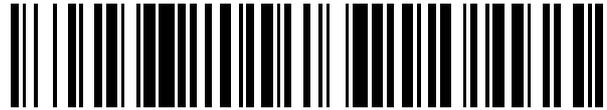


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 766**

51 Int. Cl.:

G01N 30/72 (2006.01)
B01J 20/26 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)
B01J 20/30 (2006.01)
B01J 20/285 (2006.01)
B01J 20/283 (2006.01)
B01J 20/284 (2006.01)
B01J 20/289 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2009 E 09710168 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2254696**

54 Título: **Resina cromatográfica mejorada y métodos y dispositivos relacionados con la misma**

30 Prioridad:

14.02.2008 EP 08151450
14.02.2008 US 28609

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2015

73 Titular/es:

R-BIOPHARM RHÔNE LTD (100.0%)
Block 10 Todd Campus, West of Scotland
Science Park, Acre Road
Glasgow, Scotland G20 0XA, GB

72 Inventor/es:

RHEMREV-BOOM, MARIA MARTHA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 554 766 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

Resina cromatográfica mejorada y métodos y dispositivos relacionados con la misma

5 La invención se refiere al campo de la química analítica y preparativa. Entre otros, se refiere a una resina cromatográfica mejorada y a medios y métodos que implican el uso de la resina para la limpieza (en línea) de muestras de ensayo complejas, tales como muestras biológicas.

10 Debido a su alta especificidad, alta sensibilidad y capacidad de proporcionar información estructural, se ha usado la espectrometría de masas en diversos campos técnicos, incluyendo aplicaciones farmacéuticas, clínicas y bioquímicas. La combinación de MS con una técnica analítica cromatográfica, tal como cromatografía líquida a alta presión (HPLC) puede proporcionar una gran cantidad de información en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, actualmente, la preparación de la muestra de ensayo antes de tal análisis cualitativo y cuantitativo aún es una tarea laboriosa. Normalmente comprende muchas etapas y es responsable de una parte significativa de las desviaciones en los datos analíticos. Una manera de esquivar (parcialmente) esto es el uso de extracción en fase sólida en línea (SPE) para reducir el número de etapas en la preparación de una muestra. La SPE implica separación cromatográfica en una columna corta con una resolución muy limitada. Sirve para aislar aproximadamente los analitos de los constituyentes principales de la matriz. En el modo en línea, la columna SPE está conectada directamente aguas arriba de la columna de HPLC, separada por una válvula conmutadora para permitir desviar los componentes de la matriz de los residuos, antes de transferir los analitos desde la columna de SPE a la columna de HPLC. Véase, por ejemplo el documento EP1159597 a nombre del solicitante. La SPE en línea también se describe por Alex Berhitsu y Emile Koster en "How to determine matrix effects and extraction recovery in online solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry", ASMS 2007, XP002488408.

25 Sin embargo, para el análisis de muestras de ensayo biológicas con estas técnicas, se ha descubierto que la señal de MS puede aún alterarse debido a la supresión de ionización de analito en el detector de MS provocada por los componentes de matriz no volátiles residuales, tal como proteínas pequeñas, péptidos y sales.

30 Para resolver este problema, se han investigado en la técnica otros modos más selectivos de SPE. La SPE de afinidad e inmunoafinidad son de lejos las técnicas de separación selectiva más potentes para aislar, concentrar y purificar selectivamente compuestos diana de entre una muestra de ensayo compleja. Esto posibilita potencialmente la preparación de una muestra en una única etapa. Su selectividad se origina de un ligando que está fijado a un soporte sólido (medios, resina, partículas, etc.), ligando que reconoce selectivamente el analito diana. Idealmente, una muestra de ensayo que comprende una mezcla de componentes, entre otros, el analito diana, se hace pasar a través de una columna de (inmuno)afinidad y se separa en dos fracciones. La primera fracción no se une al soporte sólido y eluye a $k' = 0$, mientras que la segunda porción, que idealmente contiene solo el analito de interés se reconoce y absorbe por el ligando. Cambiando las características de la fase móvil, por ejemplo, cambiando el pH, el contenido de sal y/u otro parámetro, la segunda porción puede eluirse de la fase sólida. Especialmente cuando se usa en combinación con otros modos de cromatografía, por ejemplo cromatografía de alta presión, la SPE de (inmuno)afinidad posibilita por tanto una limpieza de la muestra muy selectiva y eficaz y, como resultado, un tiempo de análisis muy corto por cada muestra de ensayo.

45 Sin embargo, a pesar de su potencial y la disponibilidad de una gran diversidad de ligando para muchos analitos diana, se ha informado de que solo se usan unas pocas aplicaciones de SPE basada en (inmuno)afinidad en combinación con otros modos de cromatografía actualmente. Además, apenas se ha informado de la combinación en teoría muy potente y, por tanto, deseable de preparación de muestra de (inmuno)afinidad con una separación cromatográfica seguida de detección MS, presumiblemente debido al hecho de que los tampones no volátiles convencionales usados durante este tipo de separaciones no son compatibles con MS. Cai *et al.* (Anal. Chem. Vol. 68, 1996, pág. 72-78) informaron de un método en tándem de extracción de por inmunoafinidad en línea-acoplado con cromatografía líquida en columna capilar/espectrometría de masas, que implica una columna de inmunoafinidad de proteína G con un anticuerpo inmovilizado de forma no covalente específico para los analitos de interés.

55 Adicionalmente, debe ponerse énfasis en que, en general, los soportes en fase sólida más rígidos usados para la SPE de inmunoafinidad en línea aún demuestran alguna adsorción no selectiva de los constituyentes de la matriz que aún provoca supresión de iones en el detector de MS. Los presentes inventores se han dado cuenta de que, para la permitir la aplicación combinada de SPE de (inmuno)afinidad con los detectores de MS altamente sensibles y selectivos con/sin la combinación con otros modos de cromatografía, la resina de SPE tiene que satisfacer criterios específicos. Como ya se ha indicado, para las aplicaciones pretendidas en este documento, un criterio principal es la baja adsorción no selectiva y/o interacción hacia componentes de matriz no diana. Adicionalmente, la resina debería ser química y físicamente estable, poseer buena resistencia mecánica para permitir altos caudales y soportar las altas presiones normalmente usadas durante la cromatografía líquida a alta presión. Además, la inmovilización del ligando de interés a la resina preferentemente debería ser tal que i) se consiga una alta accesibilidad al ligando y ii) las propiedades del ligando no se destruyan durante la inmovilización química.

65 Está disponible una gran variedad de soportes en fase sólida, polímeros orgánicos e inorgánicos, que podrían usarse para el diseño de estos soportes en fase sólida, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. Entre los

5 primeros materiales introducidos y ampliamente aceptados como soportes en fase sólida están los polisacáridos reticulados naturales, tales como agarosas, sacarosas, celulosas y dextranos. Estos materiales son estables sobre un amplio intervalo de pH, poseen abundantes grupos hidroxilo para activación para permitir el acoplamiento del ligando en condiciones fisiológicas y tienen propiedades de adsorción no selectiva bajas. Sin embargo, estos materiales se excluyen del uso en aplicaciones a alta presión debido a su pobre resistencia mecánica e hinchado dependiente de disolvente.

10 Los soportes basados en polímeros orgánicos sintéticos, tales como poli(acrilamida), poli(acrilato), poli(metacrilato), poli(vinilo) y polímeros de poliestireno y derivados de los mismos, dependiendo de su cantidad de reticulación, demuestran resistencias mecánicas muchos mejores. Sin embargo, para el fin pretendido en este documento, se encontró que la adsorción no selectiva aún era demasiado alta para, por ejemplo, para permitir un fácil acoplamiento con la detección por MS y conseguir la sensibilidad requerida. Los polímeros inorgánicos tales como sílice, alúmina y zirconia, que se conocen bien por su resistencia mecánica alta, demuestran propiedades de adsorción altamente no selectiva. Se considera que esto se debe a sus enormes propiedades de adsorción y/o en relación con sus áreas superficies generalmente altas.

15 En vista de lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar una resina cromatográfica que tenga una buena estabilidad mecánica combinada con una absorción no selectiva muy baja. Preferentemente, la resina permite un acoplamiento covalente de un ligando en condiciones fisiológicas (pH, potencia salina, etc.) y es compatible con los tampones volátiles adecuados para análisis de MS.

20 Sorprendentemente, se ha descubierto que los objetivos anteriores pueden satisfacerse mediante la provisión de un soporte sólido rígido especial (resina cromatográfica) que se modifica químicamente con una molécula hidrófila no polimérica pequeña para formar una superficie hidrófila, cuya superficie a) reduce la unión no específica y b) permite un acoplamiento muy eficaz de un ligando al soporte sólido.

25 Específicamente, la presente invención proporciona:

- 30 - una resina cromatográfica adecuada para su uso en cromatografía de afinidad a alta presión, comprendiendo la resina un polímero orgánico rígido y teniendo la resina una superficie hidrófila, caracterizada por que la superficie hidrófila está formada por una multiplicidad de compuestos hidrófilos no poliméricos pequeños unidos covalentemente que tienen un peso molecular menor de 1000 Dalton y en las que la resina no contiene un recubrimiento hidrófilo formado por una estructura polimérica;
- 35 - un método para proporcionar una resina cromatográfica de la presente invención, comprendiendo el método la etapa de formar una superficie hidrófila no polimérica haciendo reaccionar un polímero orgánico rígido con al menos un compuesto hidrófilo no polimérico que tiene un peso molecular menor de 1000 Dalton;
- una columna cromatográfica que comprende una resina de la presente invención;
- 40 - un aparato que comprende una columna cromatográfica de la presente invención en comunicación fluida con un sistema analítico, preferentemente en el que dicho aparato comprende un sistema de extracción en fase sólida (SPE) integrado con un sistema de cromatografía líquida (LC), preferentemente un sistema de cromatografía líquida a alta presión (HPLC); y
- uso de una resina de la presente invención en un método analítico para analizar una muestra de ensayo que comprende extracción en fase sólida, preferentemente en el que el método comprende detección mediante espectroscopía de masas (MS) de al menos un analito en la muestra.

45 La resina puede estar en forma de partículas.

50 Como se ejemplificará más adelante en este documento, una resina de la invención se caracteriza por una superficie hidrófila que se forma por una multiplicidad de pequeños compuestos hidrófilos unidos covalentemente. Los grupos hidrófilos de los compuestos contribuyen a una unión no selectiva muy baja del material, y adicionalmente permiten un acoplamiento eficaz de ligando al material. Puesto que solo parte de los restos hidrófilos están provistos de ligando, hacen a la superficie del polímero hidrófila. Debido a su combinación única de alta resistencia mecánica y absorción no selectiva muy baja, la resina como se proporciona en este documento se usa ventajosamente en cromatografía de inmuno(afinidad) de alta capacidad de producción, en particular para pretratamiento de muestras (en línea) por extracción en fase sólida.

55 Se sabe en la técnica cómo proporcionar una material de soporte sólido con una superficie hidrófila. Sin embargo, los agentes usados en la técnica para obtener tal superficie hidrófila siempre son moléculas poliméricas grandes. Por ejemplo, el documento WO 01/58561 y el documento US 2005/092196 desvelan el uso de polímeros hidrófilos flexibles, solubles en agua, tal como polietilenglicol, para modificar la superficie de un material de soporte de polímero inorgánico. El documento EP-0295073-A2 desvela un espaciador hidrófilo no iónico interpuesto entre un soporte sólido y un ligando de afinidad para permitir un acceso estérico potenciado mediante ligandos de afinidad unidos a las macromoléculas. De acuerdo con el documento EP-0295073-A2, el espaciador es cualquier polímero de subunidades que, cuando se polimeriza, produce un espaciador que contiene restos polares pero no ionizados que hacen al espaciador hidrófilo, tal como polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), etc. Más preferentemente, el espaciador tiene aproximadamente 90-100 átomos. El documento EP-0621074-A1 da a conocer un soporte de afinidad basado en un soporte de perfluorocarbono que está recubierto con un polímero hidrófilo reticulado,

preferentemente PVA.

Antes de la presente invención, en general se creía en la técnica que el área superficial hidrófila grande proporcionada por un recubrimiento de polímeros hidrófilos era responsable de la unión no específica reducida. De esta manera, por lo tanto, se ha dado preferencia siempre a estructuras hidrófilas reticuladas altamente complejas. Sin embargo, los presentes inventores observaron sorprendentemente que el uso de moléculas hidrófilas no poliméricas pequeñas tiene claras ventajas respecto al uso de estructuras hidrófilas poliméricas grandes conocidas en la técnica. Se ha encontrado que cuanto mayor es el peso molecular del compuesto hidrófilo, mayor es la absorción no selectiva. La mayoría de materiales de soporte cromatográfico obtienen su gran área superficial (y por tanto su capacidad de unión) de su estructura porosa. Normalmente están disponibles en diferentes tamaños de poro, dependiendo de la aplicación específica. Por ejemplo, el material de soporte con poros pequeños (por ejemplo 60 Å) puede usarse para la separación de moléculas pequeñas que varían de 100-1000 Dalton. Para la separación de biomoléculas, la mayor parte de las cuales están en el intervalo de 15 a 250 kDa y mayor, se requieren resinas con un tamaño de poro mucho más mayor, tal como de 300 a 2000 Å. Las separaciones basadas en inmunofinidad que implican el acoplamiento de un anticuerpo (aproximadamente 150 kD) a la resina, requieren estos grandes poros para permitir una capacidad de unión suficiente. Puede observarse que no todos los poros tienen el gran tamaño de poro prescrito, y se cree que los poros más pequeños son al menos en parte responsables de la unión no específica en el caso de que se empleen grandes moléculas poliméricas para hacer a la superficie de la resina más hidrófila. Aparte del hecho de que los pequeños analitos (tanto el analito de interés como aquellos que provocan una unión no selectiva) generalmente demuestran mayores constantes de difusión en comparación con estos materiales hidrófilos poliméricos, estos pequeños analitos también pueden penetrar más fácilmente en estos poros más pequeños, mientras que los materiales hidrófilos poliméricos tendrán solo un acceso limitado o ningún acceso en estos poros más pequeños. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la mayor velocidad de difusión del compuesto no polimérico de acuerdo con la invención permite una modificación más eficaz de la superficie. Además, las cavidades de poro del soporte de polímero son mucho más accesibles para un compuesto hidrófilo pequeño empleado en la presente invención en comparación con una gran estructura polimérica usada en la técnica, tal como dextranos, PEG o PVA. Esta diferente da como resultado un área superficial hidrófila eficaz más grande y, por tanto, un carácter de unión no selectiva mejorado del soporte.

La expresión "no polimérico" como se usa en este documento se destina fundamentalmente a indicar que el compuesto hidrófilo no está constituido por unidades estructurales de repetición. De hecho, puede considerarse como una unidad estructural única e individual. El peso molecular del compuesto hidrófilo no polimérico pequeño, es decir, cuando se considera como una molécula separada y no incluyendo el soporte en fase sólida ni un ligando fijado al mismo, es menos de aproximadamente 1000 Dalton, preferentemente menos de 500 Dalton. De esta manera, la presente invención se distingue claramente de la técnica anterior, únicamente desvelando un soporte provisto de un recubrimiento hidrófilo formado por una estructura polimérica. En una realización, el compuesto hidrófilo no polimérico tiene 1-10 átomos de C. En particular, un método de la invención comprende hacer reaccionar el polímero con un compuesto hidrófilo de fórmula general $C_nH_m(Y)_k$, en la que n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 2 a 8; $m \leq 2n$; $k \leq 3n$ y en el que Y es un resto hidrófilo, preferentemente en el que Y es -OH o -COOH.

La invención puede realizarse de forma práctica con cualquier tipo de polímero orgánico que sea suficientemente rígido y estable para soportar una alta presión, preferentemente hasta aproximadamente 200, más preferentemente aproximadamente 300 bar. En una realización, el polímero orgánico es un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliacrilamidas, poliacrilatos, polimetacrilatos, polivinilo, poliestireno y derivados de los mismos. Estos incluyen polímeros y copolímeros de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), metacrilato de metilo (MMA) y metacrilato de etilenglicol (EDMA). Son particularmente adecuados los (co)polímeros de HEMA. La resina puede tener una superficie porosa. El tamaño de poro puede variar de aproximadamente 50 a 3000 Å. Como se ha indicado anteriormente en este documento, el uso de pequeños compuestos hidrófilos es particularmente ventajoso para reducir las propiedades de unión no selectiva de una resina que tiene poros relativamente grandes (por ejemplo de 300 a 1000 o de 300 a 2000 Å) para su uso en separaciones de inmunofinidad.

Para mejorar la reactividad entre el polímero y dicho al menos un compuesto hidrófilo, un método puede comprender, antes de hacer reaccionar el polímero con el al menos un compuesto hidrófilo, una etapa de activación de dicho polímero y/o dicho compuesto hidrófilo. Dependiendo del tipo de polímero y compuesto hidrófilo usados, puede ser deseable activar uno cualquiera o ambos de los reactantes. Por supuesto, en los casos donde la reactividad entre el polímero y el compuesto hidrófilo tal cual sea suficiente, no se requiere activación. El experto será capaz de decidir si la activación es deseable y, si es así, qué compuesto químico de activación aplicar. La activación del polímero y/o el compuesto hidrófilo se consigue fácilmente proporcionando el polímero y/o el compuesto hidrófilo con uno o más grupos reactivos que se sabe que potencian la reactividad entre ambos reactantes. De esta manera, se pueden conseguir compuestos químicos complementarios (es decir, reactivos) conocidos en la técnica introduciendo restos funcionales en el soporte en fase sólida y/o el compuesto hidrófilo. Los grupos reactivos ejemplares incluyen $-NH_2$, $-OH$ y $CH=CH_2$. Estos pueden introducirse por métodos convencionales. Por ejemplo, los compuestos químicos reactivos de amina pueden introducirse usando NHS (N-hidroxisuccinimida ésteres)-, CDI- (carbonil diimidazol)- y/o EDC- (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), aminación reductora introduciendo restos $-CHO$ -, FMP- (tolueno-4-sulfonato de 2-fluoro-1-metilpiridinio), activación mediante cloruro de

Tresilo y/o Tosilo. Los compuestos químicos reactivos con hidroxilo pueden introducirse a través de activación epoxi. Los compuestos químicos reactivos por polimerización, tales como grupos vinilo, pueden introducirse mediante el uso de monómeros de derivados de acrilato y/o metacrilato.

5 Se entenderá que el concepto de la presente invención puede llevarse a la práctica usando una amplia diversidad de moléculas hidrófilas pequeñas (activadas). Los métodos ejemplares que implican hacer reaccionar un polímero con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en etanolamina, 3-amino-1,2-propanodiol, N-(hidroximetil)acrilamida, 3-aliloxi-1,2-propanodiol, N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida y glicidol. Pueden usarse también combinaciones de dos o más compuestos hidrófilos distintos.

10 La resina de la presente invención puede comprender además uno o más ligandos fijados al polímero rígido descrito anteriormente mediante un compuesto hidrófilo fijado al polímero. Para ello, la resina cromatográfica que tiene una superficie hidrófila puede hacerse reaccionar con al menos un ligando para permitir la fijación covalente de dicho al menos un ligando a la resina mediante dicho al menos un compuesto hidrófilo no polimérico.

15 El ligando puede ser cualquier molécula o fragmento de molécula capaz de unirse a otro analito basado en resto o molécula, por ejemplo, unión a través de interacción hidrófoba, unión covalente o interacción colúmbica. Tales ligandos los conoce bien el experto en la materia de la cromatografía de (bio)afinidad. Los ligandos típicamente usados en la industria de las bioseparaciones incluyen biotina, avidina, estreptavidina, proteína natural o no natural, péptido, antígeno y ácido nucleico. En la presente invención, el ligando preferentemente es una molécula biológica o sintética, preferentemente una proteína o péptido tal como un anticuerpo (monoclonal) o un receptor.

20 En una realización específica, el ligando es un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a una o más hormonas esteroideas desde una mezcla compleja. Las hormonas esteroideas incluyen, aunque sin limitación, estradiol, estrona, etinilestradiol, testosterona y nortestosterona. En esta realización, las mezclas complejas pueden incluir, aunque sin limitación, agua corriente, agua subterránea, aguas de proceso, muestras medioambientales tales como suelo, lodo, aguas superficiales en general y aguas superficiales que contienen posible contaminación farmacéutica en particular, formulaciones farmacéuticas, fluidos biológicos humanos y animales (tales como suero y orina) y otras muestras biológicas (por ejemplo, tejido animal, muestras biológicas, etc.). Otras aplicaciones ejemplares de la presente invención pueden encontrarse en la industria de los alimentos y las bebidas. Por ejemplo, una resina como se proporciona en este documento puede usarse para detección de componentes indeseables en alimentos o fuentes alimentarias. En un aspecto específico, una resina hidrófila de acuerdo con la invención se usa para detectar (mico)toxinas en cereales, por ejemplo, en una columna de SPE de inmunoafinidad en línea.

35 Otra aplicación específica de la presente invención se refiere a la cuantificación de compuestos terapéuticos en una muestra humana. Una resina de la invención, funcionalizada con uno o más ligandos capaces de reconocer específicamente el fármaco o fármacos o metabolitos del mismo, se usa adecuadamente para la extracción en fase sólida en línea (limpieza) de la muestra, seguido de un análisis del analito diana posterior, por ejemplo, usando espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (por ejemplo SPE-LC-MS/MS). No es necesario realizar etapas adicionales tediosas y que consuman tiempo de preparación de muestra, tal como precipitación, centrifugación y pipeteo de proteínas para la limpieza de la muestra. Como un ejemplo, los fármacos retrovirales en plasma humano, tales como inhibidores (PI) e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), pueden cuantificarse de una manera rápida, sensible y totalmente automatizada. Por consiguiente, una resina de la invención es perfectamente apropiada para monitorización de fármaco terapéutico rutinario, por ejemplo, de muestras de plasma de un paciente de VIH/SIDA o un paciente que recibe antidepresivos.

40 Como apreciará un experto en la materia, un método de la invención puede implicar los polímeros ejemplares y preferidos, compuestos hidrófilos y/o ligandos como se ha descrito anteriormente. Los Ejemplos a continuación describen la preparación de diversas resinas activadas de la invención, que implican la activación del polímero y/o compuesto hidrófilo mediante diversos compuestos químicos de activación.

50 Después de la activación de un polímero rígido con compuestos hidrófilos, pueden usarse varios tipos de compuestos químicos para la fijación covalente de ligandos (biológicos). De esta manera, en un método de la invención, la preparación de una resina hidrófila activada va seguida preferentemente de la etapa de reacción de esta con al menos un ligando para permitir la fijación covalente de dicho al menos un ligando a dicho soporte en fase sólida a través de dicho compuesto hidrófilo. De acuerdo con la invención, el ligando no está fijado directamente a la superficie del polímero sino indirectamente mediante unión covalente al compuesto hidrófilo. Los grupos hidrófilos, por ejemplo, -OH o -COOH, del compuesto hidrófilo pueden usarse o modificarse por métodos conocidos en la técnica para crear sitios reactivos para la unión del ligando. En general, habrá un exceso de sitios reactivos en el compuesto hidrófilo que están disponibles para la unión del ligando. Por consiguiente, no todos los compuestos hidrófilos tienen que estar provistos de ligando. El ligando puede fijarse al compuesto hidrófilo de una manera directa o indirecta, por ejemplo, mediante una molécula espaciadora entre la resina activada y el ligando. El uso de espaciadores se conoce en la técnica. Los espaciadores preferidos son espaciadores hidrófilos puesto que estos evitarán cualquier influencia negativa sobre la no selectividad de la resina.

65

Las realizaciones ejemplares de métodos para funcionalizar una resina activada de acuerdo con la invención se pueden describir esquemáticamente de la siguiente manera en la que X-Z es la resina activada, siendo X un polímero rígido provisto de Z, que representa el compuesto hidrófilo.

- 5 1. sin espaciador a. $X-Z + A = X-Z-A$ (A permite el acoplamiento del ligando en condiciones fisiológicas)
 b. $X-Z-A + \text{ligando} = X-Z\text{-ligando} + A$
2. con espaciador a. $X-Z + A1 = X-Z-A1$ (A1 permite el acoplamiento del espaciador)
 b. $X-Z-A1 + S = X-Z-S + A1$ (S = espaciador)
- 10 c. $X-Z-S + A2 = X-Z-S-A2$ (A2 permite el acoplamiento del ligando en condiciones fisiológicas; A2 puede ser igual o diferente de A1 por ejemplo amina, hidroxí, epoxi, ácido carbónico o carbonilo).
 d. $X-Z-S-A2 + \text{ligando} = X-Z-S\text{-ligando} + A2$

15 La invención proporciona también una resina cromatográfica que puede obtenerse por un método de acuerdo con la invención. La resina preferentemente es una resina funcionalizada que comprende al menos un ligando, por ejemplo, un anticuerpo, capaz de unirse específicamente un analito de interés. Otro aspecto se refiere a una columna cromatográfica que comprende una resina como se proporciona en este documento, por ejemplo una columna de afinidad que comprende una resina en forma de partículas, en la que cada partícula comprende un

20 polímero rígido cuya superficie está activada con compuestos hidrófilos, y en la que al menos parte de los compuestos hidrófilos llevan uno o más ligandos. En vista de la alta estabilidad mecánica de la resina, la columna puede ser una columna resistente a alta presión. En una realización preferida, la invención proporciona un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) que comprende una resina de la invención. Debido a sus propiedades de unión no selectiva bajas, un cartucho de SPE de la invención es muy adecuado para SPE de afinidad. Preferentemente, el

25 cartucho es un cartucho de SPE en línea, por ejemplo adecuado para su uso en sistemas Symbiosis™/Prospekt-2 (Spark Holland BV, Emmen, Países Bajos).

El cartucho de SPE en línea puede estar diseñado especialmente para elución en línea a la columna de HPLC. Las dimensiones se optimizan para combinar una alta capacidad de extracción con pequeños volúmenes de elución. Las

30 dimensiones normales son de 10 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno, pero también se prevé 10 x 1 mm. Preferentemente el cartucho resistirá la presión típica del sistema de HPLC (máx. 400 bar). Un cartucho puede marcarse con un código que representa la marca, el tipo y el lote de una resina de SPE. Adicionalmente, los cartuchos pueden suministrarse en placas multi-posición (por ejemplo 96) que se colocan directamente en el sistema de HPLC (por ejemplo el Sistema Symbiosis™/Prospekt-2) para procesamiento, evitando de esta manera la

35 necesidad de tocar un cartucho. Típicamente, cada bandeja contiene un sitio de referencia que transmite información sobre el tipo de cartucho, número de lote, número producción (único), y/o fecha de caducidad, etc. al sistema de HPLC. Esta información se muestra en la pantalla del PC y se adjunta al informe del análisis. Después del uso, el sistema de HPLC transmite los datos al chip sobre las posiciones usadas/no usadas. Las bandejas parcialmente usadas pueden almacenarse entonces de forma segura sin marcar o retirar los cartuchos usados.

40 Se proporciona también un aparato que comprende una columna de cromatografía de acuerdo con la invención en comunicación fluida con un sistema analítico. El aparato por ejemplo comprende un sistema de extracción en fase sólida (SPE) integrado con un sistema de cromatografía líquida (LC). El aparato adicionalmente puede comprender un detector, tal como un espectrómetro de masas (en tándem) o un detector de fluorescencia. Por consiguiente, se

45 proporciona también un método analítico para analizar una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con una resina de acuerdo con la invención. Un aspecto adicional se refiere al uso de una resina proporcionada en este documento en un método analítico para analizar una muestra de ensayo. El método implica extracción en fase sólida (SPE), preferentemente SPE en línea, usando la resina. En vista de que la resina es compatible con tampones volátiles, el método puede incluir detección por espectroscopía de masas (MS) de al

50 menos un analito en la muestra.

Un aparato o método analítico de la invención es atractivo para su uso en diversas áreas, incluyendo farmacia y desarrollo de fármacos. Un desarrollo de fármacos eficaz rápidamente aumenta el número de candidatos a fármaco y por lo tanto el número de muestras. LC-MS se ha convertido en una herramienta predominante para bioanálisis

55 debido a su aplicabilidad universal y gran ayuda en automatización de laboratorio. Las técnicas de preparación de muestras tradicionales no evolucionaron equitativamente, lo que ha dificultado la racionalización de la organización en laboratorio. El uso de una resina de la invención en extracción de (inmuno)afinidad en línea totalmente integrada con LC (XLC) permite la inyección directa de muestras biológicas en bruto sin filtración previa, precipitación de proteína y centrifugación.

60 La invención se ejemplifica en los Ejemplos a continuación.
 Los ejemplos describen la preparación de un soporte en fase sólida hidrófilo rígido (resina cromatográfica) que después puede activarse para permitir el acoplamiento covalente de ligandos de interés en condiciones fisiológicas y usarse para el fin de cromatografía de (inmuno)afinidad en combinación con otros modos de cromatografía seguido de detección MS.

65

Este soporte en fase sólida hidrófilo rígido comprende el soporte base del núcleo X (X = un soporte en fase sólida rígido, basado en polímeros orgánicos [de acuerdo con la presente invención] e inorgánicos [solo referencia], tales como poliacrilamida, poliacrilato, polimetacrilato, polivinilo y/o polímeros de poliestireno y derivados de los mismos, sílice, alúmina y/o zirconia y derivados de los mismos, que se hacen reaccionar con Z (Z es por ejemplo -NH₂, -OH, -epoxi, -C(H)=O, -C(H)=C(H)₂, mediante compuestos químicos de activación correspondientes complementarias tales como compuestos químicos reactivos con amina tales como NHS (N-hidroxisuccinimida ésteres)-, CDI-(carbonil diimidazol)- y/o EDC- (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), aminación reductora introduciendo restos -CHO-, FMP- (tolueno-4-sulfonato de 2-fluoro-1-metilpiridinio), activación con cloruro de Tresilo y/o Tosilo respectivamente compuestos químicos reactivos con hidroxilo tal como activación epoxi y compuesto químicos reactivos por polimerización, tales como grupos vinilo mediante el uso de monómeros de derivados de acrilato y/o metacrilato y permitiendo la funcionalización del soporte de base de núcleo rígido con un compuesto hidrófilo.

Mediante compuestos de acoplamiento con abundantes grupos hidrófilos, por ejemplo hidroxilo o carboxilo, sobre la superficie de los soportes, no solo se potencia significativamente la hidrofilia del soporte en fase sólida (por ejemplo mejora del comportamiento no selectivo), sino que una gran diversidad de compuestos químicos están disponibles entonces para permitir el acoplamiento de ligandos en condiciones fisiológicas. Por esta razón, una diversidad de recubrimientos químicos se ensayaron y examinaron respecto a su mejora de las características de adsorción no selectiva. A continuación, se ensayó una diversidad de compuestos químicos de activación (con o sin la aplicación de un espaciador) para permitir el acoplamiento químico de ligandos de interés en condiciones fisiológicas analizando la capacidad del soporte en fase sólida funcionalizado para el analito diana. A continuación, la compatibilidad MS se investigó usando soluciones tampón tanto convencionales como una diversidad de soluciones tampón volátiles durante el uso combinado de SPE de inmunoespecificidad, cromatografía líquida a alta presión seguido de detección MS.

25 EJEMPLO 1: MEJORA DE LA NO SELECTIVIDAD

Par mejorar la no selectividad de un soporte en fase sólida, una diversidad de compuestos hidrófilos se acoplaron químicamente sobre varios soportes, usando una diversidad de compuestos químicos de activación:

30 A. Polímeros inorgánicos (Solo referencia)

A.1. Sílice mediante activación con NH₂:

35 A.1.1. Activación del soporte en fase sólida

Se lavó 1 gramo de sílice respectivamente con HCl 0,05 M, agua (3 veces) y tolueno con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotavapor al vacío. La sílice se silanizó con 1 ml de 3-aminopropiltrimetoxisilano en 10 ml de tolueno por agitación en un rotavapor durante 24 horas a temperatura ambiente. La sílice silanizada se lava con 3x20 ml de tolueno y éter y se seca durante 4 horas a 120 °C.

40 A.1.2. Acoplamiento de los compuestos hidrófilos

Los siguientes compuestos hidrófilos se usaron para acoplar:

- 45 a. Polietilenglicol 200 (PEG 200) (Ejemplo comparativo)
- b. Maltosa (360 Dalton) (de acuerdo con la invención)
- c. Dextrano (10.000 Dalton) (Ejemplo comparativo)

Antes del acoplamiento, los compuestos hidrófilos se activaron mediante N,N'-carbonil diimidazol (CDI) (0,05 mM - compuesto hidrófilo 2,5 mM más CDI 2,5 mM en 2,5 ml de acetona seca, se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente), tolueno-4-sulfonato de 2-fluoro-1-metilpiridinio (FMP) (compuestos hidrófilos 0,05 mM - 2,5 mM más 5 ml de FMP 0,35 mM en DMSO, que contenía trietilamina al 1%, se agitó durante 15 minutos), N,N'-disuccinimidilcarbonato (NHS) (compuestos hidrófilos 0,05 - 2,5 mM más NHS 0,3 mM en 1 ml de DMSO y se añadió con agitación vigorosa a 5 ml de trietilamina al 7,5% en piridina seca y se agitó durante 1 hora más a temperatura ambiente) o cloruro de Tresilo (compuesto hidrófilo 0,05 - 2,5 mM en 5 ml de DMSO y se añadió con agitación vigorosa 1 ml de una mezcla de cloruro de tresilo / piridina / DMSO 1:10:89 y se agitó 15 minutos a temperatura ambiente).

El acoplamiento de los compuestos hidrófilos activados individuales al soporte silanizado de aminopropilo se realizó de la siguiente manera:

- a. compuestos activados con CDI: agitación durante 16 horas a temperatura ambiente;
- b. compuestos activados con FMP: agitación durante 16 horas a temperatura ambiente en 10 ml de tampón fosfato 0,2 M a pH 7,0;
- 65 c. compuestos activados con NHS: agitación durante 16 horas a temperatura ambiente en 3 ml de DMSO;
- d. compuestos activados con cloruro de Tresilo: agitación durante 16 horas a temperatura ambiente en 5 ml de

tampón fosfato 0,2 M a pH 7,0.

A.2. Sílice mediante activación con epóxidos:

5 A.2.1. Activación del soporte en fase sólida

Se lavó 1 gramo de sílice respectivamente con HCl 0,05 M, agua (3 veces) y tolueno por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotavapor a vacío. La sílice se silanizó con 3 ml de γ -glicidoxipropiltrimetoxisilano en 10 ml de tolueno por agitación en un rotavapor durante 24 horas a temperatura ambiente. La sílice silanizada se lavó con tolueno, éter y dioxano.

A.2.2. Acoplamiento de los compuestos hidrófilos

Se usaron los siguientes compuestos hidrófilos para acoplar:

- a. Maltosa (360 Dalton) (de acuerdo con la invención)
- b. Dextrano (10.000 Dalton) (Ejemplo comparativo)

Debido al hecho de que los grupos epoxi reaccionan directamente con los grupos hidroxilo, no fue necesaria activación adicional. El acoplamiento de los compuestos hidrófilos individuales al soporte silanizado con glicidoxipropilo se produjo añadiendo 0,05-2,5 mM de compuesto hidrófilo a 1 gramo de soporte silanizado con glicidoxipropileno 5 ml de dioxano seco, que contenía 100 μ l de éterato de BF_3 . La reacción se dejó transcurrir durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

25 A.3. Sílice mediante activación con metacrilato:

A.3.1. Activación del soporte en fase sólida

Se lavó 1 gramo de sílice respectivamente con HCl 0,05, agua (3 veces) y tolueno por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotavapor a vacío. La sílice se silanizó con 9 ml de γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano en 10 ml de tolueno por agitación en un rotavapor durante 24 horas a temperatura ambiente. La sílice silanizada se lavó con tolueno, éter y dimetilformamida.

A.3.2. Acoplamiento de los compuestos hidrófilos

Los siguientes compuestos hidrófilos se usaron para acoplar:

- a. Dextrano metacrilatado (Dextrano-MA) (16.000 Dalton, donde 13 de cada 100 moléculas de azúcar contienen un grupo metacrilato) (Ejemplo comparativo)
- a. N-(hidroximetil)acrilamida (HM-MA)
- b. 3-aliloxi-1,2-propanodiol (DP-MA)
- c. N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida (TRIS-MA)
- d. Metilacrilato (MA)

El acoplamiento se realizó añadiendo respectivamente 0,6 gramos de HM-MA, DP-MA o Tris-MA en 5 ml de etanol respectivamente 12 ml de dextrano activado con metacrilato al 5% p/p en DMSO a 1 gramo de sílice silanizada con metacrilato. La reacción se dejó transcurrir durante una noche a 75 °C en presencia de 15 mg de α,α' -azoisobutironitrilo. Después del acoplamiento de MA, el éster se saponificó por agitación en HCl 1 N en ebullición en agua durante 4 horas.

50 B. Polímeros orgánicos

B.1. Polímero de clorometil estireno

55 Para estos experimentos se usó un polímero de clorometil estireno, preparado por polimerización en dispersión de 4-clorometil estireno en etanol.

B.1.1. Acoplamiento de los compuestos hidrófilos

60 Debido al hecho de que el grupo clorometilo reacciona directamente con las aminas primarias, no fue necesaria activación. El grupo clorometilo del soporte en fase sólida se hizo reaccionar con etanolamina en agua durante la agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, seguido de 2 horas a 50 °C.

B.2. Copolímero de hidroximetil estireno (Solo referencia)

5 El soporte en fase sólida de copolímero de un polímero de hidroximetil estireno se preparó por polimerización en dispersión en etanol de los monómeros hidroximetil-metacrilamida y estireno. Este soporte en fase sólida se ensayó directamente para su no selectividad.

B.3. Copolímero de glicidil estireno

10 El soporte en fase sólida de copolímero de copolímero de glicidil estireno se preparó por polimerización en dispersión en etanol de los monómeros glicidilmetacrilato y estireno.

B.3.1. Acoplamiento de los compuestos hidrófilos

15 Se usaron los siguientes compuestos hidrófilos para el acoplamiento:

- e. Agua
- f. Dextrano (10.000 Dalton) (ejemplo comparativo)

20 Debido al hecho de que el grupo epoxi del monómero de glicidilo reacciona directamente con los grupos hidroxilo, no fue necesaria activación adicional. El acoplamiento de los compuestos hidrófilos individuales se produjo añadiendo 0,5 mM de compuesto hidrófilo a 1 gramo de soporte en fase sólida en 10 ml de tampón borato 0,1 M a pH 13,0. La reacción se dejó transcurrir durante 3 días horas a temperatura ambiente.

B.4. Copolímero de metacrilato de hidroxietilo

25

B.4.1. Copolímero de metacrilato de hidroxietilo simple

Este soporte en fase sólida se ensayó directamente para su no selectividad sin modificaciones adicionales.

B.4.2. Modificación con glicidol

30

El soporte en fase sólida se hizo reaccionar con glicidol añadiendo 1 gramo de glicidol a 1 gramo de fase estacionaria, que se suspendió en 5 ml de hidróxido sódico 1 N, que contenía 100 mg de NaBH₄. La mezcla se dejó reaccionar durante una noche a temperatura ambiente. Este soporte en fase sólida se ensayó directamente para su no selectividad sin modificaciones adicionales.

35

B.4.3. Activación del soporte en fase sólida con CDI

40 Se activó 1 gramo de soporte añadiendo 0,4 gramos de CDI, disuelto en 5 ml de acetona seca. La reacción se dejó reaccionar durante 90 minutos a temperatura ambiente.

B.4.4. Acoplamiento del compuesto hidrófilo

45 El soporte activado obtenido en B.4.3 se hace reaccionar con 3-aminopropanodiol (Amino-DP) (compuesto hidrófilo) añadiendo 1 ml del compuesto hidrófilo en 5 ml de DMSO a 1 gramo de soporte activado. La reacción se dejó reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

50 La no selectividad de los soportes obtenidos se ensayó mediante ensayos de adsorción estáticos de soluciones que contenían cantidades pequeñas de nortestosterona (NOR) (500 ng/ml en agua). El sobrenadante se analizó por HPLC respecto al contenido de nortestosterona. Los resultados se dan en la Tabla 1.

55 Los resultados del experimento A.1. muestran que, para mejorar la no selectividad del soporte en fase sólida, una modificación de la superficie con compuestos hidrófilos no poliméricos pequeños que tienen abundantes grupos hidroxilo disminuye significativamente la no selectividad, mientras que la modificación con polímeros hidrófilos tales como PEG y dextrano, aún demuestra adsorción no específica inaceptable de compuestos apolares pequeños, tales como nortestosterona. Adicionalmente, el acoplamiento de compuestos hidrófilos mediante carbonil diimidazol demostró los mejores rendimientos de acoplamiento. Este compuesto químico de activación generalmente da lugar a un acoplamiento estable sin añadir funcionalidades adicionales, que pueden influir en las propiedades (entre ellas la polaridad) del soporte.

60

A partir de los resultados del experimento A.2. y A.3. puede concluirse que la activación del soporte en fase sólida mediante grupos epoxi, respectivamente grupos metacrilato, en general mejora el rendimiento de acoplamiento de los compuestos hidrófilos que contienen (abundantes) grupos hidroxilo, respectivamente grupos metacrilato.

65 A partir de los resultados del experimento B1, B2 y B3 puede concluirse que, también para estos soportes en fase sólida se obtienen buenos resultados cuando se acoplan compuestos pequeños con abundantes grupos hidroxilo. Lo

mismo es cierto cuando se usa metacrilato de hidroxietilo como soporte en fase sólida. En este caso se obtienen buenos resultados cuando el soporte en fase sólida se modifica directamente mediante un compuesto hidrófilo activado con epoxi y/o la activación del soporte en fase sólida mediante CDI y acoplamiento de compuestos hidrófilos pequeños.

5 En conclusión, el acoplamiento químico de componentes hidrófilos pequeños mejora significativamente la no selectividad de soportes en fase sólida.

Tabla 1: No selectividad de diversos soportes preparados en el Ejemplo 1

Soporte	Soporte Activado	Compuesto Hidrófilo	Compuesto Hidrófilo Activado	No selectividad (% de recuperación)
Experimento A.1.				
Sílice	-	-	-	31 *
Sílice	-NH ₂	Ninguno	No	31 *
Sílice	-NH ₂	PEG200	CDI	55 *
Sílice	-NH ₂	PEG200	FMP	53 *
Sílice	-NH ₂	PEG200	NHS	pegajoso *
Sílice	-NH ₂	PEG200	Cloruro de Tresilo	30 *
Sílice	-NH ₂	Maltosa	CDI	65 *
Sílice	-NH ₂	Maltosa	FMP	42 *
Sílice	-NH ₂	Maltosa	NHS	37 *
Sílice	-NH ₂	Maltosa	Cloruro de Tresilo	49 *
Sílice	-NH ₂	Dextrano	CDI	56 *
Sílice	-NH ₂	Dextrano	FMP	56 *
Sílice	-NH ₂	Dextrano	NHS	42 *
Sílice	-NH ₂	Dextrano	Cloruro de Tresilo	40 *
Experimento A.2.				
Sílice	Epoxi	Maltosa	Hidroxi	91 *
Sílice	Epoxi	Dextrano	Hidroxi	85 *
Experimento A.3.				
Sílice	Metacrilo	Dextrano	Metacrilo	53 *
Sílice	Metacrilo	HM-MA	Metacrilo	83 *
Sílice	Metacrilo	DP-MA	Metacrilo	94 *
Sílice	Metacrilo	Tris-MA	Metacrilo	90 *
Sílice	Metacrilo	MA	Metacrilo	>99 *
Experimento B.1.				
Estireno	-	-	-	20 *
Estireno	Clorometilo	Etanolamina	-NH ₂	91 *
Experimento B.2.				
OHMe-Estireno	-	-	-	79 *
Experimento B.3.				
Estireno	Epoxi	Agua	Hidroxi	100
Estireno	Epoxi	Dextrano	Hidroxi	90 *
Experimento B.4.				
HEMA	-	-	-	32 *
HEMA	-	Glicidol	Epoxi	95 *
HEMA	CDI	Amino-DP	-NH ₂	94 *
*Solo referencia				

10 EJEMPLO 2 (SOLO PARA REFERENCIA): EFECTO DEL RETICULANTE SOBRE LA NO SELECTIVIDAD

Para examinar el efecto del reticulante, durante la preparación del soporte en fase sólida de copolímero de hidroximetil estireno (véase el Ejemplo 1, B.2.) mediante polimerización en dispersión, se usó el reticulante de

dimetacrilato de etileno, respectivamente dimetacrilato de etilenglicol. Ambos soportes en fase sólida se investigaron por su no selectividad como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 (solo para referencia): Efecto del reticulante sobre la no selectividad

Reticulante	Adsorción no selectiva (% de recuperación)
dimetacrilato de etileno	30%
dimetacrilato de etilenglicol	95%

5 Como puede verse a partir de estos resultados, la aplicación de reticulantes hidrófilos mejora significativamente las características de adsorción no selectiva de los soportes en fase sólida.

10 EJEMPLO 3 (SOLO PARA REFERENCIA): EFECTO DEL ESPACIADOR SOBRE CAPACIDAD DEL SOPORTE DE AFINIDAD

Aparte del compuesto químico de activación, el uso de un espaciador puede ser crucial para la interacción exitosa entre un ligando y el analito diana (en este caso un anticuerpo).

15 Específicamente con soportes rígidos, una molécula espaciadora puede proporcionar mayor flexibilidad y permitir que el ligando inmovilizado se mueva a su posición para establecer la orientación de unión correcta. Sin embargo, debe tenerse cuidado respecto a la introducción de sitios apolares y, como resultado, un aumento en la adsorción no selectiva. Se prefieren los espaciadores hidrófilos. Adicionalmente, debe tenerse cuidado con respecto a la
20 protección terminal de las moléculas espaciadoras que no han reaccionado; si el ligando contiene las mismas funcionalidades, la selectividad y/o capacidad del soporte de (inmuno)afinidad podría verse alterada.

C.1. Copolímero de metacrilato de hidroxietilo

25 C.1.1. Activación de CDI

Se activó 1 gramo de soporte añadiendo 0,4 gramos de CDI, disuelto en 5 ml de acetona seca. La mezcla se dejó reaccionar durante 90 minutos a temperatura ambiente.

30 C.1.2. Activación por aminación reductora

El soporte en fase sólida se hizo reaccionar con glicidol añadiendo 1 gramo de glicidol a 1 gramo de fase estacionaria, que se suspendió en 5 ml de hidróxido sódico 1 N, que contenía 100 mg de NaBH₄. La mezcla se dejó reaccionar durante una noche a temperatura ambiente. Después del acoplamiento el soporte se lavó con agua, NaCl
35 1 M y agua. Se forman grupos aldehído haciendo reaccionar el soporte obtenido de esta manera con 20 ml de NaIO₄ 0,2 M durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de la reacción, el polímero activado se lava con un exceso de agua.

40 C.1.3. Acoplamiento del espaciador

Se introdujo un espaciador por acoplamiento de diaminodipropilamina (DADPA) haciendo reaccionar 2 gramos de DADPA, disueltos en 5 ml de acetona seca con 1 gramo de material activado obtenido en el apartado C.1.1. por la agitación durante una noche a temperatura ambiente.

45 C.1.4. Acoplamiento de ligandos

a. Activación con CDI - sin espaciador

50 Hacia el soporte activado obtenido en el apartado C.1.1. 20 mg de Proteína A se disolvieron en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M frío a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl. La reacción se dejó transcurrir durante 4 horas a temperatura ambiente.

b. Activación de CDI - espaciador

55 El soporte obtenido en C.1.3. se hizo reaccionar con 2 gramos de anhídrido succínico en 20 ml de agua durante una noche a temperatura ambiente. Después del lavado con, sucesivamente, un exceso de agua, NaCl 1 M, agua, acetona seca y dioxano seco, el soporte se suspendió en 5 ml de dioxano seco que contenía 0,4 gramos de CDI y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado con acetona seca, se añadieron 20 mg de Proteína A, disuelta en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M frío a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl al soporte activado.
60 La reacción se dejó transcurrir durante 4 horas a temperatura ambiente.

c. Aminación reductora - sin espaciador

Hacia el soporte obtenido en C.1.2., se disolvieron 20 mg de Proteína A en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl y 320 mg de NaCNBH₃. La reacción se dejó transcurrir durante una noche a temperatura ambiente.

d. Aminación reductora - espaciador

El soporte obtenido en C.1.3. se hizo reaccionar con glicidol añadiendo 1 gramo de glicidol a 1 gramo de fase estacionaria, que se suspendió en 5 ml de hidróxido sódico 1 N, que contenía 100 mg de NaBH₄. La reacción se dejó transcurrir durante una noche a temperatura ambiente. Después del acoplamiento, el soporte se lavó con agua, NaCl 1 M y agua. Los grupos aldehído se forman haciendo reaccionar el soporte obtenido de esta manera con 20 ml de NaIO₄ 0,2 M durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de la reacción, el polímero activado se lavó con un exceso de agua. Después del lavado con tampón fosfato 0,1 M a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl, entonces se añadieron 20 mg de Proteína A, disuelta en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl y 320 mg de NaCNBH₃ al soporte activado. La reacción se dejó transcurrir durante una noche a temperatura ambiente.

Los soportes de afinidad obtenidos de esta manera se ensayan para su capacidad de capturar IgG humana en condiciones fisiológicas. Para este fin, se realizaron ensayos de adsorción estáticos con soluciones que contenían 1 mg/ml de IgG humana en tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, que contenía 150 mM de NaCl. El sobrenadante se analizó respecto al contenido de IgG humana a UV-VIS 280 nm después de 4 horas de agitación a temperatura ambiente. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 (solo para referencia): Efecto del espaciador sobre la capacidad del soporte

Procedimiento de activación	Espaciador	Capacidad mg de hlgG por g de soporte
Carbonil Diimidazol	Sin espaciador	24
	Con un espaciador de nueve átomos	47
Aminación reductora	Sin espaciador	34
	Con un espaciador de nueve átomos	34

Estos resultados muestran que el uso de un espaciador es particularmente ventajoso cuando se usa activación por CDI.

EJEMPLO 4 (SOLO PARA REFERENCIA): CAPACIDAD DE LOS SOPORTES DE INMUNOAFINIDAD CON DIVERSOS LIGANDOS EN COMPARACIÓN CON RESINAS DISPONIBLES EN EL MERCADO

Para examinar la aplicabilidad del soporte activado, una diversidad de ligandos se acoplaron covalentemente y se ensayaron para su capacidad. Los resultados se compararon con los obtenidos cuando los ligandos se acoplaron a una resina disponible en el mercado usando un compuesto químico de activación similar.

Para estos experimentos, se acoplaron anticuerpos contra vitamina B 12, lactoferrina, aflatoxina B2 o aldosterona con resinas activadas por aminación reductora. Por esta razón, se usó una resina activada por aminación reductora disponible en el mercado y la resina producida en el apartado C.1.4.C. El acoplamiento de anticuerpos se realizó disolviendo 5-10 nmol de anticuerpo en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl y 320 mg de NaCNBH₃. Esta solución se dejó reaccionar con 1 gramo de soporte activado durante una noche a temperatura ambiente. Las resinas de inmunofinidad funcionalizadas obtenidas de esta manera se ensayaron para su capacidad dinámica a 1 ml/min, aplicando de esta manera soluciones patrón de los antígenos correspondientes y midiendo la penetración mediante HPLC. Los resultados de estos experimentos se demuestran en la Tabla 4.

Tabla 4 (Solo para referencia): Capacidades de absorción de diversos soportes de inmunofinidad en comparación con los obtenidos con un soporte disponible en el mercado

Ligando	Capacidad de analito diana por gramo de soporte C.1.4.c. (Ej. 3)	Capacidad de analito diana por gramo de soporte comercial
Anti-vitamina B 12	800 ng	1000 ng
Anti-lactoferrina	60 µg	70 µg
Anti-afloxina B2	620 ng	520 ng
Anti-aldosterona	310 ng	200 ng

Como puede verse, la resina de afinidad de la invención demuestra capacidades comparables para los diversos analitos ensayados.

EJEMPLO 5 (SOLO PARA REFERENCIA): EFECTO DE LOS TAMPONES SOBRE LA COMPATIBILIDAD MS Y LA CAPACIDAD IAC

5 La carga de columnas de inmunofinidad en general se realiza con una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Sin embargo, estos tampones no son compatibles con MS. Para investigar si los tampones compatibles o no con MS (tampones volátiles tales como tampones basados en formiato, acetato y carbonato) afectan al rendimiento de los soportes en fase sólida de inmunofinidad, se ensayaron varias resinas de inmunofinidad respecto a su capacidad cuando se usa el tampón tradicional y tampones compatibles con MS. Para ello, se acoplaron anticuerpos contra aldosterona, respectivamente acrilamida, a una resina activada por aminación reductora (C.I.4.C.). El acoplamiento de anticuerpos se realizó disolviendo 5-10 ml de anticuerpo en 5 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7, que contenía 150 mM de NaCl y 320 mg de NaCNBH₃ y esta solución a 1 gramo de soporte activado. La reacción se dejó transcurrir durante una noche a temperatura ambiente.

15 Los soportes de inmunofinidad obtenidos de esta manera se ensayaron para su capacidad dinámica a 1 ml/min, aplicando de esta manera soluciones patrón de la absorción del antígeno correspondiente y midiendo la penetración y elución del analito capturado mediante HPLC, usando de esta manera las soluciones tampón mencionadas en la tabla 5. Adicionalmente, las mediciones de supresión de iones se realizaron para las diversas soluciones tampón investigadas reemplazando el detector de UV-VIS por un detector de MS.

20 Tabla 5. Efecto de la composición de la solución tampón sobre la capacidad del soporte de inmunofinidad

Carga del tampón	Capacidad del analito diana por g de soporte	Detector de MS de supresión de ión
Tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,0 + NaCl 150 mM	440 ng de aldosterona respectivamente 500 ng de acrilamida	No fue posible realizar mediciones debido a la supresión de ión
formiato de amonio 100 mM, pH 7,0	460 ng de aldosterona	No hubo supresión de ión detectable
acetato de amonio 100 mM, pH 7,0	450 ng de aldosterona	No hubo supresión de ión detectable
carbonato de amonio 10 mM, pH 7,0	560 ng de acrilamida	No medido

25 A partir de estos resultados, puede concluirse que para estas resinas de inmunofinidad no se observó efecto sobre la capacidad cuando se reemplazó la solución tampón tradicional por una solución tampón volátil. La aplicación de las soluciones tampón volátiles claramente mejoró la supresión de ión del detector de MS.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una resina cromatográfica adecuada para su uso en cromatografía de afinidad a alta presión, comprendiendo la resina un polímero orgánico rígido y teniendo la resina una superficie hidrófila, **caracterizada por que** la superficie hidrófila está formada por una multiplicidad de compuestos hidrófilos no polímeros pequeños unidos covalentemente que tienen un peso molecular menor de 1000 Dalton y en la que la resina no contiene un recubrimiento hidrófilo por una estructura polimérica.
- 10 2. La resina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el peso molecular de los compuestos hidrófilos no poliméricos es menor de 500 Dalton.
3. La resina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el compuesto hidrófilo no polimérico tiene 1-10 átomos de C.
- 15 4. La resina de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el compuesto hidrófilo pequeño es de fórmula general $C_nH_m(Y)_k$, en la que
 n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 2 a 8,
 $m \leq 2n$
 $k \leq 3n$, e
 20 Y es un resto hidrófilo, preferentemente -OH o -COOH.
- 25 5. La resina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto hidrófilo no polimérico se selecciona del grupo que consiste etanolamina, 3-amino-1,2-propanodiol, N-(hidroximetil)acrilamida, 3-aliloxi-1,2-propanodiol, N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida y glicidol.
- 30 6. La resina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polimérico orgánico se selecciona del grupo que consiste en poli(acrilamidas, poli(acrilatos, poli(metacrilatos, poli(vinilo y poli(estireno.
7. La resina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más ligandos fijados al polímero orgánico rígido mediante dicho al menos un compuesto hidrófilo no polimérico, preferentemente en la que dicho ligando es una molécula biológica o sintética, preferentemente una proteína o péptido, tal como un anticuerpo.
- 35 8. Un método para proporcionar una resina cromatográfica como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método la etapa de formar una superficie hidrófila no polimérica haciendo reaccionar un polímero orgánico rígido con al menos un compuesto hidrófilo no polimérico que tiene un peso molecular menor de 1000 Dalton.
- 40 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende, antes de hacer reaccionar con el al menos un compuesto hidrófilo, una etapa de activar de dicho polímero, dicho compuesto hidrófilo o tanto el polímero como el compuesto hidrófilo, para mejorar la reactividad entre dicho polímero y dicho al menos un compuesto hidrófilo.
- 45 10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha activación comprende proporcionar el polímero y/o el compuesto hidrófilo con uno o más grupos reactivos, seleccionados preferentemente del grupo que consiste en -NH₂, -OH y -CH=CH₂.
- 50 11. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende además la etapa de hacer reaccionar dicha resina cromatográfica que tiene una superficie hidrófila con al menos un ligando para permitir una fijación covalente de dicho al menos un ligando a la resina mediante dicho al menos un compuesto hidrófilo no polimérico.
- 55 12. Una columna cromatográfica que comprende una resina como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. Un aparato que comprende una columna cromatográfica como se ha definido en la reivindicación 12 en comunicación fluida con un sistema analítico, preferentemente en el que dicho aparato comprende un sistema de extracción en fase sólida (SPE) integrado con un sistema de cromatografía líquida (LC), preferentemente un sistema de cromatografía líquida a alta presión (HPLC).
- 60 14. Aparato de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho sistema analítico comprende además un espectrómetro de masas.
- 65 15. Uso de una resina como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un método analítico para analizar una muestra de ensayo que comprende extracción en fase sólida, preferentemente en el que el método comprende detección por espectroscopia de masas (MS) de al menos un analito en la muestra.