera tal que dos o más polímeros distintos entre sí sean aplicados simultáneamente sobre el material del vehículo, con lo cual se origina una capa sobre el material del vehículo, que comprende los dos o más polímeros diferentes entre sí. Si se usan dos o más materiales vehículos diferentes entre sí, es factible que sobre cada material del vehículo se aplique una capa de un polímero, que puede comprender un polímero o dos o más polímeros distintos entre sí.

- 25 Además, también es posible aplicar en una etapa dos o más capas de por lo menos un polímero sobre el material del vehículo, en donde la primera capa del polímero está ligada al material del vehículo, la segunda capa del polímero está ligada a la primera capa y eventualmente cada capa adicional del polímero está ligada a la capa correspondientemente precedente. En este caso, en principio puede cada capa comprende un único tipo de polímero o dos o más polímeros distintos entre sí.

- 30 Además, de acuerdo con la segunda forma de realización es posible poner en contacto una solución del por lo menos un polímero con el material del vehículo bajo condiciones reactivas, en donde la solución del por lo menos un polímero se halla presente bajo condiciones theta. En cuanto a esta forma de realización, la aplicación del por lo menos un polímero sobre el material del vehículo tiene lugar de manera especialmente preferida durante la puesta en contacto de la solución con el material del vehículo

- 35 Es preferible que de acuerdo con el procedimiento descrito en lo que precede, en una primera etapa se aplica una capa de por lo menos un polímero sobre el material del vehículo y sobre esta primera capa en una segunda etapa se aplica una segunda capa y sobre la segunda capa eventualmente en una tercera etapa una tercera capa, y así seguido. En cuanto a los procedimientos adecuados para la aplicación se remite a la exposición detallada precedente.

- 40 Bajó la expresión ligazón del polímero al vehículo se entiende la totalidad de las interacciones no covalentes es por medio de las cuales el por lo menos un polímero puede interactuar con el material del vehículo y/o con una capa de polímero eventualmente ya aplicada sobre el material vehículo o eventualmente con una capa de polímero aplicada sobre una capa de polímero.

- 45 De acuerdo con ello, puede usarse esencialmente la totalidad de los polímeros que están en condiciones de configurar tales interacciones no covalentes. Al respecto, es factible entre otros que por lo menos un grupo funcional, por medio del cual el polímero configura por lo menos una de estas interacciones, se encuentra presente en la cadena principal del polímero propiamente dicha y/o en por lo menos una cadena lateral de la cadena principal del polímero.

- 50 Sin embargo, las interacciones también pueden tener lugar por ejemplo por intermedio de cadenas de hidrocarburos y de otras unidades estructurales sobre las que pueden construirse las interacciones de van der Waals.

De acuerdo con la invención, la totalidad de los polímeros y/o copolímeros anteriormente descritos o sus mezclas en forma no derivada son aplicados sobre el vehículo, debiéndose asegurar que, como se describió en lo que precede, puedan formar interacciones no covalentes con respecto a por lo menos un material vehículo.

Para la derivación del polímero, que está aplicado sobre el vehículo, pueden seguidamente usarse las etapas de activación y derivación anteriormente descritas, a las que todavía pueden acoplarse etapas de reticulación, como se describe en los documentos WO 090/32649 y WO 00/78825.

5 El procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque antes de la ligazón covalente de los por lo menos dos grupos distintos en el polímero que presenta por lo menos dos grupos funcionales iguales o diversos, el polímero mencionado es aplicado sobre un vehículo.

En otra forma de realización especial del procedimiento, puede el polímero que presenta por lo menos dos grupos funcionales iguales o diferentes también ser generado directamente sobre el vehículo por polimerización o policondensación de por lo menos dos monómeros funcionalizados iguales o diferentes.

10 Al respecto, los monómeros preferentemente no saturados olefinicamente, que preferentemente contienen grupos OH, grupos amina eventualmente sustituidos, grupos SH, grupos OSO₃H, grupos SO₃H, grupos OPO₃H₂, grupos PO₃H₂, grupos COOH y mezclas de dos o más de estos, en donde R representa preferiblemente un radical alquilo, polimerizados entre sí de acuerdo con los procedimientos conocidos, en la presencia del material del vehículo. Los monómeros también pueden contener grupos polares, como por ejemplo -CN. Otros monómeros adecuados son por
15 ejemplo etilenimina, alilamina o vinilpirrolidona.

Como técnicas de polimerización se menciona preferiblemente la polimerización en emulsión, en suspensión, en dispersión y en precipitación, llevándose a cabo la polimerización en la presencia del vehículo o bien del material del vehículo. La polimerización puede ser iniciada mediante los procedimientos usuales, por ejemplo mediante radicales
20 iniciadores, tales como los compuestos azo, mediante iniciadores catiónicos o aniónicos o mediante radiación de elevada energía.

En este caso, la polimerización se lleva a cabo de manera tal que de acuerdo con la invención no tiene lugar ninguna reacción entre las cadenas poliméricas originantes y la superficie del vehículo. Es preferible que uno de los por lo menos dos monómeros sea un monómero hidrófilo, como por ejemplo etilenimina, alilamina o vinilpirrolidona. En la presencia de un vehículo hidrófilo, como por ejemplo gel de sílice, el polímero originante es habitualmente absorbido
25 fuertemente sobre la superficie del vehículo.

Para elevar la estabilidad de la fase estacionaria formada es posible llevar a cabo la polimerización de los dos comonómeros funcionalizados, iguales o diferentes, también en la presencia de uno o varios agentes de reticulación. Las sustancias de acción reticulante comprenden por ejemplo los compuestos difuncionales, como por ejemplo divinilbenceno o etilenglicodiacrilato.

30 También es posible la policondensación de dos bloques constructivos monoméricos funcionalizados, iguales o diferentes, que preferiblemente llevan los grupos anteriormente mencionados, de acuerdo con los procedimientos conocidos, en la presencia del material del vehículo.

En este contexto es también posible usar procedimientos y reactivos basados en ONB-Cl, tal como se describen en los documentos WO 99/32649 y WO 00/78825. Los policondensados funcionalizados así obtenidos pueden ser
35 preferiblemente del tipo polifenileno, poliéster, poliamida, poliéter, poliétercetona, poliétersulfona, poliuretano o polisiloxilano. Mediante este tipo de reacción también pueden originarse policondensados mixtos. En este contexto, la policondensación puede llevarse a cabo en solución como también en estado fundido.

Es preferible usar policondensados de tipo poliéster. Estos pueden ser objeto de reticulación adicional para elevar la estabilidad también mediante la adición de otros compuestos polifuncionales, como por ejemplo alcoholes
40 multivalentes, por ejemplo trimetilolpropano, pentaeritrito o azúcar. También es posible la reticulación por medio de disocianatos polifuncionales, suponiendo que presenten grupos poliéster son reactivos con los grupos isocianato. A título de ejemplo, es posible hacer reaccionar poliésteres que contienen grupos hidroxilo con poliisocianatos, en donde en el poliéster se incorporan unidades uretano.

El material vehículo recubierto obtenido puede por ejemplo ser seguidamente aislado por filtración de la mezcla reactiva obtenida por polimerización o bien policondensación, y por medio de un lavado con solventes adecuados se lo libera de las partículas de polímeros o bien de poli condensación no ligadas sobre la superficie del material del
45 vehículo.

En virtud de ello, en otra forma de realización de la invención es posible que el polímero que contiene por lo menos dos grupos funcionales, iguales o diferentes, sea generado directamente sobre el vehículo por polimerización o
50 policondensación de por lo menos dos monómeros funcionalizados, iguales o diferentes.

También es posible llevar a cabo la polimerización anteriormente descrita, que conduce al recubrimiento del vehículo, de manera análoga a la denominada "técnica de impresión" en la presencia del sustrato a ser reconocido posteriormente. En la especialidad, para el concepto sustrato se usa también frecuentemente el término plantilla.

La premisa para esta polimerización es que los por lo menos dos monómeros funcionalizados, iguales o diferentes, ya ven los grupos capaces de ligazón. En este caso es preferible que cada monómero lleve uno de esos grupos, en donde los grupos son distintos entre sí.

Es preferible que la polimerización sea llevada a cabo en la presencia de sustancias que forman poros.

- 5 Para la realización de la polimerización pueden usarse la técnicas de polimerización anteriormente descritas en la presente.

Después de la liberación del sustrato de la solución o mediante su enjuague con solventes adecuados, en la etapa (ii) se obtiene por lo menos un sorbente con un espacio de interacción preconfigurado con el sustrato.

- 10 Es preferible que los monómeros usados en esta forma de realización para la polimerización sean elegidos de manera tal que el polímero formado sobre el vehículo posea una estructura lo más rígida posible y altamente reticulada, para que el espacio de interacción sea lo más estable posible. Por ello es preferible que como por lo menos por lo menos uno de los monómeros funcionalizados se utilice ácido acrílico o ácido metacrílico o sus derivatizados o mezclas que de manera conocida permiten la preparación de polimerizados o copolimerizados de elevada temperatura de transición vítrea. Como monómeros especialmente adecuados para esta finalidad cabe
15 mencionar por ejemplo ácido metacrílico y dimetacrilato de etilenglicol.

A título de otro ejemplo cabe mencionar la polimerización de ácido metacrílico con hidroxietilacrilato, obteniéndose un polímero, que como grupos capaces de ligazón contiene grupos carboxilo e hidroxilo.

- 20 Sin embargo también es posible llevar a cabo la policondensación anteriormente descrita que conduce al recubrimiento del vehículo, en la presencia del sustrato a ser reconocido posteriormente, empleándose como monómeros compuestos del tipo que ya presenten diferentes grupos capaces de ligazón. Al respecto es preferible que cada monómero presente uno de estos grupos, siendo los grupos distintos entre sí.

También es posible usar monómeros que ya presenten por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón

- 25 En virtud de ello, esta forma de realización se caracteriza porque el polímero se prepara directamente sobre el vehículo por polimerización o policondensación de por lo menos un monómero, que presente por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón, o de por lo menos 2 monómeros, cada uno cuales presenta por lo menos un grupo capaz de ligazón, en donde dichos grupos son distintos, y porque la polimerización o policondensación tiene lugar en la presencia del sustrato a ser formado posteriormente. Es preferible que en las formas de realización, en las que la polimerización o policondensación de los monómeros mencionados se lleva directamente la presencia del
30 vehículo, esto se lleve a cabo en la presencia de por lo menos un segundo o tercer monómero, que no posee ningún grupo capaz de ligazón. En este contexto, el por lo menos un segundo o tercer monómero tiene la función de un distanciador.

No es absolutamente indispensable que los por lo menos dos grupos distintos necesarios para las ligazón del sustrato por lo menos bivalente a por lo menos un sorbente se hallen presentes ligados a un polímero. También es posible inmovilizar los grupos sin usar un polímero en la etapa (ii), directamente sobre la superficie del vehículo.

- 35 Es preferible llevar a cabo la inmovilización directamente sobre el vehículo cuando el mismo está construido a partir de un material inorgánico. Como material inorgánico cabe mencionar preferentemente ácido silícico u óxido de aluminio.

Es preferible que la inmovilización tenga lugar por medio de reactivos de activación y/o de silanización. El anudamiento con la superficie del vehículo también puede ser llevado a cabo usando un distanciador.

- 40 Como reactivos de activación es preferible usar los descritos en el documento WO 00/32648.

Los reactivos de silanización comprenden también preferiblemente aquellos compuestos de silicio que pueden llevar a cabo una reacción de hidrosililación.

Como reactivos de silanización se usan preferentemente halógenosilanos, preferiblemente clorosilanos, alcoxisilanos y silazanos.

- 45 Al respecto, en una forma de realización puede hacerse reaccionar un compuesto, que posee los grupos necesarios a ser aplicados para la ligazón del sustrato, en primera instancia con un compuesto de sílice adecuado. Seguidamente el producto puede ser inmovilizado mediante grupos hidroxilo, que se encuentran sobre la superficie del vehículo, bajo formación de una ligazón covalente de oxígeno-silicio. Como ejemplo, de esta manera es posible inmovilizar sobre la superficie y usando silanos alquilados, radicales alquilo, que eventualmente también pueden
50 estar sustituidos, por ejemplo con grupos amino, urea, éter, amida y carbamato, usando silanos alquilados.

Como ejemplo, de esta manera es posible inmovilizar el radical 3-aminopropilo por medio de un átomo de silicio sobre la superficie del vehículo. El grupo amino puede ser objeto de una reacción subsiguiente, por ejemplo con cloruros ácidos de manera de obtener amidas. Pueden usarse cloruros ácidos alifáticos, pero preferiblemente aromáticos, como también bloques constructivos activados, en especial bloques constructivos activados por ONB, tal como se describen en los documentos WO 00/32649 y WO 00/78825.

Los ejemplos de compuestos de silicio, con los cuales es posible aplicar radicales alquilo sobre el vehículo, incluyen metil-y octiltriclorosilano, con los cuales es posible introducir radicales alquilo relativamente cortos o bien medianos, como también octadecil, docosil y tricontiltriclorosilano, mediante los que es posible introducir cadenas relativamente largas. Con el 3-aminopropil trietioxisilano es por ejemplo posible la introducción de un radical alquilo de cadena corta que contiene un grupo amino.

También es posible el uso de éteres de sililglicidilo que después de hidrólisis forman dioles, que también se van la denominación de fases de tiol.

Por otra parte es también posible convertir inicialmente la superficie del vehículo con un compuesto de silicio, que todavía contenga uno o varios grupos funcionales. Seguidamente es posible introducir los grupos elegidos o determinados por la ligazón, que han de ser inmovilizados sobre el vehículo, por intermedio de compuestos adecuados a través de uno o más grupos funcionales.

Por ejemplo, para la aplicación sobre la superficie del vehículo pueden usarse compuestos de silicio que todavía posean una ligazón doble. Por intermedio de la ligazón doble mencionada pueden entonces introducirse los grupos previstos para la ligazón. Los ejemplos de tales compuesto de sílice adecuados comprenden vinilsilano o (met)acriloxipropilmetoxisilano.

Eventualmente puede la unión de los grupos previstos para la ligazón también tener lugar por intermedio de un distanciador, en donde se incorpora preferiblemente una cadena de carbono de cadena corta entre el grupo a ser inmovilizado y el vehículo. El anudamiento de vehículo y grupo a ser inmovilizado puede tener lugar preferiblemente mediante carbodimidias adecuadas, tales como por ejemplo dicitlocarbodimida, diisopropilcarbodimida, N-ciclohexil-N'-2(N-metilmorfolino)-etilcarbodimid-p-toluensulfonato, N-etil-N'-3(dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato, cloroformatos, carbonildiimidazoles o diisocianatos tales como hexametilendiisocianato. También pueden usarse polietilenglicoles homo o heterotelechólicos.

En caso de usarse un distanciador se origina preferiblemente una fase de forma de cepillo, en donde los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón están ligados preferiblemente en el extremo del distanciador y/o lateralmente en el distanciador.

En otra forma de realización, en la etapa (ii) tiene lugar la aplicación de los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón con un segundo sustrato por intermedio de un reactivo sobre un vehículo recubierto de polímero, que es seleccionado del grupo que abarca reactivos de activación, reactivos de silanización y distanciadores, o mezclas de dos o más de estos reactivos.

Para la ligazón específica a sustrato ha demostrado ser desfavorable usar sorbentes que en calidad de los por lo menos dos grupos distintos capaces de ligazón presentan los grupos descritos en el estado de la técnica, a saber grupos hidroxilo de la estructura de gel de sílice o bien grupos silanol o alquilo, que son introducidos por medio del reactivo de silanización. De esta manera una combinación de los grupos hidroxilo, silanol y alquilo o hidroxilo y alquilo o silanol y alquilo, estando en cada caso los grupos inmovilizados a gel de sílice, está excluida de la invención.

En cambio, dentro de los alcances de la invención, son grupos muy adecuados los grupos tales como los radicales fenilo, hidroxifenilo, carboxilo, amina y amida, como también los radicales hidroxilo, indol, imidazol y guanidina. Es preferible que estos radicales sean ligados por intermedio de un distanciador en la superficie del vehículo bajo formación de una fase en forma de cepillo.

Por lo tanto, una forma de realización especialmente preferida se caracteriza porque en la etapa (ii) los por lo menos dos grupos distintos de ligazón con un segundo sustrato se eligen de entre un grupo consistente en los radicales fenilo, hidroxifenilo, carboxilo, amina, amida, indol, imidazol y guanidina.

El por lo menos un sorbente preparado de acuerdo con los procedimientos anteriormente descritos puede elaborarse basándose en los procedimientos conocidos de manera obtener preferentemente foils, películas, placas de microtitulación o nanopérlas. Es preferible que el por lo menos un sorbente de la etapa (ii) sea preparado y usado en nanoformato.

En la etapa (iii) el sustrato a ser ligado o bien el sustrato a ser ligado selectivamente a partir de una mezcla de sustratos es ahora puesto en contacto con el sorbente de la etapa (ii). Al respecto, el sustrato o una mezcla de

sustratos pueden hallarse presente en fase sólida, líquida o de gas, pero también en mezclas de dos o más de estas fases.

5 Es preferible que el sustrato o bien mezcla de sustratos se encuentre presente en fase líquida. En este caso pueden aplicarse soluciones como también suspensiones o dispersiones del sustrato o mezcla de sustratos. Como líquidos pueden usarse tanto agua como también solventes orgánicos, mezcla de solventes orgánicos y mezclas que comprenden agua y solvente orgánico. En todos los casos en el líquido pueden estar presentes tampones, sales, ácidos, bases o modificadores, como por ejemplo reactivos de pares de iones, en cualquier concentración. Es preferible que la concentración sea de 10 mmolar a 2 molar referido a un litro de líquido. Es preferible que el sustrato a ser ligado se halle presente en forma acuosa, por ejemplo, como fluido corporal.

10 Para los ensayos de ligazón o bien del comportamiento de ligazón del sustrato en el sorbente pueden recurrirse a los procedimientos y procedimientos conocidos. En este contexto, la expresión "ligazón entre sorbente y sustrato" se refiere preferiblemente la ligazón no covalente.

La expresión "ligazón no covalente" se refiere preferiblemente a las interacciones inicialmente descritas.

15 Sin embargo, también es posible que por lo menos un sustrato se ligue al por lo menos un sorbente de manera covalente-reversible o covalente-irreversible.

20 De manera ventajosa, en la etapa (iv) son adecuados los procedimientos y procedimientos de evaluación para el ensayo de la fuerza de ligazón el sustrato al sorbente de la etapa (iii). Cabe mencionar en especial los procedimientos de cromatografía de columna, por ejemplo, el conocido procedimiento HPLC. En este caso, el por lo menos un sorbente es usado como fase estacionaria de la columna. De la secuencia de los sustratos eluidos pueden sacarse de manera directa conclusiones acerca de la fuerza de ligazón al sorbente usado en cada caso. El sustrato más fuertemente ligado es el último en ser eluido.

25 Es posible llevar a cabo análisis frontales, en los que las soluciones diluidas de la mezcla de sustratos a ser separados es entregada de manera continua a la fase estacionaria. De esta manera el sustrato más fuertemente ligado puede diferenciarse del sustrato menos fuertemente ligado, ya que este último aparece en primer lugar en el eluato.

30 También es posible recurrir a las técnicas de elución conocidas, en donde soluciones relativamente concentradas de la mezcla de sustratos son entregadas en la cabecera de la columna y con ello y seguidamente son eluidas con un eluyente. Los sustratos menos fuertemente ligados aparecen primero en el eluato. El sustrato más fuertemente ligado puede entonces eventualmente también ser desorbido a partir del sorbente mediante el uso de un eluyente de mayor efecto eluyente.

De manera ventajosa es también posible recurrir a la microcalorimetría. En ésta se mide el calor de adsorción que se libera durante la ligazón del sustrato al sorbente.

35 Otro procedimiento que puede aplicarse de manera ventajosa es el procedimiento de resonancia de plasmón de superficie, en el que se determina la frecuencia de resonancia de electrones excitables, que es función de las propiedades físicas de la capa límite entre el sustrato y el sorbente, es decir también de la fuerza de ligazón.

También pueden usarse como procedimiento de ensayo el etiquetado de fluorescencia, en donde los sustratos marcados con un colorante fluorescente tendrán un efecto fluorescente solamente cuando interactúan con el receptor complementario.

40 Otro procedimiento es el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays, ensayos inmunosorbentes ligados a enzima), en el que por ejemplo es posible detectar antígenos que están ligados al sorbente, mediante tratamiento con inmunoreactivos. También pueden aplicarse ensayos competitivos y no competitivos, entre los cuales los radioensayos.

45 En virtud de ello, esta forma de realización de la invención se caracteriza que porque para el ensayo de la fuerza de la ligazón del sustrato al sorbente en la etapa (iv) se elige un procedimiento seleccionado entre el grupo que comprende la cromatografía, la microcalorimetría, la resonancia de plasmón de superficie, etiquetado de fluorescencia, ensayos competitivos y no competitivos, entre los cuales Radioensayo y ELISA.

50 A partir de la fuerza de la ligazón puede efectuarse una predicción de cuáles sorbentes o bien cuáles grupos aplicados sobre éstos son responsables de la ligazón del sustrato. De esta manera este procedimiento permite aislar el sustrato del caso, identificarlo y caracterizarlo. De esa manera es posible validar la función y las propiedades del sustrato.

Por lo tanto, el procedimiento para la ligazón bivalente selectiva del sustrato mencionado también se caracteriza porque abarca adicionalmente la etapa (v):

(iv) (v) aislamiento del sustrato.

Además, el procedimiento para la ligazón bivalente selectiva del sustrato mencionado también se caracteriza porque adicionalmente abarca la etapa (vi):

(v) (vi) caracterización e identificación del sustrato.

5 El nuevo procedimiento es especialmente adecuado para la ligazón selectiva de sustratos naturales o de sustancias activos naturales como también de sustancias activas sintéticas. Estos sustratos y sustancias activas tienen como que poseen un farmacóforo, es decir una disposición espacial de grupos, que configuran el fundamento de la acción biológica en los organismos vivientes. El farmacóforo ancla la sustancia activa en el bolsillo de ligazón del receptor natural. En farmacóforo está anclado a un andamio que en la bibliografía anglosajona también lleva la denominación scaffold (andamio).

10 Los sustratos naturales y las sustancias activas comprende preferentemente aminoácidos, oligopéptidos, nucleótidos, nucleósidos, proteínas, glucoproteínas, antígenos, antígenos-determinantes, anticuerpos, carbohidratos, enzimas, coenzimas, fermentos, hormonas, alcaloides, glicósidos, esteroides, vitaminas, metabolitos, virus, microorganismos, materiales contenidos en tejidos vegetales y animales, células, fragmentos de células, compartimentos de células, residuos celulares, lecitinas, compuestos de flavilio, flavonas e isoflavonas.

15 Dentro de los alcances de la invención es especialmente interesante desmontar receptores naturales y enzimas u otras proteínas con una efectividad farmacológica, construir de acuerdo con la invención y con su ayuda una colección de sorbentes y usarlos de acuerdo con la invención. Tales receptores son preferentemente proteínas intracelulares o situadas en las membranas, que tienen la capacidad de ligar sustancias activas sintéticas o naturales.

20 Los receptores intracelulares pueden obtenerse a partir del citoplasma y de los núcleos de las células. Tales receptores o bien sorbentes, que contienen por lo menos dos grupos ligantes de estos receptores, pueden usarse para la ligazón selectiva de hormonas esteroides, tales como glucocorticoides, corticoides minerales, andrógenos, estrógenos, gestágenos, hormonas de vitamina D., como también de retinoides o de hormonas tiroideas..

25 Los receptores situados en las membranas, cuyos grupos ligantes pueden ser aplicados de acuerdo con la invención sobre sorbentes, son receptores acoplados a guanidina-nucleótido-proteínas, receptores de los canales de iones como también receptores asociados con enzimas.

30 Del grupo de los receptores acoplados al guanina-nucleótido-proteína forman parte los receptores de neurotransmisores especialmente importantes para la terapia medicamentosa, tales como los receptores de adenosina y adrenérgicos, ATP-(P2Y)-, receptor de dopamina, GABA_B-,receptores (metabótrofo) de glutamato, histamina, muscarina, opioides y serotonina. También los receptores de hormonas y mediadores, por ejemplo de aduretina, glucagon, somastatina y prostaglandina forman parte de este grupo.

Entre los receptores asociados con enzima se hallan los receptores con una actividad de tirosina quinasa, con tirosina quinasas asociadas, con actividad de guanilatociclasa como también las receptor-serina-/treonina quinasas.

35 Las sustancias activas sintéticas comprenden preferiblemente productos farmacéuticos y agentes fitoprotectores.

40 Los productos farmacéuticos son por ejemplo sustancias con una acción sobre el sistema nervioso (sicofármacos, somníferos, analépticos, anestésicos de acción local y general, relajantes musculares, anticonvulsivos, agentes antiparkinson, antieméticos, sustancias de acción ganglionar, sustancias que inciden en el simpático, sustancias que inciden en el parasimpático); con una acción sobre el sistema hormonal (sustancias que actúan sobre el hipotálamo, hipófisis, tiroides, paratiroides, y sobre las hormonas renales, hormonas de timo, órgano insular de páncreas, capsulas suprarrenales, gónadas); con una acción sobre los mediadores (histamina, serotonina, eicosanoides, factores activadores de las plaquetas, quinina); con una acción sobre el sistema cardiocirculatorio; con una acción sobre el tracto respiratorio (antiasmáticos, antitusivos, expectorantes, agente tensioactivo); con una acción sobre el canal de estómago-intestino (enzimas de digestión, hepáticos); con una acción sobre los riñones y sobre las vías urinarias de evacuación (diuréticos); con una acción sobre los ojos (agentes oftálmicos); con una acción sobre la piel (agentes del dermatoterapéuticos); sustancias para profilaxis y terapia de enfermedades infecciosas (agentes farmacéuticos de acción antibacteriana, antimitótica, agentes quimioterapéuticos para enfermedades virales y de protozoarios, antihelmínticos); con una acción sobre los tumores malignos (antimetabolitos, citostáticos, sustancias inhibidores de la topoisomerasa, sustancias inhibidores de la mitosis, antibióticos eficaces como citostáticos, hormonas y antagonista de hormonas); con una acción sobre el sistema inmunológico y sustancias inmunológicamente activas (sueros, inmunomoduladores, inmunosupresores).

Los agentes fitoprotectores comprenden por ejemplo los insecticidas, herbicidas, plaguicidas y fungicidas.

Como compuestos y clases de compuestos de ejemplo de principios activos sintéticos se han de mencionar

fenotiazinas y análogos de fenotiazina, butirofenonas y difenilbutilpiperidinas, benzamidas, benzodiazepinas, hidroxitriptófanos, cafeína, anfetaminas, opioides y morfina, fetidinas y metadonas, derivatizados de ácido salicílico y ácido acetilsalicílico, derivatizados de ácido arilpropiónico, derivatizados de ácido antranílico, derivatizados de anilina, derivatizados de pirazol, sulfapiridinas, hidroxiclороquina y cloroquina, penicilamina, 5 barbituratos N-metilados y tiobarbituratos, ácidos dipropilacéticos, hidantoína, dopamina, noradrenolina y adrenolina, alcaloides madre en granos, derivatizados de ácido carbámico, ésteres de ácido fosfórico, alcaloides belladonna, hormona del hipotálamo, hormonas HVL, hormonas de lóbulo posterior de la hipófisis, tiouracilos y mercaptoimidazoles, sulfonilreos, histaminas, triptanos, prostaglandinas, dipiradimoles, hirudina y derivatizados de hirudina, tiazidas, psoralenos, peróxido de benzoílo y ácido azeleico, vitamina A, vitamina K, vitamina B₁, B₂, B₆, 10 amida de ácido nicotínico, biotina, vitamina B₁₂, vitamina C, compuestos halogenados, aldehídos, alcoholes, fenoles, heterociclos con contenido de N, piretrinas y piretroides, ésteres de ácido fosfórico, ésteres de ácido tiofosfórico, ésteres de ácido carbámico, β-lactamas, aminoglicósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, oxazolidinonas, diaminobencilpirimidinas, pirazinamidas, griseofulvinas, aziridinas, actinomicina, antracilinas, zitoquinas, anticuerpos monoclonales y policlonales. Además, se pueden mencionar determinantes de antígeno, 15 lectinas, compuestos de flavilio, flavonas e isoflavonas, así como mono- y oligosacáridos.

Los principios activos sintéticos se pueden preparar también usando principios activos naturales. Además, el término también comprende principios activos potenciales, así como sustancias que llevan farmacóforos, así como la estructura (scaffold), a la que está anclado dicho farmacóforo.

Como ya se mencionó al comienzo, el nuevo procedimiento es apropiado para la separación bivalente selectiva de dicho sustrato en especial para obtener informaciones acerca de si cualquier sustrato puede aparecer en interacción con un receptor natural. Inversamente, también es posible, usando por ejemplo todos los grupos 20 relevantes para el reconocimiento de sustratos, preparar bibliotecas de rangos moleculares sintéticos, es decir, epítopes, cuyos componentes contienen en cada caso dos, tres o incluso más sitios de interacción diferentes. Si, por ejemplo, se pone en contacto un principio activo conocido con estas bibliotecas de receptores sintéticos, se 25 obtiene una declaración de probabilidad acerca del tipo de sitio de unión en el receptor natural.

En la invención, se usa así un nuevo principio de complementariedad que comprende del lado del receptor o del sorbente y del lado del sustrato en cada caso al menos dos radicales diferentes de compuestos o grupos, que son responsables en compuestos por la ligazón. Con preferencia, se seleccionan en este caso los compuestos del grupo que comprende aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina y purina.

30 De todas las posibles combinaciones de estos rangos moleculares bivalentes entre sí, sólo una pequeña selección es, sin embargo, completaría compatible, es decir, es energéticamente favorable en su interacción. La mayoría de las combinaciones es energéticamente desfavorable, por ejemplo, todos los pares de radicales hidrofóbicos, por un lado, y radicales hidrofílicos, por otro lado, o todos los radicales que se repelen entre sí.

35 Compatibles son, por ejemplo, las combinaciones de los grupos de a pares capaces de ligazón OH-/fenilo con radical amino/alquilo, pero no OH-/fenilo con radical alquilo/amino, ya que sólo los radicales OH hidrofílicos y amino, así como los radicales hidrofóbicos fenilo y alquilo se ligan entre sí. Otras combinaciones compatibles son, por ejemplo, un radical carboxilo/amino con radical amino/carboxilo, así como radical imidazol/hidroxilo con radical amida/amida. No compatible en el sentido de esta consideración es la combinación de radical hidroxilo/fenilo con radical alquilo/amino, ya que un radical hidrofílico no puede ligarse con un radical hidrofóbico.

40 En el caso de 20 aminoácidos naturales, resultan para doblete de componentes con al menos un grupo capaz de ligazón un total de 380 variantes. Para una biblioteca que únicamente contiene las variantes estructurales convenientes, se necesitan sin embargo esencialmente menor cantidad de este doblete sintético de componentes que también puede designarse como receptores de doblete, porque en una serie de aminoácidos, la funcionalidad es igual como, por ejemplo, en el caso de treonina y serina, en caso de glutamina y asparagina, en caso de valina, 45 isoleucina y leucina, etc. Por ello, en general es suficiente usar de estos 20 aminoácidos con preferencia únicamente hasta 7.

Como los grupos de receptores aplicados de forma móvil en el receptor sintético se pueden modificar sus coordenadas espaciales según los requerimientos del sustrato, con frecuencia no se requieren para la finalidad deseada de unión los aminoácidos en sí con sus cadenas de distinta longitud, sino sólo el principio necesario para 50 la interacción. En este sentido, a menudo se pueden obtener las funciones de, por ejemplo, arginina, lisina, triptófano e histidina simplemente por medio de grupos amino siempre que sólo se requiera la función básica.

Si, por ejemplo, de siete aminoácidos sólo se usen cuatro aminoácidos o el principio de estos aminoácidos en el sentido de la invención, entonces resultan después de la permutación un total de únicamente 35 distintas combinaciones de doble-receptores.

55 Así es concebible una biblioteca combinatoria que comprende una colección de sorbentes con al menos dos grupos

5 diferentes que son apropiados para la unión de al menos un sustrato con al menos dos grupos distintos, en donde los al menos dos grupos diferentes de sorbentes y los de al menos un sustrato son complementarios entre sí, en donde los al menos dos grupos diferentes de sorbentes y los al menos dos grupos diferentes del al menos un sustrato pueden estar seleccionados de grupos que son componentes de distintos aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina o de purina.

La biblioteca combinatoria se caracteriza porque la preparación de los sorbentes comprende las etapas (i) y (ii):

(i) cálculo de al menos dos grupos distintos que tienen capacidad de unión de un primer sustrato sintético o natural con un sorbente,

10 (ii) aplicación de al menos dos diferentes grupos con capacidad de unión con un segundo sustrato sintético o natural cada uno en un soporte con formación de al menos un sorbente, en donde en el caso de los grupos, se trata de grupos que son iguales o complementarios a los de la etapa (i) y el segundo sustrato de la etapa (ii) son iguales o diferentes del primer sustrato según la etapa (i).

15 En el caso de la separación selectiva del sustrato, se obtiene un complejo de sorbente-sustrato que comprende al menos un sorbente con al menos dos diferentes grupos con capacidad de unión y al menos un sustrato con al menos dos diferentes grupos con capacidad de unión, en donde los grupos con capacidad de unión del al menos un sorbente y los de al menos un sustrato son complementarios entre sí y en donde los al menos dos grupos diferentes del al menos un sorbente y los al menos dos grupos diferentes del al menos un sustrato comprende grupos diferentes que son componente de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina o de purina.

20 En el complejo de sorbente-sustrato, la unión está entre el al menos un sorbente y el sustrato en una unión no covalente, covalente reversible o covalente irreversible. Con preferencia, la unión es no covalente reversible.

También es concebible el uso del nuevo procedimiento para la unión selectiva de un sustrato con sorbentes por al menos una unión bivalente y el uso de la biblioteca combinatoria.

25 Una posibilidad de uso consiste en la detección de interacciones de receptor-principio activo, así como control de principios activos.

Para la detección de interacciones de receptor-principio activo, así como para el control de principios activos, se pueden usar los principios activos o clases de principios activos antes enumerados.

30 También para el desarrollo de nuevos candidatos de principios activos (sustancias líder), la invención se puede usar de forma ventajosa. Estas sustancias líder se pueden optimizar respecto de su acción, selectividad, biodisponibilidad, farmacocinética y toxicidad usando el nuevo procedimiento o la biblioteca combinatoria.

35 En este caso, también es concebible que los candidatos de principios activos sólo interactúen con una sección del sitio de unión biológico. Por combinación y unión de al menos dos de tales candidatos de principios activos que unen al menos dos secciones del sitio de unión biológico, se pueden hallar nuevos principios activos de forma simple. Esta búsqueda de principios activos también funciona usando una realización del procedimiento altamente paralela.

Otra posibilidad de aplicación radica en la separación de compuestos estereoisómeros y de estructura isomérica.

Además, es posible la purificación y/o la separación de sustratos y mezclas de sustratos.

40 La purificación y/o la separación se pueden realizar por medio de procedimientos cromatográficos. Como otros procedimientos apropiados, se pueden mencionar electroforesis, electroenfoque, electroforesis en gel plano, cromatografía paralela, cromatografía flash paralela y técnicas capilares. En caso de una selectividad suficientemente alta, se puede adsorber un sustrato también directamente de la mezcla disuelta por adición del sorbente, se puede agitar y filtrar en forma de un complejo de sorbente-sustrato.

Otras posibilidades de aplicación consisten en la separación de sustancias nocivas y productos de degradación de mezclas de sustancias en las que las sustancias también pueden estar presentes en muy baja concentración.

45 Además, se pueden separar sustancias nocivas y productos de degradación provenientes de líquidos corporales tales como la sangre. Estas sustancias nocivas y productos de degradación están presentes, por ejemplo, en envenenamientos, como productos metabólicos o metabolitos. Pueden ser de naturaleza biogénica y autoformarse en el organismo, pero también pueden haber sido administradas al organismo desde afuera, por ejemplo, a través de la piel, a través de las mucosas bucales o por inyección, por ejemplo, en el torrente sanguíneo. Entre las
50 sustancias nocivas y productos de degradación, se han de contar también venenos de serpientes y narcóticos.

Además se pueden usar los sorbentes en instalaciones de diálisis.

También es posible la separación de sustancias nocivas de disolventes, de aguas de proceso y de procesos para la preparación de comestibles.

5 Con ayuda de la invención, se pueden llevar a cabo también ensayos farmacocinéticos, en especial para la metabolización y la biodisponibilidad.

10 El nuevo procedimiento para la unión bivalente selectiva también se puede usar ventajosamente para el agotamiento de bibliotecas dinámicamente combinatorias. En este caso, se procede convenientemente de modo tal que se separe de una mezcla que contiene, además de un sinnúmero de eductos, también el sustrato deseado, con preferencia, un principio activo, lo último en el sentido de la invención. Luego se regula de nuevo en la mezcla el equilibrio con formación de otros sustratos. El proceso de la separación se repite hasta que ya no se forme un sustrato.

Como se explicó con anterioridad, se usa el nuevo procedimiento para la separación dirigida y selectiva de un sustrato de una mezcla con al menos otro sustrato.

15 Por ligazón selectiva se entiende según la invención que un sustrato se separa de una mezcla con al menos otro sustrato acompañante por el hecho de que el al menos sustrato que presenta dos grupos diferentes produce con los al menos dos diferentes grupos que se hallan sobre el sorbente una ligazón más fuerte que el sustrato acompañante.

Con la presente invención se puede definir por primera vez exactamente el sitio de interacción y el tipo de interacción, entre otros, por medio de los siguientes procedimientos, tal como puede verse con los ejemplos:

- 20 - por incorporación dirigida de sitios de unión en el receptor en la concentración y combinación deseadas,
 - por omisión, adición, variación o bloqueo de sitios de ligazón individuales tanto en el receptor como también en las sustancias de ensayo, en donde la acción se determina de forma precisa (= energéticamente) sobre la potencia de ligazón,
 - por ensayos espectroscópicos y por determinación de las isotermas de absorción.

25 A modo de ejemplo, por comparación con las contribuciones individuales conocidas de la literatura de cada uno de los tipos de ligazón no covalentes, se puede prever sorprendentemente bien la interacción general de una ligazón multivalente. Cuando la correspondiente energía de ligazón se determina a la altura esperada, es posible, por el contrario, la conclusión de los grupos participantes de la ligazón.

30 Con ello, primeramente se puede generar una selectividad dirigida respecto de un problema de separación de una selección cualquiera.

La nueva enseñanza contiene, respecto del compuesto diana por aislar (sustratos), la construcción de una interacción multivalente no covalente dirigida al fin, que se distingue suficientemente de las interacciones no covalentes con los sustratos concurrentes (sustancias concomitantes).

35 Los procedimientos de la presente invención muestran altos valores para la selectividad de separación que también simplemente se denomina selectividad. La selectividad de separación α se define en este caso como cociente de cada una de las constantes de ligazón o bien factores de capacidad de la ligazón del sustrato por separar selectivamente en el sorbente y la constante de ligazón de la ligazón del sustrato acompañante con el sorbente.

40 La selectividad de separación alcanza al omitir por ejemplo un único grupo carboxilo en un sustrato un valor de más de 35. Al intercambiar un sistema de un anillo aromático a un sistema de tres anillos, se obtiene un valor de 10.

Con el nuevo procedimiento, se pueden lograr selectividades de separación en escala técnica que son sorprendentemente altas en comparación con el estado de la técnica y no raras veces permiten separaciones que hasta ahora no eran posibles por cromatografía.

45 Según la invención, la selectividad de separación α , con la que se separa el sustrato para ligar selectivamente con los al menos dos grupos diferentes capaces de unirse con al menos un sorbente usando el al menos un sorbente de una mezcla de sustrato, es mayor que 1,4.

Se prefiere una selectividad de separación α de más de 2, con mayor preferencia, de más de 4, con mayor preferencia aún, de más de 8.

Otras selectividades de separación preferidas son mayores que 10, con mayor preferencia, mayores que 35.

5 Como además las constantes de ligazón producen directamente la determinación de la energía de Gibbs conocida por el experto en la técnica, también se da una relación entre la energía de Gibbs y la selectividad de separación. Cuanto más negativa sea la modificación de la energía de Gibbs ΔG para el enlace no covalente, es decir, cuanto más fuerte sea el carácter complementario de los grupos que se ligan entre sí, tanto mayor será también la selectividad de separación respecto de las sustancias acompañantes que se modifican no

10 Más allá de ello, para generar la selectividad respecto de cualquier par de sustratos alcanza con aplicar un único grupo capaz de ligazón adicionalmente en el sorbente, siempre que este grupo no tenga un par complementario en uno de los dos sustratos por separar.

15 De la manera descrita, también se puede comprobar si y qué tipos de ligaciones tienen lugar al mismo tiempo (es decir, polivalencia). Esta polivalencia, en especial los valores teóricos dirigidos para las constantes de ligazón y las energías de Gibbs sólo son posibles, sin embargo, cuando el sustrato puede ser incluido espacialmente al menos en parte pro ajuste inducido o se adapta conformativamente al receptor.

20 Esta adaptación se prefiere con la red polimérica, en donde el grado de reticulación de la nanopelícula polimérica se elige de forma tal que se da una movilidad conformativa aún suficiente y, así, una capacidad de adaptación a la estructura del sustrato. Pequeños sustratos con masas moleculares por debajo de 1000 Dalton se incorporan preferentemente de forma completa en la red polimérica. Mayores sustratos como, por ejemplo, péptidos o proteínas, se ligan preferentemente con una superficie de contacto limitada en una cavidad en la red polimérica que permite una interacción polivalente, pero que evita una ligazón demasiado fuerte por incorporación.

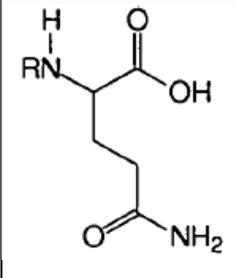
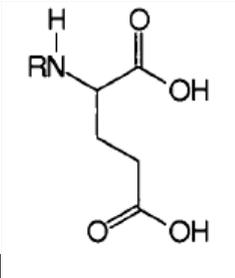
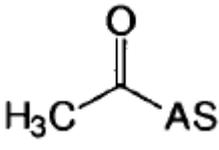
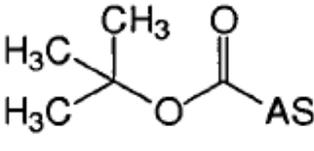
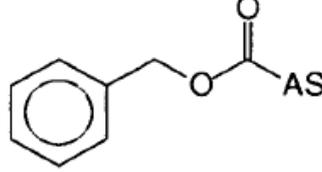
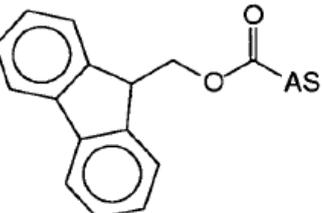
25 A fin de realizar el concepto para la construcción de sitios de ligazón multivalentes selectivos, a menudo es necesario ofrecer en el espacio los puntos de ligazón necesarios conformativamente móviles. Más allá de ello, es necesario ofrecer mediante el sustrato una tendencia a ligazón suficientemente fuerte como para lograr la adaptación conformativa (ajuste inducido). No por último, los al menos dos sitios de interacción necesarios deben estar preorganizados en mayor concentración en el espacio, para que el evento de ligazón deseado se realice en mayor número debido a la modificación de la conformación.

La invención se ha de explicar por medio de los siguientes ejemplos.

30 **Ejemplo 1: Ligazón selección de aminoácidos N-bloqueados como sustratos a sorbentes a base de polivinilamina/gel de sílice mediante una ligazón al menos bivalente**

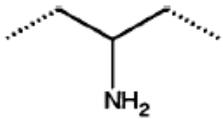
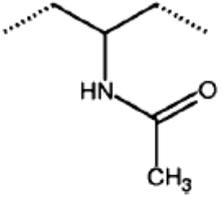
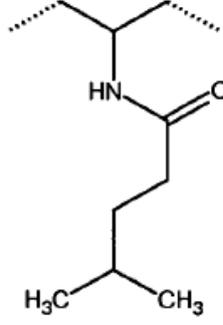
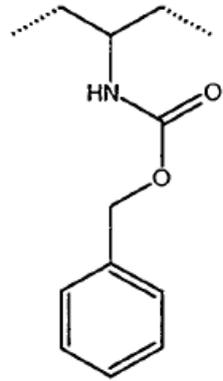
Se ensayaron las propiedades de retención de ocho diferentes derivatizados de aminoácidos (sustratos en la Tabla 1) en cuatro distintos sorbentes a base de polivinilamina/gel de sílice (sorbentes en la Tabla 2), en donde como procedimiento de análisis se eligió la cromatografía. Los sorbentes también son designados a continuación como fases estacionarias, receptores sintéticos o también como receptores, incluso en los otros ejemplos.

35 En el caso de los derivatizados de aminoácidos, se trataba de derivatizados de glutamina (1-4) y glutamato (**5-8**), cuyos grupos amino estaban bloqueados en cada caso con los cuatro grupos protectores acetilo (Ac), ter.-butiloxycarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Z), así como fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc).

Tabla 1: sustratos usados			
Derivatizados glutamina	deDerivatizados glutamata	de	Grupo protector N
			
Ac-Gln 1	Ac-Glu 5	Ac	
Boc-Gln 2	Boc-Glu 6	Boc	
Z-Gln 3	Z-Glu 7	Z	
Fmoc-Gln 4	Fmoc-Glu 8	Fmoc	

En el caso de las fases de receptores usadas, se trataba de gel de sílice esférico recubierto con polivinilamina con un tamaño de partícula de 20 mm y 1000 Å de diámetro de poro. Beim Beschichtungsvorgang entstand zunächst die Amino- 40 fase **A**. Las fases de receptor derivadas **B a D** se prepararon por síntesis de fase sólida según procedimientos conocidos de la fase amino **A**.

5

Tabla 2: estructuras de las fases de receptor usadas		
Denominación de fase	Construcción de fase	Estructura de fase
A BV 02043	K1000-PVA-FA-2-5-Dod fase de amino	
B ND 03001#2	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-Ac-100 fase de acetilo	
C ND 02031	K1000-PVA-FA-2-10-Dod-MVS-100 fase de 4-metilvalerilo	
D ND 03017	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-BzlO-100 fase de benciloxicarbonilo	

Todas las fases de receptor poseían aún un contenido mensurable de grupos amino libres que podían producir en estado protonado interacciones iónicas con grupos aniónicos apropiados, por ejemplo, grupos carboxilato, de los sustratos. Los receptores **C y D** contenían adicionalmente un radical apropiado para interacciones lipofílicas.

- 5 El contenido de grupos amino de los receptores se determinó a partir de curvas de saturación cromatográfica con 10 mM de ácido 4-toluensulfónico en DMF. Las cantidades calculadas de grupos amino por gramo de fase de receptor se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Contenido de grupos amino de las fases de receptor	
Receptor sintético	Grupos amino en mmol/g

A BV 02043	0,60
B ND 03001#2	0,03
C ND 02031	0,13
D ND 03017	0,16

Como fase móvil para los ensayos cromatográficos en los sustratos **1 a 8** se usó tampón acuoso de Tris-HCl de pH 7,5. La elución se produjo en condiciones isocráticas a concentraciones de tampón de 10 a 500 mM.

- 5 Como medida para la potencia de la interacción entre sustrato y receptor en cada una de las soluciones de tampón se usó la magnitud de elución relativa independiente de la instalación k' (factor de capacidad). Se calcula de la diferencia de volumen de elución en el pico máximo y el volumen muerto de columna, dividido por el volumen muerto de la columna, tal como se representa en la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{\text{volumen de elución} - \text{volumen muerto de la columna}}{\text{volumen muerto de la columna}}$$

- 10 Los valores k' de los sustratos en 10 ó 50 mM de tampón de Tris-HCl se resumen en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Valores k' de los sustratos en 10 mM de tampón de Tris-HCl pH 7,5

Receptor	Valor de elución relativo k' de los sustratos							
	Ac		Boc		Z		Fmoc	
	1	5	2	6	3	7	4	8
A	9,5	433	8,8	411	15	>715	85	>715
B	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	1,6
C	1,3	25,7	3,6	127	12,5	575	419	>715
D	1,4	26,1	2,1	41,9	9,7	263	297	>715

Tabla 5: Valores k' de los sustratos en 50 mM de tampón de Tris-HCl pH 7,5

Receptor	Valor de elución relativo k' de los sustratos							
	Ac		Boc		Z		Fmoc	
	1	5	2	6	3	7	4	8
A	2,3	33,2	2,2	34,4	3,6	62,9	20,3	478
B	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,2
C	0,2	2,3	0,9	9,9	3,4	37,6	111	562
D	0,3	2,6	0,5	5,0	2,5	20	78,4	>715

La comparación de los valores k' dentro y entre las Tablas 4 y 5 proporcionaba las siguientes observaciones e interpretaciones de las observaciones:

- 15 1. Observación: la fase del receptor acetilado **B** (ND 03001#2) se ligó por sí misma con la mínima concentración de tampón de ninguno de los sustratos en una medida digna de mencionar ($k' \leq 1,6$).

Interpretación de la observación: este receptor contiene sólo pocos grupos amino para posibles interacciones iónicas con los grupos carboxilato de los sustratos. Ni los grupos acetilo ni las cadenas de polivinilamina de la fase de receptor están en condiciones de producir interacciones lipofílicas dignas de mencionar.

- 5 2. Observación: Los sustratos con dos grupos carboxilato (**5-8**) se ligaron en 10 mM de tampón aproximadamente 20 a 40 veces más fuerte que los correspondientes sustratos con sólo un grupo carboxilato (**1-4**). En 50 mM, la ligazón de los dicarboxilatos era 10 a 25 veces más fuerte que la de los monocarboxilatos.

10 Interpretación de la observación: aparentemente hay interacciones iónicas entre grupos carboxilato de los sustratos y los grupos amino de los receptores. Estas interacciones llevan en el caso de los dicarboxilatos en virtud de la bivalencia de la interacción a una ligazón mucho más fuerte que en el caso de los sustratos con sólo un grupo carboxilo. El grupo amida no realiza en el medio acuoso un aporte de ligazón digno de mencionar.

3. **Observación:** con aumento de la concentración del tampón de 10 a 50 mM, se reducían las potencias de ligazón, en el caso de monocarboxilatos, en un factor de aproximadamente cuatro, en los dicarboxilatos, en un factor de aproximadamente diez.

15 **Interpretación de la observación:** también este resultado se explica a partir de interacciones iónicas que se debilitan con mayor concentración de tampón. El debilitamiento resulta aparentemente de la competencia de las sales tamponantes con los grupos carboxilato de los sustratos por los grupos amonio del receptor. Con la fuerte ligazón de los sustratos **5-8** repercute más fuerte la competencia de las sales tamponantes, ya que están afectados dos grupos carboxilato por ello.

20 4. **Observación:** en sustratos de otro modo idénticos, los valores k' aumentaron drásticamente con el tamaño del resto orgánico del grupo protector N. El tamaño de este crecimiento de la ligazón era independiente de la concentración del tampón.

25 **Interpretación de la observación:** con ello, se muestra que, además de las interacciones iónicas entre los grupos carboxilato de los sustratos y los grupos amonio de los receptores, están presentes además interacciones lipofílicas entre sustrato y receptor. Por esa razón, el refuerzo de la ligazón repercute en el paso de radicales orgánicos pequeños a grandes en el grupo protector N en particular en las fases de receptor **C y D**, cuyos grupos de receptores para interacciones lipofílicas son particularmente apropiados.

30 **Conclusión:** Con los experimentos antes descritos, se puede comprobar claramente que los receptores sintéticos pueden producir al mismo tiempo dos tres interacciones de ligazón con los correspondientes sustratos, siempre que el receptor y el sustrato estén equipados correspondientemente de modo complementario respecto de sus grupos funcionales.

De ello, se puede concluir que por diseño de un receptor complementario correspondiente a una sustancia diana se pueden separar fácilmente sustancias acompañantes o subproductos. La medida para la factibilidad de realización de la separación es el cociente de los valores k' , la selectividad *alfa*, que se brinda en la siguiente fórmula.

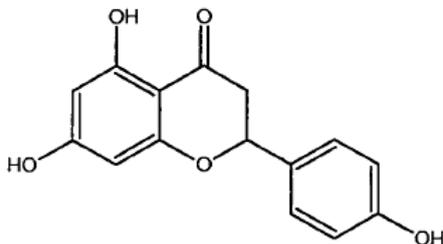
Selectividad: $\alpha = k_2'/k_1'$

35 Con la fase de receptor de bencilo-amino **D** *alfa* era, por ejemplo, de aproximadamente 25 (263/9,7) para la separación cromatográfica de Z-Gln (**3**) y Z-Glu (**7**) con 10 mM de tampón de Tris-HCl (pH 7,5) como fase móvil.

Incluso se pudo mostrar así que había una relación cuantificable entre cada uno de los radicales de moléculas incorporadas dirigidamente y las potencias de ligazón.

40 **Ejemplo 2: Ligazón de la flavanona naringenina como sustrato en fases de receptores de la empresa instAction mediante al menos una ligazón bivalente**

La interacción entre naringenina y siete distintas fases de receptores de la empresa Firma instrAction (Tabla 6 y 7) se midió en acetonitrilo como disolvente. Para estas mediciones, se usó el procedimiento directo de la determinación de equilibrio en el llamado "ensayo en recipiente de agitación".

Naringenina**Tabla 6: Fases estacionarias usadas**

Fase de receptor	Constitución de fase	Grupos amino en mmol/g
A BV 02051	K1000-PVA-FA-2-5-Dod	0,54
C ND 02048#2	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-MVS-100	0,16
D ND 03017#3	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-BzlO-100	0,10
E ND 03033#2	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-ImAc-100	0,53
F ND 03049	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-AcrId9Car-100	0,29
G ND 03050	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-NaphCar-100	0,23
H ND 03062	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-iNic-100	0,35

5 Para los ensayos en recipiente de agitación, se suspendieron cantidades pesadas de forma exacta de la fase de receptor (de aproximadamente 100 - 300 mg cada una) en volúmenes medidos de forma exacta de disolvente (15 mL). A estas suspensiones se añadieron en porciones cantidades de naringenina pesadas exactamente (por ejemplo, 1,0 mL de una solución 10 mM en acetonitrilo). La naringenina se dividió entre la fase del receptor y el disolvente con regulación de un equilibrio dinámico.

10 El estado de equilibrio se podría calcular luego exactamente determinando la concentración de naringenina en el disolvente por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En este caso, se obtuvo directamente la cantidad de sustancia de naringenina en la fase líquida (acetonitrilo). La cantidad de sustancia de naringenina en la fase del receptor se calculó como diferencia entre la naringenina añadida y naringenina que se halla en solución. En cada ensayo en recipiente de agitación, se calculó varias veces el equilibrio con creciente concentración de naringenina en el sistema (6 - 12 veces). Las adiciones de naringenina y disolvente en este caso así como sus extracciones se equilibraron cuidadosamente y se tuvieron en cuenta en el cálculo de las cantidades de sustancia.

15

Tabla 7: Derivatizados de la fase estacionaria

Denominación	Forma abreviada	Estructura
grupo de ácido 4-metilvaleriánico	MVS	

grupo benciloxycarbonilo	BzIO	<p>polímero</p>
grupo ácido 4-imidazolilacético	ImAc	<p>polímero-N</p>
grupo ácido acridin-9-carboxílico	Acrid9Car	<p>polímero-N</p>
grupo ácido 2-naftilcarboxílico	Naphcar	<p>polímero-N</p>
grupo ácido isonicotínico	iNic	<p>polímero-N</p>

Con cada regulación del equilibrio, se obtenía un punto en la isoterma de adsorción (carga de naringenina ligada a receptor [RS] respecto de naringenina en solución [S]). Usando el modelo de Langmuir para isotermas de adsorción, se calcularon las constantes de equilibrio para la asociación (K_A) y la cargabilidad máxima (R_0) mediante regresión no lineal.

5

Isoterma de Langmuir: $[RS] = [R_0] \times [S] / (1/K_A + [S])$

En el caso de interacciones particularmente débiles, falló el procedimiento de la regresión no lineal. En estos casos, se calcularon K_A y R_0 por regresión lineal del diagrama según Scatchard ($[RS]/[S]$ aplicado respecto de [RS]). En la aplicación según Scatchard, se representan simples isotermas de Langmuir como rectas.

10 Linearización de Scatchard: $[RS]/[S] = -K_A \times [RS] + K_A \times [R_0]$

Una ventaja importante de esta aplicación según Scatchard es que se pueden descubrir muy fácilmente

discrepancias de la linealidad. Estas discrepancias pueden indicar fases de receptores que presentan al mismo tiempo sitios de unión de distinta potencia y cantidad de ligazón.

Los valores para la constante de asociación K_A y la cargabilidad máxima R_0 están representados en la Tabla 8.

Tabla 8: Constante de asociación K_A y cargabilidad máxima R_0					
		Interacción			
		Fuerte		Débil	
Fase de receptor	Derivatizado	K_{A2}	R_{02}	K_{A1}	R_{01}
A BV 02051	100 % de grupos amino	2121	14,7	931	22,1
C ND 02048#2	MVS-100	1302	48,4	760	66,3
D ND 03017#3	BzIO-100	-	-	329	29,2
E ND 03033#2	ImAc-100	6194	4,9	-	-
F ND 03049	Acrid9Car-100	2961	19,5	65	243
G ND 03050	NaphCar-100	1943	38,5	379	91
H ND 03062	iNic-100	-	-	778	21,7

- 5 **Observaciones e interpretación de las observaciones:** la naringenina podía formar debido a sus grupos hidroxilo fenólicos interacciones polares con los grupos amino primarios de la fase amino **A**. En el disolvente aprótico acetonitrilo, estas interacciones se podían medir bien. La presencia de sitios de ligazón fuertes (K_{A2}) y débiles (K_{A1}) puede mostrar así que la naringenina aparentemente tiene la posibilidad de producir mono-, bi- y trivalente enlaces polares, correspondientes a los tres grupos fenol existentes.
- 10 En las fases de receptor **C, D y G**, se derivan la mayoría de los grupos amino primarios de la fase **A** con radicales lipofílicos. Si estos radicales no tuvieran una parte en la ligazón de la naringenina, deberían bajar las cargabilidades R_0 de estas fases, correspondientes al menor contenido de grupos amino. Las constantes de equilibrio deberían permanecer aproximadamente iguales, ya que el tipo de interacción no se modificaría. Efectivamente, las cargabilidades subieron en parte claramente, por ejemplo, de 14,7 a 38,5 mmol/g de fase para el receptor derivatizado de naftóilo (fases de receptores **A y G**). Este resultado sólo se puede aclarar con interacciones adicionales entre naringenina y los grupos de derivación. Estos tres grupos de receptores tienen en común la capacidad de producir interacciones lipofílicas. La naringenina, por su parte, posee también partes de moléculas lipofílicas para participar en estas interacciones.
- 15 De ello surge que la naringenina podía realizar con las fases de receptores **C, D y G** al mismo tiempo ligaciones polares, a saber, con los grupos amino aún restantes y enlaces lipofílicos, con los grupos de receptores MVS, BzIO o bien NaphCar. Es notable la situación de que estos enlaces lipofílicos se podían observar en un disolvente orgánico (acetonitrilo). Esto significa que entre la naringenina y los grupos de receptores lipofílicos podrían tener lugar contactos que se justifican energéticamente respecto de una solvatación de los grupos lipofílicos con un disolvente orgánico.
- 20 Las constantes de asociación K_A con las fases de receptor **C, D y G** se componen, según ello, de las proporciones de enlaces polares y lipofílicos. Las constantes de asociación son aquí absolutamente menores que en la fase de amino **A**. Aparentemente, los enlaces lipofílicos son más débiles que los polares, lo que permite inferir que el disolvente orgánico usado (acetonitrilo) es relativamente polar.
- 25 Las fases de receptor **E, F y H** contienen grupos receptores que pueden participar tanto en enlaces lipofílicos como también polares – los tres contienen grupos amino incorporados en estructuras aromáticas en parte expandidas. De hecho, los dos valores K_A más altos se hallan en las fases de receptor **E y F**. Se puede suponer que aquí se favorecía particularmente una acción cooperativa de las partes de enlace polar y lipofílica, mientras que en los receptores **C, D y G** se habían incorporado grupos de receptores lipofílicos a expensas de los grupos amino.
- 30

Conclusión: En este ejemplo, se mostró que un sustrato (naringenina) en un disolvente puede producir distintos enlaces respecto a las correspondientes fases de receptor. Con una elección apropiada de los grupos de receptores en la fase estacionaria, se pueden activar interacciones polares y lipofílicas simultáneamente para la ligazón del sustrato. De modo correspondiente, se pueden preparar las fases de receptor que son óptimas para la ligazón de determinados sustratos o grupos de sustratos, donde existen simultáneamente distintas posibilidades de ligazón y así se producen espacios de interacciones selectivas.

Ejemplo 3: Ligazón de derivatizados de benceno de estructura afín como sustratos en una fase del receptor de la empresa instrAction por al menos un enlace bivalente

La interacción entre derivatizados de benceno de estructura afín y una fase del receptor C de instrAction (ND 02048#2, K1000-PVA-FA-2-5-Dod-MVS-100) se midió en una mezcla de disolventes orgánicos no polares. Además de los grupos de ácido 4-metilvaleriánico (MVS), la fase del receptor C aún contenía 0,16 mmol/g de grupos amino. Como disolvente servía una mezcla de éter metil-ter.-butílico / heptano (1 parte en volumen / 3 partes en volumen). En esta mezcla de disolventes no polares, eran de esperar preferentemente interacciones polares y, por otro, lado todas las sustancias de ensayo se disolvían bien adentro.

Las constantes de asociación (K_A) y cargabilidades máximas (R_0) para las interacciones entre la fase del receptor y las sustancias de ensayo se calcularon con los llamados "ensayos en recipientes de agitación".

Para los ensayos en recipiente de agitación, se suspendieron cantidades pesadas de forma exacta de la fase de receptor (de aproximadamente 200 - 350 mg cada una) en volúmenes medidos de forma exacta de disolvente (15 mL). A estas suspensiones se añadieron en porciones cantidades de sustrato pesadas exactamente. El sustrato de ensayo se distribuyó entre la fase del receptor y el disolvente con regulación de un equilibrio dinámico. El estado de equilibrio se podría calcular luego exactamente determinando la concentración de sustrato en el disolvente por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En este caso, se obtuvo directamente la cantidad de sustancia del sustrato en el disolvente. La cantidad de sustancia del sustrato en la fase del receptor se calculó como diferencia entre el sustrato añadido y el sustrato que se hallaba en solución. En cada ensayo en recipiente de agitación, se calculó varias veces el equilibrio con creciente concentración de sustrato en el sistema (6 - 12 veces). Las adiciones de sustrato y disolvente y sus extracciones se equilibraron cuidadosamente y se tuvieron en cuenta en el cálculo de las cantidades de sustancia.

Con cada regulación del equilibrio, se obtenía un punto en la isoterma de adsorción (carga de sustrato ligada a receptor [RS] respecto de sustrato en solución [S]). Usando el modelo de Langmuir para isotermas de adsorción, se calcularon las constantes de equilibrio para la asociación (K_A) y la cargabilidad máxima (R_0) mediante regresión no lineal.

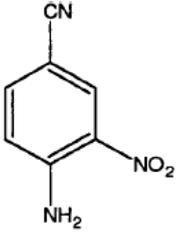
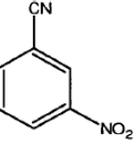
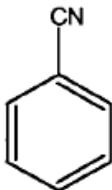
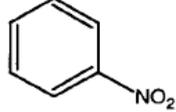
Isoterma de Langmuir: $[RS] = [R_0] \times [S] / (1/K_A + [S])$

En el caso de interacciones particularmente débiles, falló el procedimiento de la regresión no lineal. En estos casos, se calcularon K_A y R_0 por regresión lineal del diagrama según Scatchard ($[RS]/[S]$ aplicado respecto de [RS]). En la aplicación según Scatchard, se representan simples isotermas de Langmuir como rectas.

Linearización de Scatchard: $[RS]/[S] = -K_A \times [RS] + K_A \times [R_0]$

Los parámetros de interacción K_A y R_0 obtenidos están representados junto con los sustratos de ensayo en la Tabla 9.

Tabla 9: Sustancias de ensayo usadas y resultados de ligazón		
Nombre del sustrato	Estructura del sustrato	K_A en L/mol R_0 en mmol/g de fase

4-Amino-3-nitrobenzonitrilo		17700 ± 2600 3,5 ± 0,3
3-Nitrobenzonitrilo		405 ± 109 12,9 ± 2,4
4-Aminobenzonitril		991 ± 59 19,6 ± 0,7
Benzonitrilo		27 ± 14 no mensurable de forma exacta
Nitrobencono		En el sistema, pequeño no mensurable

Consideraciones de los resultados: De la Tabla 9 puede verse que la potencia de la interacción entre sustancia de ensayo y fase de receptor, representada por la constante de asociación K_A , aumentaba con la cantidad de sustituyentes en el anillo benceno.

- 5 Los derivatizados de benceno con sólo un sustituyente presentaban constantes de asociación de menos de 40 L/mol, valores que estaban en la estructura de medición descrita en el límite del cálculo.

Un segundo sustituyente en el anillo benceno incorporó otra posibilidad de interacción en la molécula de ensayo. Las dos interacciones débiles cooperaban y daban constantes de asociación para derivatizados de benceno disustituídos que se representaban de forma aproximada como el producto de las constantes de asociación de los bencenos monosustituídos. Conforme a ello, se obtuvieron valores K_A de 400 a 1000 L/mol.

- 10

El tercer sustituyente en el anillo benceno multiplicaba la constante de asociación del benceno disustituído con su propio potencial de interacción relativamente débil ($K_A \sim 20 - 40$ L/mol) y se obtuvo para el benceno trisustituído una constante de asociación de 17722 L/mol.

Para el 4-amino-3-nitrobenzonitrilo se representa el diagrama de Scatchard en la figura 1.

- 15 Figura. 1: Diagrama de Scatchard para distintas concentraciones de sustrato [S] de 4-amino-3-nitrobenzonitrilo

Allí significan:

a: área de interacciones trivalentes

[S] = 0,0044 - 0,043 mM

$$K_{A3} = 17722 \text{ L/mol}$$

$$R_{03} = 3,5 \text{ mmol/g de fase}$$

b: área de transición de enlaces trivalentes y bivalentes

$$[S] = 0,086 - 0,30 \text{ mM}$$

5 $K_{A2} = 2350 \text{ L/mol}$

$$R_{02} = 16 \text{ mmol/g de fase}$$

c: área de interacciones bivalentes

$$[S] = 0,40 - 0,98 \text{ mM}$$

$$K_{A1} = 855 \text{ L/mol}$$

10 $R_{01} = 33 \text{ mmol/g de fase}$

De las isotermas de Langmuir, se obtuvo no sólo la potencia de la interacción en forma de la constante de asociación K_A , sino también la cantidad de sitios de interacción como cargabilidad máxima R_0 . La cargabilidad máxima para la interacción trivalente era aproximadamente cinco veces menor que R_0 para la interacción bivalente. Esto se puede entender inmediatamente, ya que se puede suponer que en la fase del receptor sintética hay menos sitios de ligazón para tres interacciones simultáneas que para dos o incluso sólo una interacción. El 4-amino-3-nitro-benzonitrilo podía tener adicionalmente a los sitios de ligazón trivalentes, incluso sitios de ligazón bi- y también monovalentes; de hecho con las potencias de ligazón (K_A) menores respecto de estos sitios de ligazón y mayor cargabilidades máximas (R_0).

15

En la figura 2, se ilustra esta situación: si se determinaban los parámetros K_A y R_0 con concentraciones de sustrato muy pequeñas, entonces se observaba preferentemente la potente interacción trivalente (K_{A3} y R_{03}). Los sitios de ligazón mono- y bivalentes más débiles no estaban ocupadas por tales soluciones diluidas de modo digno de mencionar. Si se determinaban K_A y R_0 con mayores concentraciones de sustrato, se obtenían los tamaños de interacciones de los sitios de unión bivalentes más débiles y más numerosos (por ejemplo, K_{A1} y R_{01}). Los sitios de ligazón estaban ya saturados en estas concentraciones de sustrato y sólo producían un aporte constante a la isoterma de adsorción. Las interacciones monovalentes no están representadas en la figura 2.

20

25

En general, un curso curvado creciente hacia la izquierda de las isotermas en el diagrama de Scatchard demuestra la existencia simultánea de distintos sitios de ligazón potentes.

Conclusión: con los resultados experimentales representados, se podía mostrar que la fase del receptor C (estructura K1000-PVA-FA-2-5-Dod-MVS-100) puede producir interacciones trivalentes potentes como también interacciones mono- y bivalentes más débiles con 3-amino-4-nitrobenzonitrilo.

30

La fase igual del receptor se comporta de modo correspondiente frente a los sustratos con una menor cantidad de sustituyentes, es decir, la potencia máxima de ligazón se regía por la cantidad de sustituyentes en la molécula del sustrato.

La potencia de la ligazón podía ser influida más allá de ello por la modificación independiente de los sustituyentes de los dipolos permanentes e inducidos de la molécula del sustrato.

35

Ejemplo 4: Ligazón de esteroides como sustratos en fases de receptor de la empresa instrAction por al menos un enlace bivalente

La ligazón (retención) de estradiol y de testosterona con una fase de receptor A que contiene únicamente grupos amino (SBV 01044 VD/4 en la columna PV 02007) y con una fase C derivada con grupos alquilo ramificados (ácido 4-metilvaleriánico) al 27 % (ND 02001/1 en la columna PV 02001) se determinó con HPLC de gradiente.

40

Para la HPLC de gradiente se usaron las siguientes condiciones:

Eluyentes neutros:

Eluyente A: 1 parte en volumen de dimetilformamida + 9 partes en volumen de agua

Eluyente B: dimetilformamida

Eluyentes ácidos:

Eluyente A: 10 mM de ácido trifluoroacético (TFA) en 1 parte en volumen de dimetilformamida + 9 partes en volumen de agua

5 **Eluyente B:** 10 mM de ácido trifluoroacético en dimetilformamida

Perfil de gradiente: durante 5 minutos constante eluyente A con una tasa de flujo de 0,2 mL/min, luego mezcla de B con 2 %/min a 0,6 mL/min hasta una elución completa de sustancia.

10 En el gradiente se eluye la correspondiente sustancia cuando la energía de Gibbs para el proceso de solución en la fase móvil coincide justamente con la energía de ligazón de receptor-sustrato. La energía de Gibbs ΔG de la interacción de receptor-solución ingresa también en el equilibrio de energía: en el proceso de la disolución del sustrato (desorción) por la elevada cantidad de moléculas de disolvente pequeñas adsorbidas por lo general con una reducción de entropía ΔS así como con una entalpía de interacción moderada negativa ΔH .

15 En el caso de una fase de receptor construida convenientemente, durante la ligazón de sustrato (adsorción), la entalpía de interacción ΔH de la adsorción de disolvente es considerablemente menos negativa que el aporte de la entalpía de interacción polivalente ΔH entre receptor y sustrato.

Como las sustancias consideradas eran poco solubles en agua y muy solubles en DMF, el contenido de DMF de la fase móvil necesaria para elución era una medida en bruto, pero fácil de calcular, a fin de poder comparar rápidamente la potencia de ligazón de varios sustratos respecto de un receptor.

20 Se esperaba que tanto el estradiol como también la testosterona produjeran con los grupos alquilo de las fases de receptor interacciones lipofílicas, el estradiol debería ser capaz además de una ligazón de fenol-amina de tipo salino. El grupo de ácido 4-metilvaleriánico presente en la fase del receptor C (ND 02001/1 en la columna PV 02001) debería potenciar considerablemente la parte de ligazón lipofílica en comparación con la fase de amino A.

25 Se pronosticó que el estradiol contrariamente a la testosterona puede producir un enlace bivalente con una parte iónica y una parte lipofílica. En este caso, el estradiol en el gradiente de disolvente usado de la fase del receptor C debería eluir considerablemente más tarde que la testosterona. En la fase A, por el contrario, eran de esperarse en general tiempos de retención claramente más cortos, así como menores diferencias en el procedimiento de elución de testosterona y estradiol.

En la Tabla 10 se da la proporción de DMF de la fase móvil que era necesaria para romper la ligazón entre receptor y sustrato.

Tabla 10: Elución de gradiente de estradiol y testosterona

sustrato	Gradiente de agua-DMF		10 mM de TFA gradiente de agua-DMF	
	fase de amino A PV 02007	fase de receptor C PV 02001	fase de amino A PV 02007	fase de receptor C PV 02001
Estradiol	13,1 %	46,7 %	11,3 %	36,6 %
Testosterona	10,0 %	18,5 %	10,0 %	27,3 %

30 **1. Observación:** los resultados mostraban que el estradiol ya se ligada en la fase de amino A (PV 02007) más fuerte que la testosterona, lo cual podía atribuirse a la interacción iónica adicional. En la fase C alquilada (PV 02001) el estradiol eluía primero al 46,7 % de DMF, lo cual representaba respecto de la fase básica un aumento de 33,6 partes en volumen. Respecto de la potencia de elución de DMF, este resultado correspondía a un drástico aumento de la ligazón. La ligazón de la testosterona aumentó, por el contrario, sólo moderadamente al 18,5 % de DMF.

2. Observación: como era de esperar, la ligazón de estradiol se redujo cuando su posibilidad de interacción iónica por protonación de los grupos amino en la fase estacionaria se desconectaba ampliamente, al añadir a la fase móvil 10 mM de ácido trifluoroacético.

40 La unión de testosterona se potenció moderadamente contrariamente en medio ácido respecto de la fase C y quedó sin cambios respecto de la fase A. Para ambos sustratos era concebible que los grupos amonio del receptor

producidos por el ácido trifluoroacético en el eluyente generaran interacciones adicionales que no están a disposición de la amina.

5 En general, llamaba la atención que la potencia de ligazón en la fase del receptor era considerablemente más grande cuando se usaban dos diferentes tipos de interacción no covalentes. La potencia de ligazón por aumento de únicamente la superficie de contacto lipofílica de las partes de las moléculas alifáticas estaba menos marcada.

10 Estos hallazgos se siguieron sustentando luego por comparación de la retención de los elementos estructurales característicos de la molécula de estradiol. Con estas sondas moleculares se podían realizar rápidamente ensayos de HPLC abarcativos. Así, el 2-nafteno se unía a fases del tipo C considerablemente más potente que la naftalina y ésta, a su vez, mejor que el 1,2,3,4-tetrahidronafteno. De este comportamiento, se podía derivar a su vez el aporte de ligazón iónica esperado, mientras que no se produjo una ligazón polar de los grupos OH alcohólicos en el disolvente acuoso según se esperaba.

Conclusión: la unión bivalente de esteroides fenólicos en fases con contenido de grupos alquilo y amino como C (PV 02001) era ventajosa para la separación de esteroides no aromáticos. En este caso, se lograron en condiciones de separación isocrática valores α (selectividades de separación) de hasta 10

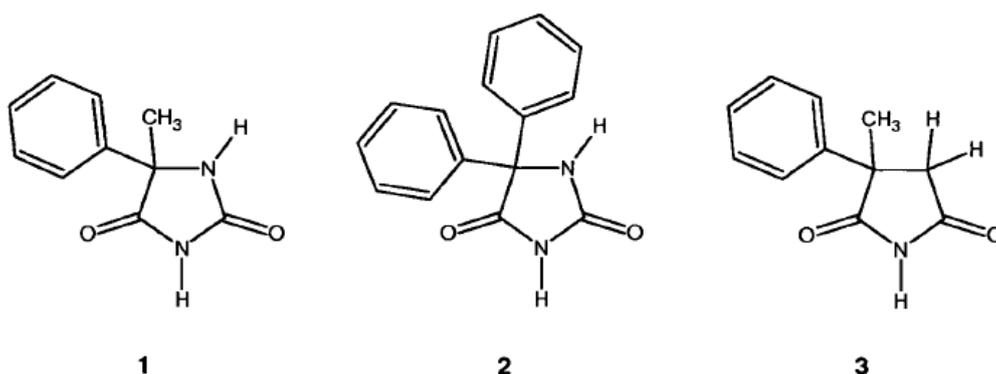
15 En el intercambiador iónico débilmente hidrofóbico A (PV 02007), por el contrario, esta separación no era posible con una resolución satisfactoria.

El principio representado se puede generalizar para la separación de sustancias fenólicas de compuestos alifáticos neutros o básicos, pero también de compuestos aromáticos. Más allá de ello, también se pueden separar bien fenoles polivalentes.

20 **Ejemplo 5: Ligazón de lactamas como sustratos en fases de receptor de la empresa instrAction por al menos un enlace bivalente**

La ligazón de fases de receptor que contenían metil-fenilhidantoína (MPH) 1, difenilhidantoína (DPH) 2 y metil-fenilsuccinimida 3 de cloroformo en una serie del 80 % de grupos amino y el 14 % de grupos bencilo (grado de reticulación del 5 %) (por ejemplo, PV 99047, PV 00010) se determinó por medio de análisis frontal.

25 Para ello, se lavó la fase del receptor empaquetada en columnas de HPLC (40 x 4 mm) con soluciones de sustrato de concentración creciente hasta el correspondiente equilibrio de saturación. De la tasa de flujo, el tiempo hasta la saturación de la sustancia y la concentración del sustrato, se pueden calcular con una concentración de sustrato constante conocida $[S] = [S_0]$, las correspondientes concentraciones en sustrato ligado $[RS]$. De las curvas de saturación medidas para las 10-12 concentraciones de sustrato, se pudieron determinar a través de las isoterms de adsorción o los diagramas de Scatchard las constantes de ligazón K_A y la concentración de saturación $[R_0]$,
30 con lo cual se pudieron calcular los rangos de enlace bivalente y monovalente.



Mediante la elección de solventes, se aseguró que esencialmente se calcularan interacciones polares, en especial enlaces de puente de hidrógeno.

35 Los valores hallados típicos se indican en a) a c).

a) Ligazón de MPH con poli(bencil-N-alil-carbamato) en gel de sílice, 6 capas, reticuladas (PAA-OBz114-2Dod, PV 99047):

Área de enlace bivalente:

$$K_A = 12703 \text{ M}^{-1}$$

$$\Delta G = 5,50 \text{ kcal/mol}$$

$$R_O = 12,0 \text{ mmol/g}$$

Área de enlace monovalente:

5 $K_A = 221 \text{ M}^{-1}$

$$\Delta G = 3,14 \text{ kcal/mol}$$

$$R_O = 301,4 \text{ mmol/g}$$

b) Enlace de DPH con poli(bencil-N-alil-carbamato) en gel de sílice, 6 capas, reticuladas (PAA-OBzI14-2Dod, PV 00010):

10 Área de enlace bivalente:

$$K_A = 19880 \text{ M}^{-1}$$

$$\Delta G = 5,76 \text{ kcal/mol}$$

$$R_O = 4,6 \text{ mmol/g}$$

Área de enlace monovalente:

15 $K_A = 201 \text{ M}^{-1}$

$$\Delta G = 3,09 \text{ kcal/mol}$$

$$R_O = 226,7 \text{ mmol/g}$$

c) Enlace de MPS con poli(bencil-N-alil-carbamato) en gel de sílice, 3 capas, reticuladas (PAA-OBzI14-2Dod, PV 99047):

20 Área de enlace monovalente:

$$K_A = 75 - 78 \text{ M}^{-1}$$

$$R_O = 96,5 - 97,4 \text{ mmol/g}$$

1. **Observación:** para las dos hidantoínas 1 y 2 (MPH y DPH) se calcularon en series de medición abarcativas para varias variantes de las fases de receptor (por ejemplo, PV 99047, PV 00010) constantes de ligazón bivalente K_A entre 6000 y 23000 M^{-1} con cantidades de sustancias de saturación R_O entre 3 mmol/g de fase y 12,6 mmol/g de fase. Esto indicaba que se podían formar dos puentes de hidrógeno con la amina. La constante de ligazón monovalente estaba entre 109 y 221 M^{-1} (R_O 239 - 301 mmol/g). Para el derivatizado de succinimida, por el contrario, se hallaron constantes de ligazón monovalente de 75 a 78 M^{-1} con un valor de saturación R_O de 96 mmol/g. Esto se puede indicar con el hecho de que una succinimida sólo puede formar un puente de hidrógeno y, por ello, sólo es capaz del enlace monovalente.

2. **Observación:** la constante de ligazón para un enlace bivalente corresponde bien al producto de los valores de las constantes de ligazón monovalente combinados. Las energías de Gibbs monovalentes correspondientes ΔG se suman de forma aproximada. Para una única ligazón de puente de hidrógeno de un grupo lactama de cinco anillos, se determinaron en cloroformo a 25 °C energía de Gibbs ΔG de entre 2,5 y 3,14 kcal/mol, para los puentes de H bivalentes 5,06 a 5,88 kcal/mol. Estos valores superan los datos esperados por medio de la literatura para el disolvente cloroformo (MPH: $K_A = 6014 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G = 5,06 \text{ kcal/mol}$, $R_O = 3,2 \text{ mmol/g}$; DPH: $K_A = 7171 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G = 5,16 \text{ kcal/mol}$, $R_O = 6,9 \text{ mmol/g}$ y $K_A = 145 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G = 2,90 \text{ kcal/mol}$, $R_O = 264,0 \text{ mmol/g}$).

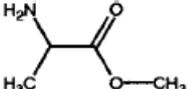
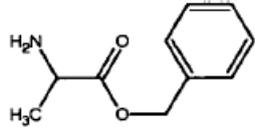
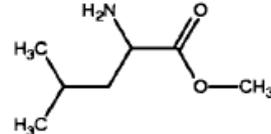
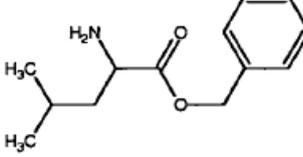
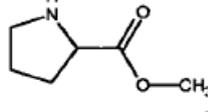
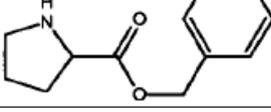
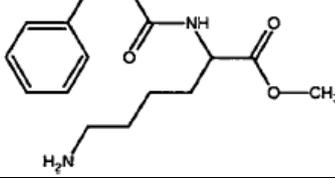
Conclusión: con ello, se pudo mostrar que también se produce una potenciación de la ligazón bivalente cuando en el lado del sustrato y en el lado del receptor aparecen dos radicales complementarios del mismo tipo (binding-site

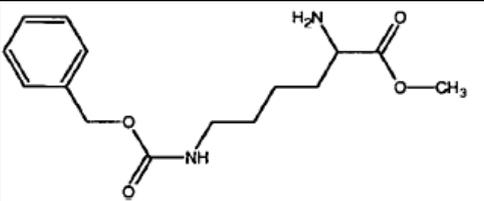
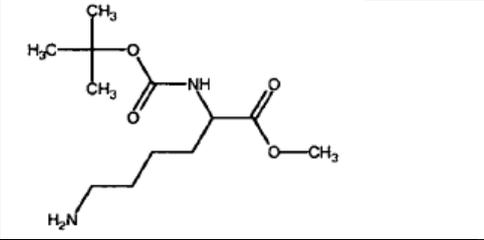
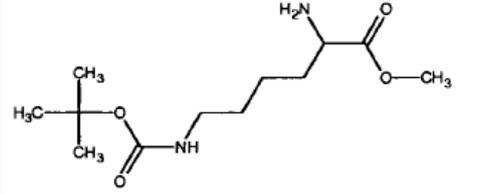
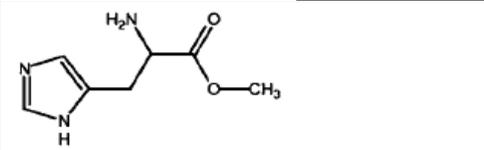
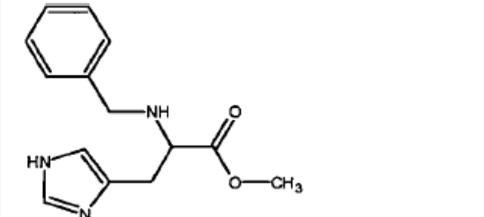
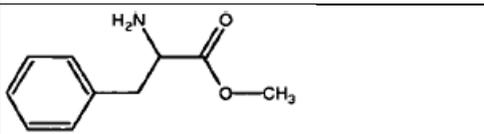
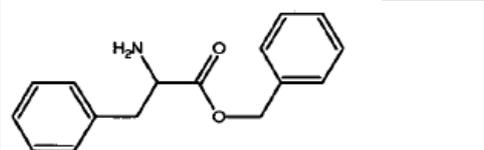
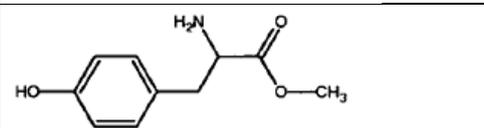
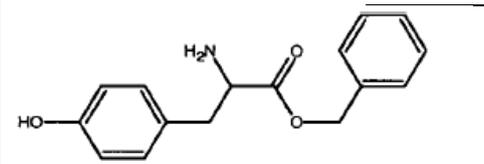
5 residues) en interacción mutua, similar al caso de los efectos de quelatos. En el caso mencionado, eran los grupos amida del sustrato y los grupos amina del receptor. En este caso, las energías de Gibbs se comportaban aproximadamente de forma aditiva, las constantes de ligazón, de forma multiplicativa. Según este principio, se podrían desarrollar en especial las fases de receptor que son apropiadas para la separación de sustancias homólogas o de sustancias con diferente valencia respecto de los grupos funcionales (por ejemplo, alcoholes mono- a hexavalentes como aproximadamente azúcar).

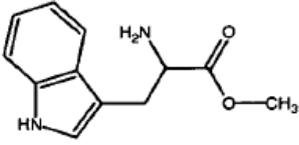
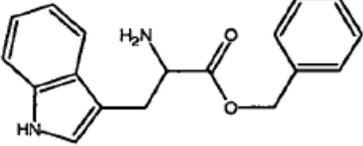
Ejemplo 6: Ligazón de algunos aminoácidos bloqueados en C como sustratos en sorbentes a base de polivinilamina/gel de sílice como sorbentes por al menos enlace bivalente

10 Se ensayaron las propiedades de retención de 18 diferentes derivatizados de aminoácidos (sustratos en la Tabla 11) en la cromatografía en siete fases estacionarias distintas (receptores sintéticos).

En el caso de los derivatizados de aminoácidos (**1-18**) se trata de ésteres de alanina, leucina, prolina, lisina, histidina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Los ésteres se seleccionaron para excluir interacciones no deseadas de las funciones carboxilato ionizables. De los ésteres metílicos, no esperábamos ningún aporte de interacción digno de mencionar, por el contrario en el caso de los ésteres bencílicos.

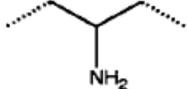
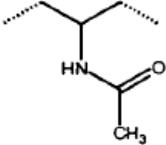
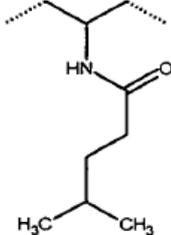
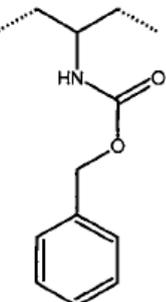
Tabla 11: Derivatizados de aminoácidos como sustratos		
Sustrato	Nombre	Estructura
1	H-Ala-OMe	
2	H-Ala-OBzl	
3	H-Leu-OMe	
4	H-Leu-OBzl	
5	H-Pro-OMe	
6	H-Pro-OBzl	
7	Z-Lys-OMe	

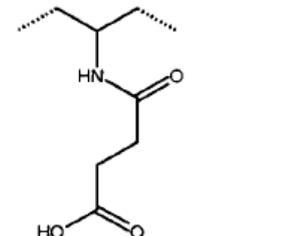
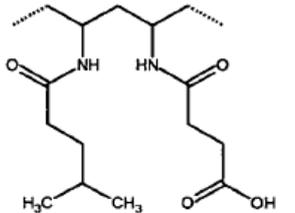
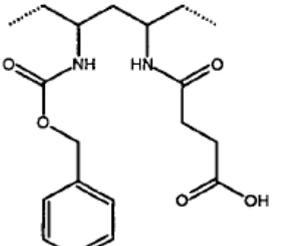
8	H-Lys(Z)-OMe	
9	Boc-Lys-OMe	
10	H-Lys(Boc)-OMe	
11	H-His-OMe	
12	Bzl-His-OMe	
13	H-Phe-OMe	
14	H-Phe-OBzl	
15	H-Tyr-OMe	
16	H-Tyr-OBzl	

17	H-Trp-OMe	
18	H-Trp-OBzl	

5 En el caso de las fases de receptor usadas, se trataba de gel de sílice esférico recubierto con polivinilamina con 20 mm de tamaño de partícula y 1000 Å de diámetro de poro. En el proceso de revestimiento, se produjo primero la fase de amino **A**. Las fases de receptor **B a K** derivadas se prepararon por síntesis en fase sólida de la fase de amino **A** según procedimientos conocidos. Las fases se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: Estructuras de las fases de receptor usadas

Denominación de la fase	Construcción de la fase	Estructura de la fase
A BV 03002	K1000-PVA-FA-2-5-Dod fase de amino	
B ND 03001#2	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-Ac-100 fase de acetilo	
C ND 03105	K1000-PVA-FA-2-10-Dod-MVS-100 fase de 4-metilvalerilo	
D ND 03017#3	K1000-PVA-FA-2-5-Dod-BzIO-100 fase de benciloxicarbonilo	

<p>I ND 02061#2</p>	<p>K1000-PVA-FA-2-5-Dod-BSr-100 fase de ácido succínico</p>	
<p>J ND 03096</p>	<p>K1000-PVA-FA-2-5-Dod-MVS-50-BSr-50 fase con grupos de ácido 4-metilvalerílico y succínico</p>	
<p>K ND 03088</p>	<p>K1000-PVA-FA-2-5-Dod-BzIO-50-BSr-50 fase con grupos de ácido benciloxycarbonilo y succínico</p>	

Como fase móvil para los ensayos cromatográficos, se usó 10 mM de tampón acuoso de Tris-HCl de 7,5.

5 Como medida para la potencia de la interacción entre sustrato y receptor en las correspondientes soluciones tamponantes, se usó la magnitud de elución relativa independiente del sistema k' (factor de capacidad). Se calcula de la diferencia de volumen de elución en el pico máximo y el volumen muerto de la columna, dividido por el volumen muerto de la columna.

$$k' = \frac{\text{volumen de elución} - \text{volumen muerto de la columna}}{\text{volumen muerto de la columna}}$$

Los valores k' de los sustratos en 10 mM de tampón de Tris-HCl se resumen en la Tabla 13.

Sustrato		Valor k' en la fase del receptor						
		A	B	C	D	I	J	K
1	H-Ala-OMe	0,0	0,0	0,0	0,2	13,7	8,7	11,6
2	H-Ala-OBzl	0,0	0,0	0,2	2,1	17,4	13,4	23,9
3	H-Leu-OMe	0,0	0,0	0,0	0,3	12,5	7,1	10,4
4	H-Leu-OBzl	0,0	0,1	6,3	10,0	13,1	18,6	41,7
5	H-Pro-OMe	0,0	0,0	0,0	0,4	-	11,9	15,9
6	H-Pro-OBzl	0,0	0,1	0,2	3,6	21,7	16,6	34,4

7	Z-Lys-OMe	0,0	0,1	0,0	2,4	19,7	20,9	61,5
8	H-Lys(Z)-OMe	0,0	0,1	0,6	6,5	12,0	11,5	30,2
9	Boc-Lys-OMe	0,0	0,0	0,0	0,4	14,3	11,9	20,2
10	H-Lys(Boc)-OMe	0,0	0,0	0,1	0,5	9,0	5,3	9,8
11	H-His-OMe	0,0	0,0	0,0	0,3	18,2	5,7	13,8
12	Bzl-His-OMe	0,0	0,0	0,5	1,2	4,5	1,9	3,7
13	H-Phe-OMe	0,0	0,0	0,1	0,2	6,5	1,7	3,2
14	H-Phe-OBzl	0,1	0,1	12,6	39,0	7,3	12,3	39,4
15	H-Tyr-OMe	0,0	0,2	0,7	1,0	8,7	4,8	6,5
16	H-Tyr-OBzl	0,1	0,3	16,7	20,3	9,4	16,3	16,5
17	H-Trp-OMe	0,5	0,2	1,0	4,4	12,5	10,7	17,7
18	H-Trp-OBzl	0,8	0,3	49,6	55,4	16,6	49,5	186,4

5 **1. Observación:** En el Ejemplo 1 se ensayaron los valores k' de derivatizados de aminoácidos con grupos carboxilato en las fases de amino. Los monocarboxilatos Ac-Gln **1** y Boc-Gln **2** del Ejemplo 1 se dirigían a una fase de amino (BV 02042), los valores k' de 9,5 y 8,8. En el presente Ejemplo 6, se obtuvieron para monoaminas simples como H-Ala-OMe **1** y H-Leu-OMe **3** en la fase de carboxilato I valores k' de 13,7 y 12,5.

Interpretación de la observación: al cambiar los grupos de interacción en la fase de sustrato y de receptor, los valores k' sólo cambian poco. Esto era de esperar ya que la potencia de la ligazón debería ser independiente de la dirección de la ligazón. Para el uso planificado de grupos de interacción, es importante que tenga lugar una ligazón comparable, independientemente de cuáles de los grupos se fijan en el receptor o se hallan móviles en el sustrato.

10 **2. Observación:** en la fase de amino **A** y la fase de acetamido **B**, prácticamente no apareció ninguna retención de los sustratos.

15 **Interpretación de la observación:** las fases de receptor **A** y **B** no contienen grupos de receptores con los que sería posible en el tampón seleccionado una interacción digna de mencionar con los sustratos. De modo correspondiente, los valores k' eran cercanos a cero. Estas fases se podían usar como puntos cero en la escala de interacciones relativas. La influencia lipofílica de la estructura polimérica se puede despreciar en el equilibrio de la ligazón.

3. Observación: todos los sustratos muestra claramente una retención en la fase del carboxilato I. Los valores k' están entre 4,5 y 21,7.

20 **Interpretación de la observación:** todos los sustratos ensayados contienen al menos un grupo amino. Este grupo amino está protonado ampliamente a pH 7,5 y puede producir fuertes interacciones iónicas con los aniones carboxilato de la fase.

4. Observación: las fases de receptor **C** y **D** mostraban menor retención con sustratos, que contenían una única

estructura parcial lipofílica, por ejemplo, **2, 6, 7, 8, 15 ó 17**. Había una fuerte retención (valores $k' > 8$) con sustratos que poseían al menos dos partes de moléculas lipofílicas mayores como **4, 14, 16 y 18**. En este caso, la ligazón con la fase de receptor aromático **D** era en cada caso mayor que con la fase de receptor de alquilo.

5 **Interpretación de la observación:** las fases de receptor **C y D** puede sólo formar interacciones lipofílicas. Estas ligaciones son relativamente débiles en comparación con las interacciones iónicas. Las interacciones lipofílicas monovalentes están por ello, en el tampón seleccionado, en el límite de la detección. Los sustratos con dos radicales polifílicos expandidos presentan a consecuencia de la superficie de contacto lipofílica, una mayor retención.

10 **5. Observación:** el valor k' más grande la el correspondiente sustrato se hallaba en la mayoría de los casos en la fase de receptor **K**.

15 **Interpretación de la observación:** la fase de receptor **K** contiene en aproximadamente iguales cantidades molares grupos carboxilato y benciloxicarbonilo, es decir, grupos de receptores para interacciones iónicas y lipofílicas. Como la cantidad total de los grupos de interacción corresponde a aproximadamente aquella de las fases de receptor de clases puras **C, D o I**, se debería esperar en la fase de receptor mixta **K** un valor k' que esté entre los valores k' de las fases **D y I**. Los valore k' altos hallados en la fase de receptor mixta muestran que en estos casos tienen lugar ligaciones iónicas y lipofílicas al mismo tiempo y, con ello, hay un modo de ligazón bivalente mixto.

Debido a la potencia de los contactos π - π entre compuestos aromáticos, la ligazón de todos los sustratos que presentan un radical aromático con la fase que contiene el grupo bencilo **K** es más potente que con la fase **J** con radical alquilo ramificado.

20 **Conclusión:** Con los experimentos antes descritos, se puede comprobar claramente que se pueden conectar y descontar dirigidamente las interacciones entre un sustrato y una fase de receptor por medio de una selección apropiada de grupos de receptores de clases puras. Para regular la afinidad y la selectividad, se pueden variar adicionalmente la composición del disolvente, la potencia iónica y el valor del pH.

25 Si un sustrato posee dos partes de moléculas lipofílicas, puede interactuar bivalentemente con la fase de receptor, lo cual lleva a una clara potenciación de la ligazón. En este caso, se trataba del caso de una interacción bivalente del mismo tipo.

También se podía mostrar que son posibles las interacciones bivalentes de distinto tipo (inónico y lipofílico), si tanto la fase de receptor como también el sustrato contienen grupos correspondientemente complementarios. También en este caso se produce una potenciación selectiva de la ligazón.

30 Por diseño de un receptor complementario correspondiente a una sustancia diana, se pueden separar fácilmente sustancias acompañantes o subproductos. La medida para la posibilidad de realización de la separación es el cociente de los valores k' , la selectividad *alfa*.

Selectividad: $\alpha = k_2'/k_1'$

35 Con la fase del receptor bencilo **D** por ejemplo no sería posible una separación por cromatografía de Boc-Lys-OMe (**9**) y H-Lys(Boc)-OMe (**10**). En la fase de receptor de carboxilato **I** se produjo un valor alfa de 1,59. Las fases de receptores mixtos **J y K** ya mostraban valores alfa de 2,25 y 2,06. Esto significaba que la separabilidad por cromatografía de una mezcla se mejora de forma significativa por medio de un diseño apropiado de la fase de receptor.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la ligazón bivalente selectiva de un sustrato sintético o natural con al menos dos grupos distintos capaces de ligarse con un sorbente, que comprende un vehículo sólido y al menos dos grupos diferentes capaces de la ligazón con el sustrato sintético o natural, en donde el procedimiento comprende las etapas (i) a (iv):
- 5 (i) cálculo de al menos dos grupos capaces de ligarse con un sorbente del sustrato sintético o natural,
- (ia) ligazón de un polímero no derivatizado a través de interacciones no covalentes con el vehículo,
- (ii) introducción en cada caso de al menos dos grupos diferentes capaces de ligarse con el sustrato sintético o natural a través de al menos dos grupos funcionales iguales o diferentes del polímero en este polímero, con la formación de al menos un sorbente, en donde en el caso de los grupos se trata de grupos que son
- 10 complementarios a los grupos calculados en la etapa (i), en donde se produce un polímero derivatizado con al menos dos distintos grupos capaces de ligarse y en cada caso los al menos dos grupos diferentes capaces de ligarse están ligados covalentemente en el polímero, en donde
- (a) los grupos se calculan de forma tal que los aportes de las energías de Gibbs de cada uno de los grupos para la ligazón no covalente con el sustrato dan un valor negativo de la energía de Gibbs ΔG , de modo tal que se produce
- 15 una potenciación de la ligazón que repercute en una selectividad de separación α mejorada de más de 1,4, con la que se separa el sustrato por ligar selectivamente con los al menos dos grupos diferentes capaces de ligarse con el al menos un sorbente usando el al menos un sorbente de la mezcla de sustrato y en donde tiene lugar
- (iii) la puesta en contacto del sustrato con el sorbente de la etapa (ii);
- (iv) el ensayo de la potencia de la ligazón del sustrato con el sorbente de la etapa (iii).
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el cálculo en la etapa (i) comprende la descomposición del sustrato sintético o natural en al menos dos componentes con al menos dos grupos capaces de ligarse con un sorbente.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque un componente posee dos grupos capaces de ligazón diferentes.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la selección de al menos dos grupos capaces para ligazón con un sorbente del sustrato sintético o natural en la etapa (i) lleva a dos componentes con al menos un grupo capaz de ligarse con el sorbente y en la etapa (ii) se obtiene un sorbente; o la selección de al menos dos grupos capaces para ligazón con un sorbente del sustrato sintético o natural en la etapa (i) lleva a tres componentes con al menos un grupo capaz de ligarse con el sorbente y en la etapa (ii) se obtienen al
- 30 menos tres sorbentes; o la selección de al menos dos grupos capaces de ligarse con un sorbente del sustrato sintético o natural en la etapa (i) lleva a cuatro componentes con al menos un grupo capaz de ligarse con el sorbente y en la etapa (ii) se obtienen al menos seis sorbentes.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los al menos dos diferentes grupos capaces de ligazón del al menos un sorbente se seleccionan entre grupos que son componente de aminoácidos, azúcares, nucleótidos; nucleósidos, bases de pirimidina y bases de purina.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los al menos dos diferentes grupos capaces de ligazón del sustrato se seleccionan entre grupos que son componente de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, nucleósidos, bases de pirimidina y bases de purina.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en la etapa (ii) los al menos dos grupos diferentes capaces de ligarse con el sustrato a través de un reactivo se aplican sobre un
- 40 vehículo recubierto con polímero, que se selecciona del grupo que comprende reactivos de activación, reactivos de silanización y espaciadores o mezclas de dos o varios de estos reactivos.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque en la etapa (ii) los al menos dos grupos diferentes capaces de ligarse con el sustrato se componen de radicales fenilo, hidroxifenilo, carboxilo, amina, amida, hidroxilo, indol, imidazol y guanidina.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende adicionalmente la etapa (v):
- (v) aislamiento del sustrato.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende

adicionalmente la etapa (vi):

(vi) caracterización e identificación del sustrato.

- 5 **11.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el sustrato comprende uno o varios principios activos naturales seleccionados del grupo que comprende aminoácidos, oligopéptidos, nucleótidos, proteínas, glucoproteínas, antígenos, anticuerpos, hidratos de carbono, enzimas, coenzimas, hormonas, alcaloides, esteroides, virus, microorganismos, ingredientes de tejido vegetal y animal, células, fragmentos celulares, compartimientos celulares, disrupciones celulares, lectinas, compuesto de flavilio, flavonas e isoflavonas o uno o varios principios activos sintéticos seleccionados del grupo de sustancias con acción sobre el sistema nervioso, con acción sobre el sistema hormonal, con acción sobre mediadores, con acción sobre el sistema cardiocirculatorio, con acción sobre el tracto respiratorio, con acción sobre el tracto gastrointestinal, con acción sobre el riñón y las vías urinarias eferentes, con acción sobre el ojo, con acción sobre la piel, sustancias para la prevención y la terapia de enfermedades infecciosas, con acción sobre tumores malignos, con acción sobre el sistema inmune y sustancias de acción inmunológica, así como insecticidas, herbicidas, pesticidas y fungicidas.
- 10