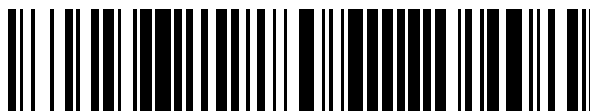


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 877**

51 Int. Cl.:

C03C 11/00 (2006.01)
C03C 17/32 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C08F 8/30 (2006.01)
C08F 8/32 (2006.01)
C09D 125/18 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/552 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2008 PCT/US2008/007840**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09005631**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2008 E 08779740 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2170776**

54 Título: **Método para preparar una partícula de vidrio de porosidad controlada recubierta con polímero**

30 Prioridad:

28.06.2007 US 937611 P
09.11.2007 US 986639 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2019

73 Titular/es:

PRIME SYNTHESIS, INC. (100.0%)
2 New Road, Suite 126
Aston, PA 19014, US

72 Inventor/es:

ROTHSTEIN, MARC, L.;
ROTHSTIEN, DIANNE, M. y
LEE, DAN, P.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 709 877 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

Método para preparar una partícula de vidrio de porosidad controlada recubierta con polímero

5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere en general a soportes sólidos para síntesis química en fase sólida.

10 El uso de una variedad de soportes sólidos se ha descrito para uso en la síntesis de oligonucleótidos.

Actualmente, las partículas de vidrio de porosidad controlada (CPG) se usan en la síntesis de oligonucleótidos a gran escala. Sin embargo, estas partículas tienen capacidades limitadas para la carga y la longitud del nucleósido. Más particularmente, los niveles de carga química para el vidrio están limitados a concentraciones de silanol "nativas" en la superficie del vidrio. Para el vidrio, hay una cantidad fija de grupos de silanol por unidad de área superficial. El área superficial es inversamente proporcional al tamaño de poro. Por lo tanto, aunque los tamaños de poros altos son favorables desde el punto de vista de la síntesis, tales CPG tienen una capacidad de carga baja en comparación con un soporte polimérico.

20 Por lo tanto, se han usado soportes poliméricos para la síntesis de oligonucleósidos, que incluyen, por ejemplo, partículas basadas en poliestireno. El uso de partículas de poliestireno de bajo entrecruzamiento ha sido descrito para la síntesis de polipéptidos. Estos no aceptan la síntesis de oligonucleótidos de alto rendimiento, debido a su alto grado de hinchamiento en los disolventes de síntesis. Se han usado partículas altamente entrecruzadas para la síntesis a gran escala. Aunque este tipo de soporte sólido se hincha mucho menos, tiene una capacidad limitada de carga de nucleósidos y es compresible.

25 Para resolver estos problemas, se ha utilizado poliestireno de entrecruzamiento intermedio para lograr mayores capacidades de carga. Estos soportes se hinchan considerablemente y, por lo tanto, el rendimiento volumétrico general se ve comprometido. Además, la compresibilidad es mayor que la del poliestireno más entrecruzado. El documento US4732887 A divulga la polimerización de diversos monómeros dentro de sílice porosa y vidrio poroso, incluyendo estireno, cloruro de vinilbencilo (= clorometilestireno) y ácido acrílico y agentes de entrecruzamiento con dos o más enlaces C=C insaturados. En consecuencia, se emplean disolventes y agentes de lavado.

30 El documento WO9727150 A1 describe vidrio poroso recubierto con un polímero, adecuado para la síntesis química en fase sólida, por ejemplo, metacrilato de polimetilo o poliestireno. La polimerización en el interior del vidrio poroso no se divulga.

35 M. Wisniewska, S. Chibowski, T. Urban: "The temperature influence on the adsorption and electrokinetical properties in the nonionic polymer/controlled porosity glass (CPG) system"; Materials Chemistry and Physics, vol. 103, mayo de 2007, páginas 216-221, describen recubrimientos de alcohol polivinílico y polietilenglicol sobre vidrio poroso, adecuados para síntesis química en fase sólida. Se usó alcohol polivinílico tal cual, no se polimerizó sobre la superficie del vidrio poroso.

40 El documento US5141813 A describe la síntesis de oligonucleótidos sobre soportes de vidrio porosos que pueden modificarse utilizando poliestireno. No se enseña el método sobre cómo se llega a la modificación del poliestireno.

45 Lo que se necesita son soportes sólidos adicionales para la síntesis en fase sólida.

Resumen de la invención

50 La invención implica partículas recubiertas para la síntesis química en fase sólida, teniendo cada partícula un núcleo y un recubrimiento polimérico de conformación sobre dicho núcleo.

55 En un aspecto, la invención proporciona un método para preparar una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG) recubierta con polímero, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) enfriar partículas de CPG que tienen poros con un diámetro promedio medio de 75 a 4.000 Angstroms (7,5 a 400 nm) a una temperatura aproximadamente inferior a 10°C; (b) mezclar las partículas de CPG enfriadas y una solución fría que comprende un polímero que forma un compuesto de recubrimiento y un primer disolvente, caracterizado porque el polímero formador del compuesto de recubrimiento se selecciona del grupo que consiste en un cloruro de vinilbencilo, acrílicos, estireno, alcohol vinílico, polímeros de los mismos, y mezclas de los mismos; (c) combinar la mezcla y un agente de entrecruzamiento en una solución que comprende un segundo disolvente, mientras se mantienen las partículas de CPG a una temperatura aproximadamente inferior a 10°C; (d) eliminar rápidamente el primer disolvente, mientras se mantiene la mezcla de CPG a una temperatura aproximadamente inferior a 10°C; (e) calentar la mezcla de CPG a una temperatura de aproximadamente 38 a aproximadamente 65°C bajo un gas inerte, para permitir la formación de las partículas de CPG recubiertas que tienen un recubrimiento polimérico de conformación entrecruzado en el intervalo de aproximadamente 2 a 40% en el que las partículas de CPG recubiertas con polímero tienen un tamaño de poro promedio de al menos aproximadamente el 90% del tamaño de poro promedio de las partículas de CPG no recubiertas (a), basado en el

tamaño de poro seco; (f) enfriar las partículas recubiertas de CPG; (g) lavado de las partículas de CPG recubiertas y secado.

5 El núcleo es un vidrio de porosidad controlada que proporciona estabilidad mecánica a la partícula fabricada de acuerdo con la invención, evitando así el importante problema de compresión asociado con las perlas de poliestireno. El recubrimiento polimérico de conformación proporciona a la partícula recubierta una capacidad limitada para hincharse, lo que brinda mayores capacidades de carga que los soportes tradicionales a base de sílice sólida y sitios de unión de nucleósidos más efectivos.

10 En una realización, la partícula de CPG recubierta resultante se caracteriza por tener un tamaño de poro y un volumen de poro total dentro del 90% del tamaño de poro (con base en estado seco o no solvatado) y el volumen de poro total del sustrato de CPG.

15 La invención se puede utilizar para proporcionar un recipiente para la síntesis química en fase sólida, recipiente que comprende una pluralidad de partículas recubiertas fabricadas de acuerdo con la invención.

La invención hace posible un método para la síntesis en fase sólida de un ligando que comprende sintetizar los oligonucleótidos en una partícula recubierta fabricada de acuerdo con la invención.

20 Otros aspectos y ventajas de la invención serán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Descripción detallada de la invención

25 La invención proporciona un nuevo método para recubrir superficies de vidrio de porosidad controlada (CPG) para proporcionar una partícula de CPG recubierta con polímero útil para la síntesis química en fase sólida. La partícula de CPG recubierta con polímero resultante de la invención proporciona las ventajas de la rigidez y las características de estructura de poro/transmisión en solución de poros y supera la limitante de capacidad de carga del GPC nativo.

30 Los sustratos de vidrio de porosidad controlada (CPG) se pueden obtener de una variedad de fuentes comerciales que incluyen, por ejemplo, Prime Synthesis, Inc. y Millipore Corp. En una realización, los sustratos de CPG son partículas y pueden tener una forma irregular. Estas partículas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 500 micras, aproximadamente 25 a 300 micras, aproximadamente 75 a 125 micras. Sin embargo, las partículas más grandes o más pequeñas pueden ser seleccionadas por un experto en la técnica.

35 Adecuadamente, el sustrato de CPG que contiene poros con un diámetro promedio medio de 75 a 4.000 Angstroms, un diámetro promedio medio de 100 a 500 a 3000 Angstrom, un diámetro promedio medio de al menos 1.000 a 2.500 Angstroms, un diámetro promedio medio de 600 Angstroms a 900 Angstroms, o 700 Angstroms a 800 Angstroms.

40 La invención proporciona la fabricación de un sustrato de CPG con un recubrimiento polimérico que se hincha sin reducir significativamente el tamaño de los poros. Los grupos amino reactivos en el recubrimiento polimerizado proporcionan una mayor capacidad de carga en comparación con el CPG nativo. El recubrimiento polimérico se coloca en capas sobre la superficie del sustrato de CPG y es completamente de conformación, ya que recubre los poros pero no los bloquea. Ventajosamente, el método de la invención permite que el recubrimiento polimérico se deposite directamente sobre el CPG sin requerir el uso de un agente de acoplamiento de silano o un recubrimiento intermedio. Por ejemplo, un sustrato de CPG recubierto tiene un tamaño de poro promedio de al menos aproximadamente el 90% del tamaño de poro promedio del sustrato no recubierto (con base en el tamaño de poro seco). En otra realización, un sustrato de CPG recubierto tiene un tamaño de poro promedio de al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99%, del tamaño de poro promedio del sustrato no recubierto (con base en CPG seco).

El término "recubrimiento de conformación" se refiere a un recubrimiento que es una capa que se encuentra dentro de los poros de las superficies del sustrato de CPG y que no cambia la forma del artículo formado por el sustrato.

55 El material polimérico seleccionado para el recubrimiento exterior en el artículo es un material que contiene grupos funcionales útiles para cargar moléculas para la síntesis. En una realización, los grupos funcionales están presentes en el momento en que el recubrimiento externo se deposita en el núcleo. Sin embargo, los grupos funcionales pueden proporcionarse al recubrimiento externo después del depósito.

60 Por lo tanto, el recubrimiento polimérico está provisto de grupos funcionales tales como, por ejemplo, aldehídos, grupos amino, epoxi, haluros, ácido carboxílico, ésteres, o mezclas de los mismos. Los expertos en la técnica conocen los métodos para proporcionar estos grupos funcionales al material polimérico. En una realización, la invención proporciona la fabricación de una partícula recubierta que tiene grupos funcionales amino para uso en síntesis de oligonucleótidos y otras aplicaciones.

65

En una realización, el material polimérico es un poliestireno o un poli(vinilo), tal como poli(cloruro de vinilbencilo). En otra realización más, el recubrimiento polimérico puede prepararse a partir de un monómero polimerizable, por ejemplo, un acrílico, un poliestireno (neutro y con grupos funcionales), polietilenglicol o alcohol polivinílico, que se polimerizan durante o antes del recubrimiento.

Como se usa en el presente documento, los términos "estireno" y "vinilbenceno" son intercambiables. En una realización, el recubrimiento exterior es un poliestireno. Por ejemplo, el poliestireno se puede seleccionar entre poliestirenos que tienen entrecruzamiento alto, bajo o medio. El grado de entrecruzamiento del polímero puede variar de 2% a 40% de agente de entrecruzamiento, preferiblemente de aproximadamente 5 a 30%.

En una realización, se prepara un poliestireno entrecruzado a partir de una mezcla de un copolímero de estireno tal como monómero de estireno y divinilbenceno, y peróxido de benzoilo, que es el agente de entrecruzamiento. Se han producido realizaciones prácticas de la invención usando estos componentes para modificar la densidad. Ambos componentes tienen densidades que son menores a 1,02 g/cm³.

El poliestireno entrecruzado se puede preparar utilizando métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para la polimerización, una relación de divinilbenceno (DVB) con respecto a monómeros de estireno puede estar en la relación de aproximadamente 1 por ciento en peso de DVB a aproximadamente 100% en peso de monómeros de estireno. Sin embargo, otras relaciones adecuadas dentro de este intervalo pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica que incluye, por ejemplo, 1% en peso a 60% en peso, o 1% en peso a 45% en peso. En una realización, la relación de DVB con respecto a estireno de aproximadamente 1 a aproximadamente 8% en peso. Con base en el monómero o monómeros totales agregados para la polimerización, se agrega un diluyente o disolvente para los monómeros en una proporción en peso de aproximadamente 1 a aproximadamente 200, aproximadamente 5% a aproximadamente 150%, aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, aproximadamente 20% a aproximadamente 75%, aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, en peso de disolvente/diluyente con respecto al peso del monómero o monómeros.

En una realización, se usa un monómero de metacrilato, por ejemplo, un metacrilato de alquilo tal como metacrilato de metilo, para formar el material de recubrimiento. Por ejemplo, otros monómeros adecuados útiles para formar la capa de recubrimiento exterior son monómeros de vinilo tales como estirenos, acrilatos, metacrilatos y similares. También se pueden usar derivados de estos monómeros de metacrilato de alquilo, por ejemplo, acrilato de metilo, acrilato de butilo, metacrilato de metilo y derivados con grupos funcionales, por ejemplo, bromo estireno, clorometilbenceno, metacrilato de 2-aminoetilo y metacrilato de trimetilamonioetilo. El poliestireno entrecruzado se puede adquirir comercialmente, por ejemplo, a través de GE Healthcare y Nitto Denko. La inclusión de un porcentaje deseado de derivados con grupos funcionales elimina la etapa de proporcionar grupos funcionales después de que se haya completado la polimerización. Cuando el monómero elegido para agregarse en la fase dispersa tiene solo un grupo vinilo, es deseable incluir otro monómero que tenga más de un grupo vinilo para facilitar el entrecruzamiento. En una realización, la relación de varios monómeros se elige para proporcionar un polímero final entrecruzado en un grado de aproximadamente 5 a 30%. En otra realización más, el recubrimiento puede ser una poliamida.

El recubrimiento se proporciona deseablemente en una capa delgada y uniforme sobre la partícula de CPG. En una realización, el recubrimiento está presente en una cantidad de aproximadamente 2% p/p hasta aproximadamente 15% p/p, y más deseablemente, de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 10%, del peso total de la partícula recubierta. En una realización deseable, un recubrimiento del poli(cloruro de vinilbencilo) está presente en una cantidad de aproximadamente el 6% p/p del peso total de la partícula recubierta. Por ejemplo, el recubrimiento polimérico puede tener un espesor en el intervalo de aproximadamente 20 Angstroms a aproximadamente 100 Angstroms.

Deseablemente, el polímero que forma el recubrimiento está entrecruzado en el intervalo de 2% a 40%. El uso de entrecruzamiento bajo (entrecruzamiento de aproximadamente 2% a aproximadamente 14%), medio (entrecruzamiento de aproximadamente 15% a aproximadamente 25%), o alto (entrecruzamiento de aproximadamente 30 a 40% de entrecruzamiento) puede determinarse fácilmente por un experto en la materia teniendo en cuenta el polímero seleccionado. Por ejemplo, es deseable un entrecruzamiento de aproximadamente 5% a aproximadamente 30% para los polímeros de poli(cloruro de vinilbencilo).

Se usa un agente de entrecruzamiento para facilitar el entrecruzamiento en el recubrimiento polimérico. Los agentes de entrecruzamiento adecuados pueden seleccionarse fácilmente entre compuestos difuncionales cuyos grupos funcionales reaccionan con un grupo en las subunidades monoméricas del polímero. Por ejemplo, el agente de entrecruzamiento reacciona con la fracción de cloruro de bencilo del monómero de cloruro de vinilbencilo. Los grupos funcionales del agente de entrecruzamiento pueden incluir, pero no se limitan a, aminas, tioles, dioles, bisfenoles, difosfinas, sulfonatos, epóxidos, nitrilos, carboxilatos, haluros de arilo, aldehídos, acetatos y tioésteres (por ejemplo, tioésteres carboxílicos), ésteres de fosfato.

En una realización, el agente de entrecruzamiento es un diaminobutano (DAB). En un ejemplo, se usa 1,4-diaminobutano. Sin embargo, otros agentes de entrecruzamiento pueden seleccionarse fácilmente.

En otra realización, un poli(cloruro de vinilbencilo) (poli(VBC)) puede entrecruzarse a través de otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, el uso de catalizadores de Friedel-Crafts que incluyen, entre otros, $AlCl_3$. Ventajosamente, el método de la invención evita la necesidad de un agente de acoplamiento para unir el recubrimiento al sustrato de silano de la partícula de vidrio.

Aunque menos deseable, el método de la invención podría usarse con un agente de este tipo. Un ejemplo de un agente de acoplamiento de silano tiene una fórmula $[-Si(CH_2)_n-R]$, en la que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y R es una fracción seleccionada para reaccionar con el recubrimiento de monómero o polimérico. El grupo Si puede proporcionarse como parte del enlazador. Por lo tanto, el enlace se puede proporcionar mediante una modificación de la superficie del sustrato de vidrio. En otra realización, el enlace puede proporcionarse mediante una modificación del polímero que forma el recubrimiento exterior.

En un aspecto, se proporciona un método para proporcionar un recubrimiento de polímero a una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG), cuyo recubrimiento de polímero es estable durante la reacción para proporcionar los grupos funcionales deseados (en el que se requiere la reacción después del depósito del recubrimiento) y es estable durante la carga, por ejemplo, con un ligando deseado. Preferiblemente, el CPG recubierto con polímero de la invención retiene el volumen de poros y al menos aproximadamente el 90% del tamaño de poro del sustrato de CPG en el estado seco (no solvatado). Un experto en la técnica entenderá fácilmente que, en el estado solvatado, los poros del CPG recubierto con polímero están llenos aproximadamente en un 20-50% con el recubrimiento.

La invención implica un proceso para recubrir una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG) con un polímero entrecruzado. El proceso implica las etapas de mezclar las partículas de CPG con el monómero o polímero deseado que formará el recubrimiento polimérico. Las partículas de CPG y la solución se enfrían a una temperatura aproximadamente inferior a $10^\circ C$, por ejemplo, aproximadamente $-20^\circ C$ a aproximadamente $10^\circ C$, preferiblemente de aproximadamente $0^\circ C$ a aproximadamente $5^\circ C$. Las partículas de CPG y/o la solución se pueden enfriar antes de mezclar.

La solución contiene el monómero o monómeros seleccionados o el polímero y un disolvente que disolverá el polímero (o monómero) y el agente de entrecruzamiento. Deseablemente, la disolución se encuentra en un nivel tal que la solución se ajuste al volumen de los poros de la partícula de CPG. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen, por ejemplo, diclorometano (también denominado cloruro de metileno) (DCM), tetrahidrofurano, 2-MeTHF, metil etil cetona (MEK), acetato de etilo, benceno, butiraldehído, cloroformo y acetona. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente otros disolventes adecuados.

En una realización, la solución contiene cloruro de polivinilbencilo y DCM. En una realización particularmente deseable, se proporciona una cantidad suficiente de poliVBC para permitir la dispersión del polímero lineal disuelto completamente dentro de los poros del CPG, aunque no sea tan grande que la eliminación del exceso de disolvente por evaporación al vacío no fuera posible. En una realización, esto está en el intervalo de aproximadamente $200 \mu M$ a aproximadamente $600 \mu M$ de grupo clorometilo/gramo de CPG. En una realización, en la invención se usan aproximadamente $400 \mu M$ de grupo clorometilo/gramo de CPG. En este ejemplo, cuando hay aproximadamente 0,6 g de poliVBC, aproximadamente 40 a 60 mL de DCM están presentes por cada 10 g de CPG.

En una realización, el entrecruzamiento se realiza combinando la solución fría de polímero/monómero de CPG con el agente de entrecruzamiento. El agente de entrecruzamiento puede ser cualquier compuesto que tenga al menos dos grupos funcionales que reaccionen con un grupo reactivo de la subunidad monomérica. Por ejemplo, cuando el polímero es un poli(cloruro de vinilbencilo), el agente de entrecruzamiento puede ser cualquier compuesto difuncional cuyos grupos funcionales reaccionen con la fracción de cloruro de bencilo del monómero de cloruro de vinilbencilo (VBC). Los grupos funcionales en cada extremo del compuesto difuncional (entrecruzador) pueden ser diferentes entre sí o iguales. Algunos ejemplos de tales grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, aminas, tioles, dioles, bisfenoles, difosfinas, sulfonatos, epóxidos, nitrilos, carboxilatos, haluros de arilo, aldehídos, acetatos, amidas, tioésteres carboxílicos, ésteres de fosfato y tioésteres. En otra realización, el polímero puede entrecruzarse usando un catalizador de Friedel-Crafts, que incluye, pero no se limita a, $AlCl_3$.

Adecuadamente, la reacción de entrecruzamiento se realiza de una manera que proporciona de aproximadamente 2% a aproximadamente 40% de entrecruzamiento, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30% de entrecruzamiento (porcentaje de polímero entrecruzado frente a no entrecruzado con base en el peso molar total). En otras realizaciones, el entrecruzamiento es de aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, o aproximadamente el 25% (porcentaje de polímero entrecruzado frente a no entrecruzado con base en el peso molar total).

En una realización, la mezcla de reacción se mantiene a una temperatura por debajo de un valor en el que se producirá el entrecruzamiento. Esta temperatura se determina fácilmente teniendo en cuenta el agente de entrecruzamiento seleccionado. En una realización, la temperatura de aproximadamente $5^\circ C$, por ejemplo, de aproximadamente 0 a aproximadamente $5^\circ C$ antes del entrecruzamiento. En un ejemplo, el agente de entrecruzamiento es diaminobutano (DAB). Por conveniencia, el agente de entrecruzamiento (por ejemplo, DAB) se puede agregar como solución. En una

realización, el disolvente se selecciona entre diclorometano, tetrahidrofurano, 2-MeTHF, metil etil cetona (MEK), acetato de etilo, benceno, butiraldehído, cloroformo y acetona, como se describió anteriormente.

5 La concentración de agente de entrecruzamiento en la solución se puede ajustar dependiendo de la cantidad deseada de entrecruzamiento deseado en el recubrimiento de polímero. Por ejemplo, cuando se usan 0,6 g de poliVBC, y el objetivo es un polímero entrecruzado al 10%, entonces se deben agregar 0,0352 g de 1,4 DAB. Si se desea un 20% de polímero entrecruzado, entonces se debe usar 2 veces esta cantidad, o 0,0705 g de 1,4 DAB. En ambos casos, esta cantidad de entrecruzador se utiliza para 0,6 g de poliVBC.

10 Se añade un segundo disolvente a la mezcla. En una realización, el segundo disolvente tiene un punto de ebullición más alto que la temperatura de reacción para el entrecruzamiento. Sin querer limitarse a ninguna teoría, se cree que este codisolvente se queda atrás, en los poros del CPG durante la reacción de entrecruzamiento realizada a temperaturas elevadas. En una realización, el segundo disolvente es un dicloroetano (DCE), por ejemplo, 1,2-DCE. En otra realización más, el segundo disolvente es 1,4 dioxano (también conocido como óxido de dietileno).
15 Alternativamente, se puede utilizar 1,3-dioxano.

Los inventores han encontrado que los números de carga son significativamente mayores cuando el disolvente es 1,4-dioxano. Sin desear estar limitados por la teoría, los inventores creen que el dioxano sirve para mantener una estructura más "abierto" en el polímero final, lo que significa grupos funcionales más accesibles (por ejemplo, grupos amina) y, de hecho, una carga más alta.

20 Típicamente, la reacción de entrecruzamiento se realiza a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 65°C. Para DAB, la reacción de entrecruzamiento está dentro de este intervalo, pero está preferiblemente por encima de 38°C. La reacción se realiza bajo una cubierta de un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno.
25 La reacción transcurre durante al menos aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 24 horas, o más.

Adecuadamente, el primer disolvente se elimina rápidamente. Adecuadamente, este disolvente se elimina dentro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 horas de la adición del agente de entrecruzamiento. A la terminación deseada de la reacción de entrecruzamiento, las partículas de CPG se enfrían a temperatura ambiente. Las partículas
30 enfriadas resultantes de CPG recubiertas con polímero entrecruzado se lavan y se secan luego utilizando técnicas de química orgánica convencionales.

Por ejemplo, las partículas de CPG recubiertas se lavan en un disolvente adecuado, por ejemplo, acetona, DCM, acetato de etilo, benceno, THF, butiraldehído, cloroformo, metil etil cetona (MEK), benceno, butiraldehído, acetona y eliminando el exceso de disolvente. Por ejemplo, las partículas de CPG recubiertas pueden secarse bajo una corriente
35 de nitrógeno u otro gas inerte. Alternativamente, el exceso de disolvente puede eliminarse por evaporación al vacío (por ejemplo, usando un desecador o evaporador rotatorio).

40 La partícula resultante de vidrio de porosidad controlada (CPG) recubierta con polímero se entrecruza en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 30%. Deseablemente, la partícula recubierta contiene un recubrimiento de conformación en al menos una monocapa, donde el recubrimiento tiene un espesor de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 Angstroms.

45 La partícula de CPG recubierta está disponible para carga, en la que el polímero contiene grupos funcionales adecuados. Alternativamente, la partícula de CPG recubierta con polímero está lista para su conversión en un recubrimiento con grupos funcionales. La mayor capacidad de carga de la partícula de CPG recubierta de la invención se debe a la presencia de un mayor porcentaje de grupos funcionales unidos al polímero en comparación con el número de grupos funcionales unidos a una partícula de CPG nativa. Un experto en la técnica puede calcular la cantidad de grupos que son accesibles a una reacción adicional utilizando métodos conocidos.

50 Adecuadamente, el recubrimiento polimérico está provisto de grupos funcionales tales como, por ejemplo, aldehídos, grupos amino, epoxi, haluros, ácido carboxílico, ésteres o mezclas de los mismos. Los expertos en la técnica conocen los métodos para proporcionar estos grupos funcionales al material polimérico. En una realización, la invención proporciona un artículo recubierto que tiene grupos funcionales amino para uso en síntesis de oligonucleótidos.
55 Alternativamente, otros grupos funcionales pueden seleccionarse para la unión de nucleósidos, péptidos o para otras aplicaciones.

Además de los grupos amino, se pueden proporcionar al recubrimiento polimérico otros grupos funcionales (por ejemplo, aldehídos, epoxi, haluros, ácido carboxílico, ésteres o mezclas). Se conocen métodos adecuados y se han descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Florencio Zaragoza Dorwald, "Organic Synthesis on Solid Phase",
60 Wiley-VCH, Weinheim, FRG, 2000.

En un aspecto, se proporciona un método para preparar una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG) recubierta con poli(ftalidimidometil estireno). En una realización, la partícula de CPG recubierta con poli
65 (clorometil estireno) preparada de acuerdo con la invención se mezcla con dimetilformamida (DMF) o 1,4 dioxano. En una realización, la DMF es anhidra. La mezcla se hace reaccionar luego con ftalimida de potasio. Al finalizar, se elimina

el exceso de DMF y la ftalimida de potasio no reaccionada utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el exceso de DMF y la ftalimida de potasio sin reaccionar se pueden eliminar agregando DMF fresco, lavando el CPG recubierto en DMF, seguido de lavado en metanol, lavado en agua y un lavado adicional en metanol. Se pueden utilizar fácilmente otros métodos de lavado adecuados. La partícula resultante de CPG recubierto con poli(ftalidimidometilestireno) se seca.

En otro aspecto, se proporciona un método para preparar una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG) recubierto con poli(aminometilestireno), que es útil, por ejemplo, para la carga de nucleósidos. En una realización, una partícula de CPG recubierto con poli(ftalidimidometilestireno) se mezcla con un disolvente inerte adecuado (por ejemplo, etanol) para formar una suspensión, a la que se agrega hidracina. En otra realización, se puede usar una metilamina acuosa en dioxano. Se pueden usar concentraciones adecuadas (por ejemplo, aproximadamente el 40%) de metilamina y relaciones de metilamina con respecto a dioxano (por ejemplo, una relación 1:3 v/v) a una temperatura de aproximadamente 55°C. La mezcla de reacción se calienta luego a reflujo para proporcionar partículas de CPG recubiertas con poli(aminometilestireno). Después de enfriar la mezcla que contiene partículas de CPG recubiertas a temperatura ambiente, las partículas de CPG recubiertas se lavan para proporcionar la CPG recubierto de poli(aminometilestireno).

De este modo, la invención hace posible proporcionar una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG) recubierto con poli(aminometilestireno) que tiene un número significativamente mayor de grupos funcionales amino disponibles, en comparación con una partícula CPG nativa (no recubierto).

Se entenderá que esta metodología se proporciona con fines de ilustración solamente y que la presente invención no se limita a partículas de CPG recubiertas de poliestireno con grupos funcionales amino. Un experto en la técnica está familiarizado con los métodos para proporcionar grupos funcionales distintos de grupos amino (por ejemplo, aldehídos, epoxi, haluros, ácido carboxílico, ésteres o mezclas), y para introducir grupos funcionales en polímeros distintos del poliestireno.

Ventajosamente, la partícula de CPG recubierto con polímero fabricada de acuerdo con la invención tiene una capacidad de carga aumentada en comparación con la partícula de CPG no recubierto y una estabilidad aumentada en comparación con una partícula con base en poliestireno, soportando así más cadenas sintéticas. En una realización, un artículo recubierto fabricado de acuerdo con la invención puede tener una capacidad de carga de al menos 2 veces más que su contraparte no recubierto. Por ejemplo, un artículo recubierto que tiene un tamaño de diámetro de poro promedio de al menos aproximadamente 1.000 Angstroms puede cargarse con nucleósido en una cantidad de al menos 100 μ moles por gramo.

La partícula recubierto fabricada de acuerdo con la invención es útil para la síntesis de una variedad de moléculas que incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos. De este modo, en un ejemplo, la invención hace posible proporcionar una partícula recubierto que tiene al menos un ligando unido a la misma. En una realización, el ligando es un compuesto nucleósido.

De este modo, la invención permite además proporcionar un recipiente para la síntesis química en fase sólida que contiene una pluralidad de partículas recubiertas fabricadas de acuerdo con la invención.

En otro ejemplo, la invención hace posible proporcionar un método para aumentar el rendimiento para la síntesis en fase sólida de un ligando, que implica el uso de una partícula recubierto fabricada de acuerdo con la presente invención.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no son una limitación de la misma.

Ejemplos

La siguiente tabla muestra la comparación de la carga máxima alcanzada con la fracción amina acoplada al vidrio nativo (típico) y la fracción amina acoplado a través del CPG recubierto con polímero fabricado de acuerdo con la invención.

Comparación de la carga máxima lograda con CPG normal y recubierto con polímero

Tipo de CPG	Tamaño de poro (Å)	Carga máxima de amina (μ M/g)	Carga máxima de nucleósido (μ M/g)
Amina en CPG nativo	1.000	100	50
CPG con poli(aminometilestireno) preparado utilizando 1,4-dioxano	1.000	307	153
CPG con poli(aminometilestireno) CPG preparado utilizando DCE	1.000	224 μ M/g	82 μ M/g
Amina en CPG nativo	1.800	75	35

CPG con poli(aminometilostireno) preparado utilizando 1,4-dioxano			
---	--	--	--

Ejemplo 1 - Preparación de partículas de CPG recubiertas con cloruro de polivinilbencilo entrecruzado al 20%

5 A. Preparación de soluciones:

Las cantidades de reactivo para dos lotes que se produjeron se muestran en la tabla.

Reactivo	Cantidad	
	Lote 1	Lote 2
CPG (~1.000 Angstroms)	10 g	25 g
DCM	60 mL	150 mL
Poli(VBC)	0,61 g en 50 mL	1,525 g en 125 mL
1,4-diaminobutano (DAB)	0,0705 g en 10 mL	0,176 g en 25 mL

10

Se prepara una solución de Poli(VBC) en DCM a una concentración de 0,61 g de poli VBC por 50 mL de DCM.

Se prepara una solución de 1,4-diaminobutano/DCM a una concentración de 0,0705 g de DAB por 10 mL de DCM.

15

Ambas mezclas se enfrían hasta al menos 0°C en un baño de hielo.

B. Recubrimiento y entrecruzamiento de poliVBC

20 Se agrega CPG (10 g/25 g) a un matraz de reacción, y luego se enfría a 0°C. Se agrega una solución fría de poliVBC (50 mL/125 mL) al CPG y se agita a presión atmosférica, 0°C durante 15 min. Se agrega DAB frío (10 mL/25 mL) al matraz. La mezcla se agita durante al menos 15 minutos a 0°C. El DCM se retira del matraz por vacío, manteniendo la mezcla a 0°C en todo momento. Cuando se haya eliminado suficiente DCM, el peso neto de la GPC debería ser: 25,8 g (para un lote de 10 g) o 64,54 g (para un lote de 25 g) +/- 10%.

25

Este proceso de eliminación del disolvente debe completarse dentro de una hora para evitar el entrecruzamiento prematuro del polímero. El matraz se coloca bajo una capa estática de nitrógeno y se calienta a 38°C durante la noche para efectuar la reacción de entrecruzamiento de poli(VBC) al policlorometilostireno entrecruzado. El matraz se enfría, se pesa y se coloca en una corriente de nitrógeno seco hasta que el peso neto del producto sea de 10,68 g (10 g de lote) o 26,7 g (25 g de lote).

30

El CPG recubierto con policlorometilostireno se lava en acetona 10X tres veces y se seca en un desecador durante la noche.

35 C. Conversión de poli(clorometilostireno) en poli(ftalimidometilostireno)

Se coloca el CPG con poli(clorometilostireno) en una botella Schott de 1 litro a la que se añaden 200 mL (10 g)/250 mL (25 g) de DMF anhidro. La mezcla de CPG/DMF se purga con nitrógeno durante 15 minutos. Se añaden 2,225 g (10 g)/2,8 g (25 g) de ftalimida de potasio a la botella Schott. La botella Schott se agita a 50°C durante la noche. La CPG de poli(ftalimidometilostireno) se lava 3 veces con DMF fresco (10X), seguido de 2 veces en metanol (10X), 2 veces en agua (10X) y 1 vez en metanol (10X), y se seca en un desecador durante la noche.

40

D. Conversión de poli(ftalimidometilostireno) en poli(aminometilostireno)

45 El CPG recubierto se transfiere a un matraz de reacción de 500 mL de tres bocas al que se le añade etanol anhidro (200 mL (10 g)/250 mL (25 g)). La suspensión de CPG/EtOH se coloca en un baño de aceite y un agitador en la parte superior se fija a través del puerto central. Se añaden lentamente 12,25 mL de hidracina anhidra a la suspensión, mientras se agita continuamente. La mezcla de EtOH se calienta a reflujo durante la noche, luego se enfría a temperatura ambiente mientras se agita continuamente. La suspensión se lava 1 vez con etanol (10X), seguido de 3 lavados con acetona (10X) y se seca en un desecador de vacío durante la noche. La carga de amina se determina mediante un método de titulación colorimétrica no acuosa de pH.

50

Ejemplo 2: Preparación de CPG recubierto con cloruro de polivinilbencilo (Poli(VBC) entrecruzado al 15%:

55 A. Preparación de soluciones.

Las cantidades de reactivo que se procesaron se muestran en la tabla.

CPG/Poli(VBC) entrecruzado al 15%

Reactivo	Cantidad	
	Lote 1	Lote 2
CPG	10 g	25 g
1,2 Dicloroetano (DCE) o 1,4 Dioxano	10 mL	25 mL
Diclorometano (DCM)	60 mL	150 mL
Poli (VBC)	0,61 g en 50 mL	1,525 g en 125 mL
1,4-diaminobutano (DAB)	0,053 g en 10 mL	0,1325 g en 25 mL

5 Se prepara una solución de Poli(VBC) a una concentración de 0,61 g de poli(VBC) por 50 mL de DCM.

Se prepara una solución de 1,4-diaminobutano/DCM a una concentración de 0,053 g de DAB por 10 mL de DCM.

Tanto las mezclas como el DCE o 1,4 dioxano se enfrían a 0°C en un baño de hielo.

10

B. Recubrimiento y entrecruzamiento de CPG

15 El recubrimiento y el entrecruzamiento de la CPG se realiza como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que el DCE frío o el 1,4-dioxano se agrega a la solución fría de poliVBC (que se gira a presión atmosférica, 0°C durante 5 min), previo a la adición del DAB frío. Cuando se ha eliminado el DCM (dejando solo el DCE o el 1,4 dioxano), el peso neto objetivo del CPG es de 23,2 g (para un lote de 10 g) o 58 g (para un lote de 25 g) +/- 10%. Después de la reacción de entrecruzamiento, y después del enfriamiento del matraz, el DCE o el 1,4 dioxano restantes se eliminan mediante un evaporador rotatorio, hasta que el peso neto del producto sea 10,68 g (10 g por lote) o 26,7 g (25 g por lote).

20

El poli(clorometilostireno) se convierte en poli(ftalimidometilostireno) y el poli(ftalimidometilostireno) se convierte en poli(aminometilostireno) como se describe en el Ejemplo 1.

25 C. Síntesis de oligonucleótidos con CPG recubierto con soporte de cloruro de polivinilbencilo poli(VBC) entrecruzado al 15%

30 Para evaluar la utilidad del soporte de CPG enlazado recubierto con Poli(VBC) preparado como se describe en el Ejemplo 2. Más particularmente, una secuencia de oligonucleótidos de 22 mer: SEQ ID NO: 1: CGC ACT TCA GGC TCC TGG GC(N)T, donde N representa cualquier nucleótido, se sintetizó utilizando el soporte híbrido de CPG recubierto preparado como se describe en el Ejemplo 2A y 2B en una columna de 24 mL, que se cargó a razón de 80 µmol/gramo. Las síntesis de oligonucleótidos se realizaron utilizando los protocolos estándar descritos en el Manual de operación AKTA 10 OligoPilot. Para fines comparativos, se usó un soporte convencional de poliestireno convencional entrecruzado al 30%, con una carga de 85 µmol/gramo.

35 En la siguiente tabla, FLP% se refiere al rendimiento del producto oligonucleótido de longitud completa en comparación con la teoría; El N-1% crudo se refiere a secuencias fallidas que carecen de un solo nucleósido; la eficiencia de acoplamiento se refiere a la eficiencia promedio de acoplamiento de nucleósidos en toda la síntesis. El soporte de poliestireno está disponible a través 3-Prime, LLC (número de parte PS-DT-S-5).

40 La siguiente tabla muestra una impureza única, N-1 obtenida en esta síntesis. Una variedad similar de otras impurezas estaba presente para cada síntesis, según lo determinado por cromatogramas de electroforesis capilar.

	Poliestireno convencional entrecruzado al 30% de (cargado a razón de 85 mol/g)	Secuencia de oligonucleótidos de 22 mer, SEQ ID NO:1	soporte híbrido entrecruzado al 15% (cargado a razón de 80 µmol/g)
	Columna de 24 mL	CGC ACT TCA GGC TCC TGG GCNT	Columna de 24 mL
Escala de la síntesis	~442 µmol		~640 µmol
Recuperación de crudo	256,4 µmol		309,3 µmol
% de recuperación	58,0%		48,3%

% de FLP crudo	80,9%		66,8%
% de N-1 crudo	0,9%		1,4%
Eficiencia del acoplamiento	98,9%		97,9%

Estos resultados muestran que, incluso con la carga más baja, el CPG recubierto con polímero proporcionó una cantidad total más alta de 22 mers sintetizados (en peso) y una cantidad total más alta de 22 mers crudos recuperados (en peso). Por lo tanto, aunque la recuperación fue ligeramente menor para el CPG recubierto con polímero que el soporte convencional como porcentaje, se recuperaron al menos cantidades comparables de 22 mer del CPG recubierto con polímero que el soporte convencional. Por lo tanto, el CPG recubierto con polímero fabricado de acuerdo con la invención es ventajoso en vista del hecho de que dicho CPG recubierto con polímero se cargó a una concentración más baja y a un menor porcentaje de entrecruzamiento y, por tanto, se usó menos material de partida. La diferencia entre 80 $\mu\text{M/g}$ y 85 $\mu\text{M/g}$ no es importante, ya que se usó más soporte recubierto con polímero que la cantidad utilizada en el caso de PS. Esto se indica mediante los números de "escala de síntesis" que muestran 442 μmoles de nucleósido de partida para el PS frente a 640 μmoles de nucleósido de partida para el soporte recubierto de polímero. Desafortunadamente, estos resultados no muestran ninguna ventaja real al usar el GPC recubierto con polímero. Sin embargo, no es demasiado exagerado decir que se obtuvieron resultados "comparables". Lo que se debe mostrar en futuras pruebas es que, para una síntesis de oligonucleótidos más larga (35-50 mer), el soporte recubierto con PS debe dar resultados superiores. Otra prueba futura debe ser cargar el recipiente de reacción con una cantidad máxima de soporte sólido. El soporte de PS aumentará varias veces su volumen, por lo que se puede usar mucho menos, lo que limita la escala máxima de síntesis para un volumen de reactor dado.

Ejemplo 3: Preparación de CPG recubierto con polímero formado a partir de monómeros

A. Eliminación del inhibidor de las soluciones monoméricas

El cloruro de vinil bencilo y los monómeros de divinilbenceno se tratan con alúmina activada para eliminar el inhibidor de la polimerización presente en las soluciones de monómero adquiridas comercialmente.

B. Adsorción de la mezcla de monómeros.

Añadir 10 g de CPG nativo (diámetro de poro = $\sim 1.000 \text{ \AA}$) a un matraz de reacción. Colocar el matraz, con el CPG seco en el evaporador rotativo y hacer un vacío durante aproximadamente 10 minutos mientras gira el matraz lentamente. Liberar el vacío purgando el sistema con nitrógeno y repetir este proceso 2 veces más. Purgar 100 mL de acetona con nitrógeno durante 15 minutos, mientras se agita a una velocidad moderada. Agregar la acetona purgada con nitrógeno al CPG mientras se mantiene una capa de nitrógeno. Añadir 0,56 mL del cloruro de vinil bencilo no inhibido al matraz, mientras se mantiene una capa de nitrógeno. Agregar 0,052 mL de divinilbenceno sin inhibir, mientras se mantiene la capa de nitrógeno. Agregar 0,0122 g de peróxido de benzoilo (BPO) al matraz, aun manteniendo una capa de nitrógeno. Girar lentamente el matraz durante unos 10 minutos a presión atmosférica. Después de 10 minutos, comenzar la evaporación rotatoria del exceso de acetona, hasta que la mezcla alcance un valor neto de 19-21 g (10 g de disolvente en exceso).

C. Equilibrio y polimerización del monómero en los poros de CPG.

Colocar el matraz y su contenido en una bomba de vacío, y aplicar vacío. Cerrar la válvula de vacío, luego apagar la bomba y dejar que el matraz se siente en el baño a 50°C, durante 24 horas, bajo un vacío de 0,5 - 1 torr. Controlar el vacío y volver a evacuar según sea necesario (solo vacío moderado) si la presión aumenta en el matraz para mantener el vacío. Mientras se mantiene un vacío estático moderado, calentar el baño de agua o aceite a 80°C durante 18 a 24 horas para efectuar la polimerización. No es necesario agitar o girar, pero es absolutamente necesario un ambiente libre de oxígeno durante este proceso. Dejar que la mezcla se enfríe a temperatura ambiente. Evacuar cualquier exceso de acetona en el matraz de reacción, hasta un peso neto final de 10,77 g +/- 10%. Lavar el CPG recubierto de polímero (2X) con acetona (10X). Secar a 50°C, al vacío, durante la noche.

El poli(clorometilbenceno) se convierte en poli(ftalimidometilbenceno) y el poli(ftalimidometilbenceno) se convierte en poli(aminometilbenceno) como se describe en los ejemplos 1 y 2.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a una realización particularmente preferida, se apreciará que pueden realizarse modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> Prime Synthesis, Inc.

<120> SOPORTES SÓLIDOS HÍBRIDOS ÚTILES PARA LA PRODUCCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

<130> RTM
<140> EP 08779740.3
5 <141> 2008-06-24
<150> U.S 60/986.639
<151> 2007-11-09
10 <150> US 60/937.611
<151> 2007-06-28
15 <150> PCT/US2008/007840
<151> 2008-06-24
<160> 1
20 <170> PatentIn versión 3.4
<210> 1
25 <211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> oligonucleótido
35 <220>
<221> característica nueva
<222> (21)..(21)
40 <223> puede ser cualquier nucleótido
<400> 1
45 cgcacttcag gctcctgggc nt 22

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una partícula de vidrio de porosidad controlada (CPG) recubierta con polímero, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 (a) enfriar partículas de CPG que tienen poros con un diámetro promedio medio de 75 a 4.000 Angstroms (7,5 a 400 nm) a una temperatura aproximadamente inferior a 10°C;
- 10 (b) mezclar las partículas de CPG enfriadas y una solución fría que comprende un polímero que forma un compuesto de recubrimiento y un primer disolvente, caracterizado porque el polímero que forma el compuesto de recubrimiento se selecciona del grupo que consiste en un cloruro de vinilbencilo, acrílicos, estireno, alcohol vinílico, polímeros de los mismos, y mezclas de los mismos;
- 15 (c) combinar la mezcla y un agente de entrecruzamiento en una solución que comprende un segundo disolvente, mientras se mantienen las partículas de CPG a una temperatura aproximadamente inferior a 10°C;
- 20 (d) eliminar rápidamente el primer disolvente, mientras se mantiene la mezcla de CPG a una temperatura aproximadamente inferior a 10°C;
- 25 (e) calentar la mezcla de CPG a una temperatura de aproximadamente 38 a aproximadamente 65°C bajo un gas inerte, para permitir la formación de las partículas de CPG recubiertas que tienen un recubrimiento polimérico de conformación entrecruzado en el intervalo de aproximadamente 2 a 40% en el que las partículas de CPG recubiertas con polímero tienen un tamaño de poro promedio de al menos aproximadamente el 90% del tamaño de poro promedio de las partículas de CPG no recubiertas (a), con base en el tamaño de poro seco;
- 30 (f) enfriar las partículas de CPG recubiertas;
- (g) lavado de las partículas de CPG recubiertas y secar.
- 35 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de entrecruzamiento es un compuesto difuncional cuyos grupos funcionales reaccionan con un grupo en las subunidades monoméricas del polímero.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el agente de entrecruzamiento reacciona con una fracción de cloruro de bencilo de un polímero de cloruro de vinilbencilo que forma un compuesto de recubrimiento.
- 40 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que los grupos funcionales del agente de entrecruzamiento incluye aminas.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el polímero que forma el recubrimiento es un polímero de poli(cloruro de vinilbencilo) entrecruzado en el intervalo de 5 a 30%.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el recubrimiento se proporciona en una capa delgada uniforme sobre la partícula de CPG en una cantidad de 5% a 10% del peso total de la partícula recubierta.