

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 737**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
C07F 7/18 (2006.01)
C08K 9/06 (2006.01)
B01D 53/02 (2006.01)
C08J 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2013** **PCT/US2013/059995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14043644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2013** **E 13837684 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 2811983**

54 Título: **Material de soporte de partículas funcionalizado y métodos de fabricación y uso del mismo**

30 Prioridad:

17.09.2012 US 201261702174 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2019

73 Titular/es:

W.R. GRACE & CO. - CONN. (100.0%)
7500 Grace Drive
Colombia, MD 21044, US

72 Inventor/es:

GU, FENG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 730 737 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

Material de soporte de partículas funcionalizado y métodos de fabricación y uso del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a material de soporte de partículas funcionalizado adecuado para uso en columnas o cartuchos de cromatografía, tal como en una columna de cromatografía líquida. La presente invención se refiere además a columnas o cartuchos de cromatografía que contienen el material de soporte de partículas
10 funcionalizado, métodos para fabricar material de soporte de partículas funcionalizado, y métodos de usar material de soporte de partículas funcionalizado, por ejemplo, como medio en una columna o cartucho de cromatografía.

Antecedentes de la invención

15 Se conocen materiales cromatográficos de intercambio catiónico y aniónico. Los materiales cromatográficos de intercambio catiónico típicamente contienen medios que tienen grupos aniónicos unidos a superficie, tales como grupos ácido sulfónico (por ejemplo, intercambio aniónico fuerte S) y/o grupos metilo carboxílicos (por ejemplo, intercambio catiónico débil CM). Los materiales cromatográficos de intercambio aniónico típicamente contienen medios que tienen grupos catiónicos unidos a superficie, tales como amonio cuaternario (por ejemplo, intercambio aniónico
20 fuerte Q) y/o dietilaminoetilo (por ejemplo, intercambio aniónico débil DEAE).

En procesos de separación, tales como purificación de proteínas, dado el peso molecular extremadamente alto (M_w) de esas biomoléculas, la difusión de biomoléculas de alto M_w en el medio superficial es muy limitada. Para abordar este problema, se desarrolló el concepto de "tentáculo" y se encontró que es muy útil y se aplica ampliamente. En el
25 concepto de "tentáculo", los tentáculos que comprenden cadenas poliméricas injertadas se injertan en la superficie del medio. Las cadenas poliméricas injertadas contienen unidades repetitivas de grupos iónicos, conectadas desde el extremo de los polímeros a la superficie del medio. Estas cadenas poliméricas pueden girar libremente, permitiendo interacciones entre las moléculas proteínicas y la fase estacionaria polimérica sin requisitos de que las biomoléculas se difundan sobre la superficie de los medios y por tanto permitan una alta carga proteínica.

30 La química más común involucrada en el concepto de recubrimiento de tentáculos utiliza el concepto de "injerto de". En tales químicas, la polimerización radical se inicia desde la superficie de las partículas del medio. Para los medios de intercambio catiónico, se utiliza sal de Ce(IV) (por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.453.186 de E. Merck) para permitir la química redox para los grupos diol superficiales (por ejemplo, preparada mediante hidrólisis de grupos epoxi unidos antes de la polimerización) para generar radicales superficiales, que polimerizan monómeros que contienen
35 ácido sulfónico, como ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS). Esta química no es ecológica ya que genera importantes residuos peligrosos. El documento WO 2004/076511 A2 describe una partícula que comprende un hidrogel copolimérico preparado mediante fotorreticulación de un precursor de hidrogel copolimérico que comprende primeras subunidades monoméricas que comprenden una funcionalidad fotocorreticulable y segundas subunidades monoméricas que comprenden una funcionalidad químicamente selectiva para unir una proteína. Además, un método para funcionalizar una superficie con hidrogel copolimérico que comprende proporcionar (i) un sustrato y (ii) un precursor de hidrogel copolimérico que comprende dichas primeras y segundas subunidades comonoméricas, poner en contacto el precursor de hidrogel copolimérico y la superficie del sustrato para formar una
40 capa de precursor de hidrogel copolimérico en la superficie, y fotorreticular la capa del precursor de hidrogel copolimérico para formar hidrogel en contacto con la superficie. El documento WO 2004/024318 A1 describe un sustrato sólido que comprende un soporte sólido, un grupo monocíclico o policíclico, y un grupo de unión que une el grupo monocíclico o policíclico al sustrato sólido. El soporte sólido puede ser orgánico o inorgánico y, si es inorgánico puede ser, entre otros, sílice. El grupo de unión tiene un resto puede ser un miembro seleccionado de grupos alquileo, grupos alquenileno, grupos alquinileno, grupos alquiloxi, grupos aromáticos, grupos alquilaromáticos y combinaciones y, en particular, es un grupo mercaptoalquilo. El soporte puede modificarse con un reactivo difuncional tal como un compuesto de silano insaturado para proporcionar una capa de sililo recubierta covalentemente, que a su vez puede unirse covalentemente a un polisacárido reticulado. El documento WO 2008/140652 A2 enseña un proceso para colocar grupos funcionales en áreas superficiales expuestas de nanopartículas. El documento WO 2008/027262 A1 describe un complemento de un maestro que se forma mediante un método que comprende a) poner en contacto un
45 maestro que comprende un primer conjunto de moléculas unidas a un primer sustrato con un segundo conjunto de moléculas, en donde cada molécula en dicho segundo conjunto de moléculas comprende un fragmento espaciador.

Se continúan los esfuerzos para desarrollar medios rentables adecuados para su uso como medios cromatográficos de intercambio catiónico y/o aniónico, así como columnas o cartuchos de cromatografía que contienen dichos medios rentables, incluyendo columnas o cartuchos de cromatografía desechables y/o desechables.
60

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a medios rentables adecuados para uso como materiales cromatográficos de intercambio catiónico y/o aniónico. Los medios desvelados, referidos en este documento como "material de soporte de partículas funcionalizado" es adecuado para su uso en columnas o cartuchos de cromatografía, tal como en una
65

columna de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida rápida proteínica (FPLC). La invención proporciona un material de soporte de partículas funcionalizado que comprende:

5 una partícula de sílice que tiene una superficie de partícula; y
una combinación de grupos funcionales unidos a y que se extienden desde la superficie de partícula de sílice, comprendiendo dicha combinación de grupos funcionales

10 (i) un primer conjunto de grupos funcionales que comprenden dobles enlaces insaturados en donde los grupos funcionales son suficientes para polimerizar uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula, y
(ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que comprenden al menos un grupo funcional hidrófilo suficiente para aumentar la humectabilidad de dicha superficie de partícula.

Además, La invención proporciona un método para fabricar un material de soporte de partículas funcionalizado que comprende: tratar una superficie de partícula de una partícula de sílice para dar como resultado una combinación de grupos funcionales unidos a y que se extienden desde la superficie de partícula de sílice, comprendiendo la combinación de grupos funcionales

20 (i) un primer conjunto de grupos funcionales que comprenden al menos un doble enlace que son suficientes para permitir la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de partícula mediante el primer conjunto de grupos funcionales, y
(ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que comprenden grupos hidrófilos que aumenta la humectabilidad de dicha superficie de partícula.

25 La invención también proporciona un uso del material de soporte de partículas funcionalizado en una columna o cartucho de cromatografía de la invención y, por consiguiente, también una columna o cartucho de cromatografía que aloja el material de soporte de partículas funcionalizado de la invención.

30 En una realización de la presente invención, el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una partícula de sílice que tiene una superficie de partícula; y una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales que permiten la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula a través del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula. La presente invención, la partícula comprende una partícula (o partículas) de sílice o gel de sílice.

35 En otra realización de la presente invención, el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una partícula que tiene una superficie de partícula; y una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales en la superficie de la partícula unida a al menos un polímero que se extiende desde la superficie de la partícula, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula.

45 En una realización adicional de la presente invención, el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una partícula que tiene una superficie de partícula y un tamaño de poro medio de al menos 15 nm (150 Å); y un primer conjunto de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, dicho primer conjunto de grupos funcionales en la superficie de la partícula unido a al menos un polímero que se extiende desde la superficie de la partícula. El material de soporte funcionalizado incluye un segundo conjunto de grupos funcionales que aumentan la humectabilidad de dicha superficie de partículas.

50 La presente invención se refiere además a la columna o cartucho de cromatografía adecuado para uso en un aparato de cromatografía, en donde la columna o cartucho de cromatografía contiene el material de soporte de partículas funcionalizado descrito en este documento de la presente invención. En una realización ejemplar de la presente invención, la columna o cartucho de cromatografía comprende una estructura de columna que tiene un volumen de columna; y material de soporte de partículas funcionalizado colocado en el volumen de la columna de la estructura de columna, en donde el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una pluralidad de partículas, en donde una o más partículas dentro de la pluralidad de partículas comprenden una partícula que tiene una superficie de partícula; y una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales que permiten la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula a través del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula.

65 La presente invención se refiere además a un aparato de cromatografía que comprende la columna o cartucho de cromatografía descrito en el presente documento. En una realización ejemplar, el aparato de cromatografía de la presente invención comprende una columna o cartucho de cromatografía que contiene material de soporte en partículas funcionalizado, en donde el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una pluralidad de

partículas, en donde una o más partículas dentro de la pluralidad de partículas comprenden una partícula que tiene una superficie de partícula; y una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales que permiten la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula a través del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula.

La presente invención también se refiere a métodos para fabricar material de soporte de partículas funcionalizado. En una realización ejemplar, el método para fabricar material de soporte de partículas funcionalizado comprende tratar una superficie de partícula de una partícula para dar como resultado una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales que permiten la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula a través del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa de tratamiento puede comprender exponer la superficie de la partícula a (i) al menos un silano que comprende un grupo funcional del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) al menos un silano que comprende un grupo funcional del segundo conjunto de grupos funcionales.

La presente invención se refiere además a métodos para fabricar columnas o cartuchos de cromatografía que contienen material de soporte en partículas funcionalizado. En una realización ejemplar, el método para fabricar una columna o cartucho de cromatografía comprende: (1) sellar un primer extremo de una estructura tubular; (2) rellenar al menos parcialmente una cavidad de columna de la estructura tubular con material de soporte de partículas funcionalizado de la presente invención; (3) rellenar al menos parcialmente la cavidad de la columna de la estructura tubular con una suspensión del material de soporte de partículas funcionalizado; y, (4) sellar un extremo opuesto de la estructura tubular. La columna o cartucho de cromatografía resultante puede incorporarse a un aparato de cromatografía y utilizarse para separar una muestra.

La presente invención también se refiere a métodos de uso de material de soporte de partículas funcionalizado, columnas o cartuchos, y aparatos para detectar la presencia de una o más moléculas objetivo (por ejemplo, una o más biomoléculas) en una muestra dada. En una realización ejemplar, el método de separación de una molécula objetivo comprende la separación de una mezcla que contiene potencialmente al menos una molécula objetivo (por ejemplo, una biomolécula tal como una proteína o péptido), en donde el método comprende poner la muestra que contiene al menos una molécula objetivo (por ejemplo, una biomolécula tal como una proteína o péptido) en contacto con el material de soporte de partículas funcionalizado descrito en este documento de la presente invención. Por ejemplo, los métodos descritos para separar muestras pueden usarse para aislar la presencia de al menos una biomolécula que comprende un anticuerpo, una proteína, un péptido, un polipéptido, un compuesto no peptídico, un oligonucleótido, un derivado de los mismos, un análogo de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

Estas y otras características y ventajas de la presente invención se harán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones descritas y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a las figuras adjuntas, en donde:

- la **Figura 1** representa una vista de un dispositivo de cromatografía ejemplar de la presente invención;
- la **Figura 2** representa un esquema de reacción de una realización ejemplar de los medios de cromatografía de la presente invención; y
- la **Figura 3** representa un esquema de reacción de una realización ejemplar de los medios de cromatografía de la presente invención.
- la **Figura 4** representa un esquema de reacción de una realización ejemplar de los medios de cromatografía de la presente invención; y
- la **Figura 5** representa un esquema de reacción de una realización ejemplar de los medios de cromatografía de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a material de soporte de partículas funcionalizado adecuado para uso en columnas o cartuchos de cromatografía, tal como en la cromatografía líquida (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o instantánea). La presente invención se refiere además a columnas o cartuchos de cromatografía que comprenden material de soporte de partículas funcionalizado. La presente invención se refiere además a métodos para fabricar material de soporte de partículas funcionalizado y columnas o cartuchos de cromatografía, así como a métodos de uso de material de soporte de partículas funcionalizado y columnas o cartuchos de cromatografía para analizar muestras, incluyendo mezclas complejas (por ejemplo, mezclas que contienen componentes biológicos), que potencialmente contienen una o más moléculas objetivo.

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "y" y "la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un óxido" incluye una pluralidad de tales óxidos y la referencia a "óxido" incluye la referencia a uno o más óxidos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, etc. "Aproximadamente" que modifica, por ejemplo, la cantidad de un ingrediente en una composición, concentraciones, volúmenes, temperaturas de proceso, tiempos de proceso, recuperaciones o rendimientos, y caudales, y rangos de los mismos, empleados en la descripción de las realizaciones de la divulgación, se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede producirse, por ejemplo, a través de procedimientos típicos de medición y manipulación; a través de errores inadvertidos en estos procedimientos; a través de diferencias en los ingredientes utilizados para realizar los métodos; y consideraciones próximas similares. El término "aproximadamente" también incluye cantidades que difieren debido al envejecimiento de una formulación con una concentración inicial o mezcla, y cantidades que difieren debido a la mezcla o procesamiento de una formulación con una concentración inicial o mezcla. En tanto modificadas por el término "aproximadamente", las reivindicaciones adjuntas en la presente incluyen equivalentes de esas cantidades.

Tal como se usa en este documento, el término "biomolécula" significa cualquier molécula producida por un organismo vivo, incluyendo moléculas grandes tales como proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos; y moléculas pequeñas tales como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, y productos naturales. Ejemplos de biomoléculas incluyen células y residuos celulares; proteínas y péptidos; ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN; endotoxinas; virus; vacunas y similares. Otros ejemplos de biomoléculas incluyen los citados en los documentos WO 2002/074791 y US 5.451.660.

Tal como se usa en este documento, "Óxidos inorgánicos" se define como compuestos de oxígeno binarios donde el componente inorgánico es el catión y el óxido es el anión. El material de óxido inorgánico de la invención incluye sílice.

Las partículas pueden ser una variedad de diferentes formas simétricas, asimétricas o irregulares, incluyendo forma de cadena, varilla o listón. Las partículas pueden tener diferentes estructuras incluyendo amorfas o cristalinas, etc. Las partículas pueden incluir mezclas de partículas que comprenden diferentes composiciones, tamaños, formas o estructuras físicas, o que pueden ser iguales a excepción de diferentes tratamientos superficiales. La porosidad de las partículas puede ser intraparticular o interparticular en casos donde las partículas más pequeñas se aglomeran para formar partículas más grandes.

Tal como se usa en este documento, el término "funcionalizado" significa partículas que se han modificado en la superficie por reacción con un compuesto funcional para alterar la selectividad de al menos una parte de la superficie de la partícula, incluyendo el área superficial en la parte externa de las partículas, y/o en el área superficial de los poros internos. La superficie funcionalizada puede usarse para formar una fase unida (covalente o iónicamente), una superficie recubierta (por ejemplo, en fase inversa unida a C18), una superficie revestida (por ejemplo, revestida de carbono como en EP6), una superficie polimerizada (por ejemplo, intercambio iónico), una superficie inherente (por ejemplo, material híbrido inorgánico/orgánico). Por ejemplo, las partículas inorgánicas que reaccionan con octadeciltriclorosilano forman una "fase inversa" al unir covalentemente el silano a la superficie inorgánica (por ejemplo, C4, C8, C18, etc.). En otro ejemplo, la reacción de las partículas inorgánicas con aminopropiltrimetoxisilano seguida de cuaternización del grupo amino forma una "fase de intercambio aniónico". En un tercer ejemplo, se puede formar una fase unida por reacción de las partículas inorgánicas con aminopropiltrimetoxisilano seguido de formación de una amida con un cloruro de ácido. Otras fases unidas incluyen diol, ciano, catión, afinidad, quiral, amino, C18, interacción hidrófila (HILIC), interacción hidrófoba (HIC), modo mezclado, exclusión por tamaño, etc. Como parte de la fase unida o superficie funcionalizada, se puede usar un ligando que muestre interacción específica con la molécula o biomolécula objetivo (por ejemplo, ligato), tales como los expuestos en el documento US 4.895.806.

Tal como se usa en este documento, el término "peso molecular promedio" se define como el promedio de masa molar de pesos moleculares de un polímero que posee una distribución de pesos moleculares debido a diferentes números de unidades que se repiten en cada cadena de polímero. Este valor se mide usando análisis de cromatografía de permeación de gel (GPC).

Tal como se usa en este documento, el término "cromatografía" significa el proceso de pasar una mezcla disuelta en una fase móvil a través de una fase estacionaria (es decir, medios de cromatografía) alojados en una columna o cartucho u otro contenedor, que separa una molécula objetivo de otras moléculas en la mezcla y permite que se aisle. Dependiendo del tipo de cromatografía usada, la molécula objetivo puede ser adsorbida en la fase estacionaria mientras los componentes no deseados pasan a través del dispositivo, o viceversa. El término "cromatografía líquida" es una forma de cromatografía donde se utiliza un líquido como fase móvil y un sólido o un líquido sobre un soporte sólido como fase estacionaria. El término "cromatografía instantánea" significa cromatografía líquida que se realiza bajo una presión positiva (por ejemplo, hasta 20×10^5 Pa (300 psi)). El término "cromatografía líquida de alto rendimiento" (HPLC) significa cromatografía líquida que se realiza a presión positiva alta (por ejemplo, hasta 333×10^5 Pa (5000 psi)). El término "cromatografía preparatoria" significa HPLC para aislamiento y purificación de un compuesto o molécula objetivo. El término "cromatografía líquida rápida de proteínas" (FPLC) es una forma de HPLC útil para separación de biomoléculas.

Tal como se usa en este documento, el término "impurezas" significa materiales presentes en las partículas

inorgánicas, distinto del inorgánico.

Tal como se usa en este documento, el término "irregular", como se aplica a partículas inorgánicas, significa que la forma de partícula de una partícula a la siguiente no es uniforme (es decir, forma aleatoria de la partícula) con una relación de aspecto mayor que 1,0.

Tal como se usa en este documento, el término "alojamiento" significa un recipiente o contenedor que alberga una fase estacionaria para uso en cromatografía, e incluye cartuchos, columnas, tubos, dispositivos, lechos, y bolsas.

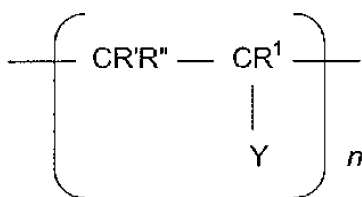
Tal como se usa en este documento, el término "fase estacionaria" o "medios de cromatografía" o "soporte de cromatografía" significa un material que muestra diferentes afinidades por diferentes componentes en una mezcla de muestra, que se utiliza en cromatografía para separar una molécula objetivo de una mezcla de una o más moléculas. Las fases estacionarias incluyen materiales orgánicos e inorgánicos, o híbridos de los mismos, y pueden estar en forma de partículas, monolitos, membranas, recubrimientos, y similares que han sido funcionalizados, como se define en el presente documento.

En una realización de la presente invención, el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una partícula que tiene una superficie de partícula; y una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales que permiten la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula formando un enlace covalente entre el primer conjunto de grupos funcionales y dicho uno o más monómeros y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula. La partícula comprende una partícula (o partículas) de sílice o gel de sílice.

En otra realización de la presente invención, el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una partícula que tiene una superficie de partícula; y una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales en la superficie de la partícula unida a al menos un polímero que se extiende desde la superficie de la partícula, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula.

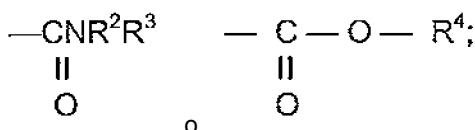
En una realización adicional de la presente invención, el material de soporte de partículas funcionalizado comprende una partícula que tiene una superficie de partícula y un tamaño de poro medio de al menos 15 nm (150 Å); y un primer conjunto de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, dicho primer conjunto de grupos funcionales en la superficie de la partícula unido a al menos un polímero que se extiende desde la superficie de la partícula. El material de soporte funcionalizado incluye un segundo conjunto de grupos funcionales que aumentan la humectabilidad de dicha superficie de partículas.

En una realización ejemplar, el segundo grupo funcional del material de soporte de partículas funcionalizado puede estar unido a uno o más monómeros o la superficie de la partícula. El primer conjunto de grupos funcionales comprende enlaces insaturados, tales como grupos vinilo, grupos alilo, grupos acrilo, grupos metacrilo, o cualquier combinación de los mismos. El segundo conjunto de grupos funcionales comprende al menos un grupo orgánico hidrófilo, tal como grupos hidroxilo, grupos diol, grupos oxietileno, grupos polietileno, grupos ácido carboxílico, grupos amina, grupos amida, o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional, el primer conjunto de grupos funcionales incluye grupos vinilo, y el segundo conjunto de grupos funcionales incluye grupos diol. En otra realización, el primer y segundo conjuntos de grupos funcionales pueden ser parte de una molécula que incluye grupos azo y grupos ácido carboxílico. En una realización adicional, al menos una parte de dicho primer conjunto de grupos funcionales se polimeriza con uno o más monómeros y uno o más monómeros espaciadores para formar cadenas poliméricas que se extienden desde la superficie de la partícula. El monómero espaciador separa uno o más monómeros entre sí, que puede ayudar en la orientación del grupo funcional sobre el polímero. Los uno o más monómeros pueden incluir monómeros aniónicos o catiónicos. En una realización donde los uno o más monómeros pueden ser un monómero aniónico, el monómero puede ser ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, y los uno o más monómeros espaciadores opcionales pueden ser metilenbisacrilamida. En una realización donde los uno o más monómeros pueden ser un monómero catiónico, los uno o más monómeros pueden incluir cloruro de 3-acrilamidopropiltrimetilamonio o cloruro de metilacrilamidopropiltrimetilamonio, y los uno o más monómeros espaciadores opcionales pueden incluir cloruro de dialildimetilamonio. En otra realización, la polimerización incluye un agente de transferencia de cadena que reduce la longitud de cadena o el peso molecular del polímero, el agente de transferencia de cadena puede incluir grupos azufre, grupos tiol carbonilo, grupos tiol éster, grupos tiol carbonato y combinaciones de los mismos. En otra realización, las cadenas de polímero comprenden unidades de repetición idénticas o diferentes de la siguiente fórmula



en donde

- 5 R^1 es H o CH_3 ;
 R' y R'' son cada uno independientemente H o CH_3 ;
 Y es



- 10 R^2 y R^3 son cada uno independientemente

- (a) alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo, alquil $1-10$ -cicloalquilo o alquilfenilo C_{1-10} ,
 (b) uno de los grupos anteriores en (a) monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o
 15 dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo, o sulfonilo,
 (c) un radical cíclico o bicíclico que tiene 5-10 átomos de C, en donde uno o más grupos CH o CH_2 están
 reemplazados con (i) N o NH, (ii) N o NH y S, o (iii) N o NH y O, o
 (d) uno de R^2 o R^3 es H;
 y en donde R^2 y R^3 se coordinan entre sí para que ambos radicales sean ácidos o básicos, o uno de los radicales
 20 sea neutro y uno sea ácido o básico; y

- R^4 es alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo o alquil C_{1-10} -cicloalquilo, o cicloalquilfenilo C_{1-10} , cada uno
 monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo o sulfonilo;
 y
 25 n es 2 a 1000.

- La presente invención se refiere además a materiales de soporte rígidos adecuados para uso en columnas de
 intercambio iónico, tales como material de soporte rígido ejemplar 151 mostrado en la **Figura 1**. Los materiales de
 soporte rígidos de la presente invención, preferentemente un soporte inorgánico, comprenden uno o más de los
 30 siguientes componentes.

- Los soportes inorgánicos adecuados para uso en la presente invención incluyen productos disponibles comercialmente
 como medios cromatográficos. El soporte inorgánico puede prepararse usando métodos conocidos en la técnica. El
 sustrato inorgánico proporciona soporte para uno o más componentes adicionales aplicados a una superficie del
 35 sustrato inorgánico. En general, el sustrato inorgánico es sílice. Las sílices adecuadas para uso en la presente
 invención tienen típicamente grupos hidroxilo libres capaces de unirse o reaccionar con otras funcionalidades
 químicas. Deseablemente, el óxido inorgánico tiene aproximadamente 1 a aproximadamente 10 grupos hidroxilo por
 nanómetro cuadrado de óxido inorgánico sólido.

- 40 Las sílices adecuadas incluyen sílice tal como sílice o gel de sílice de calidad cromatográfica. En una realización
 deseada de la presente invención, la sílice es, más deseablemente, sílice o gel de sílice de calidad cromatográfica.
 Los óxidos inorgánicos de respuesta magnética, tales como las partículas magnéticas recubiertas con óxido silíceo
 descritas en el documento WO 98/31461 también se pueden usar en la presente invención. Los óxidos inorgánicos
 mixtos, por ejemplo cogeles o coprecipitados de sílice y alúmina, también se pueden usar.

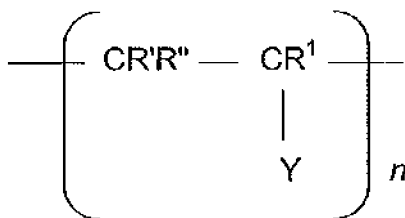
- 45 Los óxidos inorgánicos sólidos pueden estar en forma física de partículas, placas de fibras, o una combinación de las
 mismas. Deseablemente, los óxidos inorgánicos sólidos están en forma física de partículas o partículas que tienen
 una forma sustancialmente esférica. Independientemente de la forma física, los óxidos inorgánicos sólidos tienen
 típicamente una dimensión más larga (es decir, longitud, ancho o diámetro) de hasta aproximadamente 150
 50 micrómetros (μm). Cuando el óxido metálico inorgánico sólido comprende una pluralidad de partículas que tienen una
 forma sustancialmente esférica, la pluralidad de partículas tiene deseablemente un diámetro medio de partícula que
 varía de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 120 μm . En una realización deseada de la presente invención,
 el óxido metálico inorgánico sólido comprende una pluralidad de partículas de sílice o gel de sílice que tienen una
 forma sustancialmente esférica, en donde la pluralidad de sílice o partículas de gel de sílice tienen un diámetro medio
 55 de partícula que varía de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 130 μm , o de aproximadamente 20 μm a

aproximadamente 120 μm .

Se puede usar una variedad de óxidos inorgánicos sólidos comercialmente disponibles en la presente invención. Los óxidos inorgánicos sólidos adecuados incluyen partículas de sílice comercialmente disponibles en WR Grace & Co., (Columbia, MD) bajo la denominación comercial DAVISIL®, que tienen forma irregular con un tamaño de poro mediana de aproximadamente 30 nm (300 Å) a aproximadamente 300 nm (3000 Å), deseablemente de aproximadamente 50 nm (500 Å) a aproximadamente 150 nm (1500 Å), o sílice VYDAC® con forma esférica y un tamaño de poro mediana de aproximadamente 30 nm (300 Å). En una realización deseada de la presente invención, La sílice VYDAC® que tiene una forma esférica y un tamaño de poro mediana inicial de aproximadamente 30 nm (300 Å) se usa después de modificarse para aumentar el tamaño de poro mediana a aproximadamente 80 nm (800 Å). Los materiales híbridos incluyen partículas híbridas de sílice puenteadas con etileno fabricadas por el método sol-gel, tal como partículas Xterra® disponibles en Waters Corp.

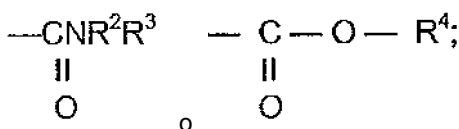
Las superficies de los soportes inorgánicos descritos anteriormente se tratan o modifican (es decir, funcionalizan) para reducir la unión inespecífica, unión no selectiva y/o adsorción de moléculas no objetivo (es decir, unión no específica de materiales distintos de la molécula objetivo) y moléculas objetivo específicas de ligando (es decir, unión no específica de la molécula objetivo (es decir, ligato) a sitios reactivos distintos de los sitios reactivos proporcionados por uno o más ligandos sobre el sustrato inorgánico. La superficie de soporte modificada resultante tiene (i) menos afinidad por moléculas no objetivo (es decir, materiales distintos de la molécula objetivo) debido a la presencia de grupos R relativamente inertes en la superficie inorgánica, y (ii) una cantidad controlada de sitios reactivos que se unen selectivamente a uno o más ligandos (descritos posteriormente) a la superficie del sustrato inorgánico directamente o a través de un conector. La cantidad de sitios reactivos que se unen selectivamente a uno o más ligandos conduce a unión selectiva, controlada de una o más moléculas de interés a uno o más ligandos unidos a la superficie de soporte inorgánico.

La presente invención se refiere además a métodos para fabricar el material de soporte de partículas funcionalizado descrito anteriormente. En otra realización, la presente invención incluye un método para fabricar un material de soporte de partículas funcionalizado tratando una superficie de partícula de una partícula para resultar en una combinación de grupos funcionales que se extienden desde la superficie de la partícula, comprendiendo la combinación de grupos funcionales (i) un primer conjunto de grupos funcionales que permiten la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula a través del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que aumenta la humectabilidad de la superficie de la partícula. En otra realización, la etapa de tratamiento puede incluir exponer la superficie de la partícula a (i) al menos un silano que tiene un grupo funcional del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) al menos un silano que tiene un grupo funcional del segundo conjunto de funcionales grupos. En otra realización, la etapa de tratamiento une al menos uno del primer conjunto de grupos funcionales o segundo conjunto de grupos funcionales a la superficie de la partícula seguido de la polimerización. En una realización ejemplar, el segundo grupo funcional del material de soporte de partículas funcionalizado puede estar unido a uno o más monómeros o la superficie de la partícula. El primer conjunto de grupos funcionales comprende enlaces insaturados, tales como grupos vinilo, grupos alilo, grupos acrílico, grupos metacrílico, o cualquier combinación de los mismos. El segundo conjunto de grupos funcionales comprende al menos un grupo orgánico hidrófilo, tal como grupos hidroxilo, grupos diol, grupos oxietileno, grupos polietileno, grupos ácido carboxílico, grupos amina, grupos amida, o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional, el primer conjunto de grupos funcionales incluye grupos vinilo, y el segundo conjunto de grupos funcionales incluye grupos diol. En otra realización, el primer y segundo conjuntos de grupos funcionales pueden ser parte de una molécula que incluye grupos azo y grupos ácido carboxílico. En otra realización ejemplar, la superficie de la partícula se trata adicionalmente antes de la polimerización con una sal de amonio cuaternario (por ejemplo, cloruro de tetrametilamonio) o un catión de amonio cuaternario (por ejemplo, un catión de tetrametilamonio), que posteriormente se retira de la superficie de la partícula por lavado. En una realización adicional, al menos una parte de dicho primer conjunto de grupos funcionales se polimeriza con uno o más monómeros y uno o más monómeros espaciadores para formar cadenas poliméricas que se extienden desde la superficie de la partícula. Los uno o más monómeros pueden incluir monómeros aniónicos o catiónicos. En una realización donde los uno o más monómeros pueden ser un monómero aniónico, el monómero puede ser ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico, y los uno o más monómeros espaciadores opcionales pueden ser metilénbisacrilamida. En una realización donde los uno o más monómeros pueden ser un monómero catiónico, los uno o más monómeros pueden incluir cloruro de 3-acrilamidopropiltrimetilamonio o cloruro de dialildimetilamonio. En otra realización, la polimerización incluye un agente de transferencia de cadena que reduce la longitud de cadena o el peso molecular del polímero, el agente de transferencia de cadena puede incluir grupos azufre, grupos tiol carbonilo, grupos tiol éster, grupos tiol carbonato y combinaciones de los mismos. En otra realización, las cadenas de polímero comprenden unidades de repetición idénticas o diferentes de la siguiente fórmula



en donde

- 5 R^1 es H o CH_3 ;
 R' y R'' son cada uno independientemente H o CH_3 ;
 Y es qq



- 10 R^2 y R^3 son cada uno independientemente

- 15 (a) alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo, alquil $1-10$ -cicloalquilo o alquilfenilo C_{1-10} ,
 (b) uno de los grupos anteriores en (a) monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o
 dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo, o sulfonilo,
 (c) un radical cíclico o bicíclico que tiene 5-10 átomos de C, en donde uno o más grupos CH o CH_2 están
 reemplazados con (i) N o NH, (ii) N o NH y S, o (iii) N o NH y O, o
 (d) uno de R^2 o R^3 es H;
 y en donde R^2 y R^3 se coordinan entre sí para que ambos radicales sean ácidos o básicos, o uno de los radicales
 sea neutro y uno sea ácido o básico; y

- 20 R^4 es alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo o alquil C_{1-10} -cicloalquilo, o cicloalquilfenilo C_{1-10} , cada uno
 monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo o sulfonilo;
 y
 n es 2 a 1000.

En otra realización ejemplar, la superficie de la partícula se trata adicionalmente después de la polimerización para
 eliminar cualquier polímero o monómero no unido, exponiendo la superficie de la partícula a una solución salina, tal
 como una solución de cloruro sódico al 5 % en peso.

En otra realización ejemplar de la invención, el contenido de carbono en la superficie de la partícula después de la
 etapa de tratamiento es menor o igual a aproximadamente el 3,5 %, o menor o igual a aproximadamente el 3,0 % en
 peso, o menor o igual a aproximadamente el 2,5 % en peso, o menor o igual a aproximadamente el 2,0 % en peso, o
 menor o igual a aproximadamente el 1,5 % en peso, basado en el peso total de la partícula, después de secarse
 durante la noche a 70 °C. En una realización ejemplar adicional de la presente invención, el contenido de carbono en
 la superficie de la partícula después de la etapa de polimerización es al menos aproximadamente el 3,5 % en peso, o
 al menos aproximadamente el 4,0 % en peso, o al menos aproximadamente el 4,5 % en peso, o al menos
 aproximadamente el 5,0 % en peso, o al menos aproximadamente el 5,5 % en peso, basado en el peso total de la
 partícula, después de secarse durante la noche a 70 °C. En una realización ejemplar adicional según la presente
 invención, la relación del contenido de carbono en la superficie de la partícula después de la etapa de polimerización
 en comparación con el contenido de carbono en la superficie de la partícula después de la etapa de tratamiento es al
 menos aproximadamente 1,5, o al menos aproximadamente 2,0, o al menos aproximadamente 2,5, o al menos
 aproximadamente 3,0, o al menos alrededor de 3,5, o al menos alrededor de 4,0.

La presente invención se refiere a columnas de intercambio iónico, tal como la columna de intercambio iónico 11
 ejemplar mostrado en la **Figura 1**, que comprende uno o más de los siguientes componentes. Tal como se usa en
 este documento, el término "columna de intercambio iónico" incluye columnas que tienen uno o más de los siguientes
 componentes, incluyendo columnas de intercambio iónico tales como columnas de intercambio aniónico o catiónico.

Las columnas de intercambio iónico de la presente invención comprenden una estructura de columna que tiene
 dimensiones deseadas, volumen de la columna, e integridad estructural. Normalmente, la estructura de columna
 comprende una estructura tubular que tiene tapas extremas extraíbles en ambos extremos de la estructura tubular.
 Las tapas extremas forman un sello a prueba de fugas con la estructura tubular para evitar que el material se escape

indeseablemente de la estructura tubular. Una columna de intercambio iónico ejemplar **100** de la presente invención se muestra en la **Figura 1**.

La **Figura 1** Proporciona una vista de una columna de cromatografía ejemplar **100** de la presente invención. Como se muestra en la **Figura 1**, la columna de cromatografía ejemplar **100** comprende un alojamiento de columna **150**; y espacio de lecho de medios **151** situado dentro del alojamiento de columna **150**. Deseablemente, los medios **151** comprenden partículas inorgánicas porosas que tienen un tamaño de poro mediana de al menos 10 Angstroms (Å). Como se muestra más adelante en la **Figura 1**, el alojamiento de columna **150** típicamente comprende un miembro de alojamiento tubular **156**, una primera tapa tubular de miembro tubular **152**, una segunda tapa extrema de alojamiento tubular **153** opuesta a la tapa extrema **152**, una entrada de columna **154**, y una salida de columna **155**. La columna **100** puede empaquetarse con partículas inorgánicas porosas en forma de suspensión mediante la entrada de columna **154**, comprendiendo la entrada de la columna un agujero central **157** que tiene un pasaje en el mismo, y la boquilla **158**. Se puede usar una amplia diversidad de boquillas que facilitan la distribución e incluso el empaquetado de la suspensión dentro del espacio de lecho. Se sitúan filtros **159** situados cada uno en la cara interior de las tapas extremas **152**, **153** y actúan con el miembro tubular **156** para definir el espacio de lecho **151** y también para evitar la fuga de partículas del espacio de lecho **151**. Un canal de distribución **160** está situado transversalmente en la cara de la primera tapa lateral **152** y/o segunda tapa extrema **153**, y está en comunicación fluida con el filtro **159**. El canal de distribución de fluidos **160** actúa para facilitar la distribución radial del líquido. En una forma sencilla, el canal de distribución **160** comprende al menos un surco circunferencial y/o radial en la cara de la primera y/o segunda tapas extremas **152** y **153**. El surco se coloca de modo que afecte la distribución circunferencial y/o radial del líquido que emana de la boquilla **158** de la entrada **154**. Se entenderá que es posible una amplia gama de capacidades de columna, oscilando típicamente entre 0,1 y 2000 litros y entre 0,1 y 100 litros cuando se utiliza la columna como columna desechable. Véase también el documento WO 2008/0017579.

El alojamiento de la columna **150** puede estar formado por una variedad de materiales. Normalmente, el alojamiento de columna **150** comprende un material polimérico, un material metálico, un material de vidrio, un material cerámico, o un compuesto de los mismos, y deseablemente, comprende un material polimérico. Materiales poliméricos adecuados para formar un alojamiento de columna **150** incluyen cualquier sólido orgánico sintético o semisintético, tal como plástico, que son moldeables, incluyendo poliolefinas.

El alojamiento de columna **150** puede formarse utilizando técnicas de termoformado convencionales. Por ejemplo, el miembro de alojamiento tubular **156**, la primera tapa extrema del miembro de alojamiento tubular **152**, y la segunda tapa extrema del miembro de alojamiento tubular **153** del alojamiento de columna **150** pueden formarse cada una independientemente mediante una etapa de moldeo. En algunas realizaciones, el miembro de alojamiento tubular **156** y uno de (i) la primera tapa extrema del miembro de alojamiento tubular **152** y (ii) la segunda tapa extrema del miembro de alojamiento tubular **153** del alojamiento de columna **150** se forman mediante una única etapa de moldeo (es decir, una de las tapas extremas está formada integralmente en un extremo del miembro de alojamiento tubular **156**).

La estructura tubular **150** puede estar hecha de una variedad de materiales y tener una construcción de pared para soportar un rendimiento relativamente alto dentro de la estructura tubular **150**. Deseablemente, la estructura tubular **150** tiene una integridad estructural que soporta una presión constante de hasta aproximadamente 400×10^5 Pa (6000 psi) (400 bar), más deseablemente, desde aproximadamente 1×10^5 Pa (15 psi) (1 bar) a aproximadamente 300×10^5 Pa (4500 psi) (300 bar). Los materiales adecuados para formar la estructura tubular **150** incluyen polímeros tales como polieterecetona (PEEK) y polipropileno; metales tales como acero inoxidable; y materiales inorgánicos tales como vidrio. En una realización deseada de la presente invención, la estructura tubular **150** comprende polieterecetona (PEEK) o policaprolactona.

La estructura tubular **150** puede tener dimensiones que varían en función de una serie de factores que incluyen tamaño de partícula y geometría, caudal, volumen de inyección, número de placas requerido, etc. Típicamente, la estructura tubular **150** tiene una sección transversal circular, un diámetro exterior que varía entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 5000 mm, un diámetro interno que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 4000 mm, y una longitud total que varía de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 5000 mm.

Las tapas extremas **152** y **153** para uso con estructura tubular **150** se forman típicamente de PEEK, y tienen dimensiones para formar un sello a prueba de fugas con los extremos de estructura tubular **150**.

Cabe señalar que aunque se desean estructuras tubulares que tienen un área de sección transversal circular, las estructuras tubulares que tienen otra área de sección transversal también están dentro del alcance de la presente invención. Las configuraciones de sección transversal adecuadas para una variedad de estructuras tubulares incluyen configuraciones de sección transversal cuadrada, rectangular, triangular, oblonga, pentagonal y hexagonal.

Las columnas y los cartuchos de cromatografía de la presente invención se pueden preparar usando los siguientes pasos:

- (1) sellar un primer extremo de una estructura tubular;
- (2) rellenar al menos parcialmente una cavidad de columna de la estructura tubular con un material de soporte

rígido, tal como cualquiera de los materiales de soporte rígidos descritos anteriormente;

(3) rellenar al menos parcialmente la cavidad de la columna de estructura tubular con una primera solución tampón para encapsular el material de soporte rígido; y, opcionalmente

(4) sellar el extremo opuesto (es decir, el segundo extremo) de la estructura tubular.

5

La columna de intercambio iónico puede almacenarse para uso futuro o puede conectarse posteriormente a un aparato que comprende uno o todos los componentes de aparato descritos anteriormente.

10

La presente invención se refiere además a métodos de separación de muestras que potencialmente contienen una o más moléculas de interés. En una realización ejemplar de la presente invención, el método comprende la etapa de (a) introducir la muestra en una columna de intercambio iónico que contiene un soporte rígido, en donde el soporte rígido comprende una pluralidad de partículas de óxido metálico inorgánico, en donde cada partícula comprende (i) un sustrato de óxido metálico; (ii) una superficie de sustrato modificada que reduce la unión no específica de materiales de moléculas no objetivo (es decir, unión no específica de materiales distintos de las moléculas objetivo) y moléculas objetivo específicas de ligando (es decir, unión no específica de las moléculas objetivo a sitios reactivos distintos de los sitios reactivos proporcionados por uno o más ligandos) al sustrato inorgánico; y (iii) uno o más ligandos unidos al sustrato inorgánico.

15

20

En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para aislar una molécula objetivo de una mezcla que comprende: a) poner en contacto la mezcla que contiene la molécula objetivo con una matriz de cromatografía de intercambio iónico donde la matriz comprende 1) un soporte sólido que comprende una partícula de sílice que tiene un tamaño de poro mediana mayor que 15 nm (150 Å) y menor que 600 nm (6000 Å) y un tamaño mediana de partícula superior a 20 micrómetros y 2) ligando de intercambio iónico que tiene especificidad por la molécula objetivo unida al soporte sólido; y b) eluir la molécula objetivo de la matriz de cromatografía de intercambio iónico.

25

30

En otras realizaciones más, la invención proporciona un método para aislar una molécula objetivo de una mezcla que comprende: a) poner en contacto la mezcla que contiene la molécula objetivo con una matriz de cromatografía, en donde la matriz de cromatografía de intercambio iónico está contenida dentro de un alojamiento, tal como una columna, y en donde la columna empaquetada con la matriz de cromatografía de intercambio iónico tiene un caudal máximo de al menos 400 cm/h, y en donde la matriz comprende 1) una partícula de sílice y 2) un ligando de intercambio iónico que tiene especificidad por la molécula objetivo, en donde la capacidad dinámica de la matriz para la molécula objetivo es de al menos 45 g/litro con una ruptura del 10 %; y opcionalmente b) eluir la molécula objetivo de la matriz de cromatografía de intercambio iónico.

35

40

En otras realizaciones más, la invención proporciona un sistema para aislar una molécula objetivo de una mezcla que comprende a) una matriz de cromatografía de intercambio iónico donde la matriz comprende un soporte sólido que comprende 1) una partícula de sílice que tiene un tamaño de poro mayor que 15 nm (150 Å) y menor que 600 nm (6000 Å) y un tamaño de partícula mediana mayor que 20 micrómetros y menor que 120 micrómetros y 2) un ligando de intercambio iónico que tiene especificidad por la molécula objetivo unida al soporte sólido; y b) un alojamiento para contener la matriz de cromatografía de intercambio iónico. El sistema puede incluir opcionalmente un medio para detectar la elución de la molécula objetivo de la matriz de cromatografía de intercambio iónico.

45

50

En realizaciones adicionales, la invención proporciona un sistema para aislar una molécula objetivo de una mezcla que comprende a) una matriz de cromatografía de intercambio iónico en la que la matriz de cromatografía de intercambio iónico está contenida dentro de un alojamiento, tal como una columna, en donde la columna empaquetada con la matriz de cromatografía de intercambio iónico tiene un caudal máximo de al menos 400 cm/h, y en donde la matriz comprende 1) una partícula de sílice y 2) un ligando de intercambio iónico que tiene especificidad por la molécula objetivo en donde la capacidad dinámica de la matriz para la molécula objetivo es de al menos 45 g/litro. El sistema puede incluir opcionalmente un medio para detectar la elución de la molécula objetivo de la matriz de cromatografía de intercambio iónico.

55

En otras realizaciones, la invención proporciona un recipiente que comprende una matriz de cromatografía de intercambio iónico que comprende una partícula de sílice que tiene un tamaño de poro mediana mayor que 15 nm (150 Å) y menor que 600 nm (6000 Å) y un tamaño medio de partícula mayor que 20 micrómetros y menor que 120 micrómetros y al menos un recipiente.

60

En realizaciones adicionales la invención proporciona un dispositivo que comprende una matriz de cromatografía de intercambio iónico, en donde la matriz de cromatografía de intercambio iónico está contenida dentro de un alojamiento, tal como una columna, en donde la columna empaquetada con la matriz de cromatografía de intercambio iónico tiene un caudal máximo de al menos 400 cm/h, y en donde la matriz comprende 1) una partícula de sílice y 2) un ligando de intercambio iónico que tiene especificidad por la molécula objetivo en donde la capacidad dinámica de la matriz de la molécula objetivo es al menos 45 g/litro y al menos un recipiente.

65

El método para separar una muestra puede comprender las etapas de (a) permitir que la muestra entre en contacto con el soporte rígido y los ligandos sobre el mismo; (b) aclarar el soporte rígido para eliminar cualquier componente de la muestra que no se adhiera a los ligandos; (c) introducir una solución de eluyente en la columna de intercambio

iónico para que la solución de eluyente entre en contacto con una o más moléculas unidas a los ligandos en el soporte rígido; (d) permitir que la solución de eluyente permanezca en contacto con el soporte rígido durante un período de tiempo para formar una muestra de eluyente que contenga potencialmente una o más moléculas; y (e) separar los contenidos de la columna para determinar la presencia de una o más moléculas en la muestra.

5 En esta realización, el método para separar una muestra de eluyente en donde la columna de intercambio iónico está en comunicación fluida con la columna de intercambio iónico, el método puede comprender además una o más de las siguientes etapas:

- 10 (1) introducir una muestra en una columna de intercambio iónico que contiene un soporte rígido capaz de soportar una presión de columna de hasta aproximadamente 200×10^5 Pa (200 bar), en donde el soporte rígido tiene uno o más ligandos unidos al mismo, en donde uno o más ligandos son capaces de unirse selectivamente a una o más moléculas;
- (2) permitir que la muestra entre en contacto con el soporte rígido y los ligandos sobre el mismo;
- 15 (3) aclarar el soporte rígido para lavar cualquier componente de la muestra que no sea una o más moléculas objetivo;
- (4) introducir una solución de eluyente en la columna de intercambio iónico para que la solución de eluyente entre en contacto con una o más moléculas objetivo unidas a los ligandos en el soporte rígido; y
- 20 (5) permitir que la solución de eluyente permanezca en contacto con el soporte rígido durante un período de tiempo para formar la muestra de eluyente. Normalmente, la solución de eluyente permanece en contacto con el soporte rígido durante un período de tiempo comprendido entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 4 horas.

La presente invención se describe anteriormente y se ilustra adicionalmente a continuación por medio de ejemplos, que no deben interpretarse de ninguna manera como impositivos de limitaciones para el alcance de la invención.

25 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen procesos de acuerdo con la presente invención para preparar medios de cromatografía que tienen superficies funcionalizadas, incluyendo intercambio iónico, pero se puede usar otra funcionalización superficial. Una realización de la presente invención mostrada en los ejemplos se refiere al material de intercambio iónico basado en medios inorgánicos porosos, que fue preparado mediante un proceso que consistió en dos etapas principales: (1) unión de sílice de poro grande con dos silanos: (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano y metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo para formar un intermedio inicialmente unido; y (2) polimerización en solución de monómero(s) iónico(s), con un iniciador azoico, en presencia del intermedio de sílice inicialmente unido para medios de intercambio aniónico fuerte (sílice Q) o medios de intercambio catiónico fuerte (sílice S).

Otra realización de la invención mostrada en los ejemplos fue un proceso para preparar sílice Q en donde, los monómeros utilizados fueron cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio, una pequeña cantidad de solución de cloruro de dialildimetilamonio, y el iniciador es diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (iniciador V-50).

Otra realización de la invención mostrada en los ejemplos es un proceso para la preparación de sílice S. El proceso incluyó una etapa adicional de lavado del intermedio inicialmente unido con solución de cloruro de tetrametilamonio que se añade para ayudar a la polimerización. En esta realización de polimerización, el monómero es ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS), y el iniciador es 4,4'-azobis(ácido cianovalérico) (iniciador V-501). Esta polimerización utiliza un agente de transferencia de cadena (CTA), por ejemplo, S,S'-bis(ácido α,α' -dimetil- α -acético)-tritiocarbonato, que está disponible en ABCR GmbH KG. La función de CTA es controlar la longitud de la cadena de polimerización y ayudar a reducir cualquier bloqueo de los poros (véase la **Figura 2**). Este proceso es esencialmente una polimerización por transferencia de cadena de fragmentación por adición inversa (RAFT), un proceso de polimerización radicalaria viva.

Muchos tipos diferentes de partículas porosas fueron funcionalizados mediante estos procesos. En algunos de Ejemplos, se utilizó gel de sílice, que eran geles de sílice que tenían un tamaño de partícula de 75 micrómetros con tamaños de poro mediana de 25, 50, 80, 100 nm (250, 500, 800, 1000 Å). Los geles de sílice se prepararon utilizando el siguiente procedimiento: se colocaron 190 g de una solución de ácido sulfúrico al 19 % en un reactor equipado con un agitador superior y se enfrió a 5 °C. Por separado, también se enfriaron 263 g de una solución de silicato sódico (22,9 % de SiO₂) a 5 °C. Después, la solución de silicato sódico se añadió a la solución de ácido sulfúrico a través de una bomba a una velocidad tal que se añade la cantidad total de silicato en 15 minutos. Durante la adición, la temperatura se mantuvo a 5 °C. Después de completar la adición, el reactor se calentó a temperatura ambiente y los contenidos se dejaron gelificar sin agitar. Tras la gelificación, la masa de gel se cortó en trozos pequeños y se sumergió en agua, para eliminar el sulfato sódico formado durante la reacción. El nivel de sulfato sódico restante en el material se verificó periódicamente, a medida que se drenaba el agua de lavado y se añadía agua reciente al gel. Cuando el nivel cayó por debajo del 1 %, el gel se suspendió en agua y el pH del líquido se ajustó a pH = 9,7 y la solución se calentó a 67 °C. La temperatura se mantuvo durante 20 horas y 20 minutos. Al final del período de calentamiento, el gel se recuperó por filtración y se secó en un horno a 160 °C hasta que el contenido de humedad del gel fue inferior a aproximadamente 5 % en peso. El gel de sílice así obtenido tenía una superficie BET de nitrógeno de 325 m²/g y un volumen de poro de nitrógeno de 1,24 cc/g. Suponiendo poros cilíndricos y utilizando la ecuación: Tamaño de poro

(Angstroms) = 40000XPV/SA este material exhibe un tamaño de poro de 15,3 nm (153 Angstroms). Posteriormente, el gel se muele al tamaño de partícula deseado (75 micrómetros) usando un ACM y luego se trata hidrotérmicamente en una autoclave a 300 °C hasta que se alcanza el tamaño de poro deseado.

5 Los tamaños de partícula informados en los Ejemplos se determinaron mediante dispersión de luz usando un Malvern Mastersizer 2000 disponible de Malvern Instruments Ltd. según ASTM B822-10. Las distribuciones de tamaño de poro se miden por intrusión de mercurio usando un Autopore IV 9520 disponible en Micromeritics Instrument Corp. y por BET de nitrógeno utilizando un Tristar 3000 también disponible en Micromeritics Instrument Corp. Los volúmenes de poro referidos en este documento representan intrusión de mercurio en poros de 1.000 nm (10.000 Å) e inferiores. Las áreas superficiales BET también se obtienen del análisis de adsorción de nitrógeno. El análisis elemental del contenido de carbono y azufre se realizó utilizando un analizador de carbono y azufre SC-632 de LECO disponible en LECO Corp. El peso molecular promedio se determinó mediante análisis de GPC usando un GPCV 2000 con RI y detección viscométrica disponible en Waters Corp. La pureza de la sílice se midió mediante plasma acoplado inductivamente (ICP) utilizando un ICPE-9000 disponible en Shimadzu Corp.

15 El peso molecular de las muestras de los Ejemplos 11-24 se determinó utilizando el siguiente procedimiento: se pesaron muestras de sílice funcionalizada superficialmente de 0,5 gramos en un tubo de centrifuga de 50 ml y se agregaron 10 ml de agua desionizada, seguido de 2,2 ml de ácido fluorhídrico al 48 %, y después de mezclar bien, y las muestras se dejaron reposar durante 30 minutos. Después de eso, se añadió ácido bórico, 3,5 gramos, para secuestrar fluoruro libre y las muestras se colocaron en un agitador de acción de muñeca durante 60 minutos. Después de centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,2 µm con vacío, se recogió el sobrenadante claro para análisis. Los sobrenadantes se sometieron a análisis de cromatografía de permeación de gel (GPC) utilizando un GPCV 2000 con RI y detección viscométrica disponible en Waters Corp. que incluía una columna protectora Ultrahydrogel y 120, 250 y 1000 columnas. Las soluciones anteriores se inyectaron en nitrato potásico acuoso al 1 % en fase móvil con un sistema de HPLC de Waters equipado con un detector de RI. Los pesos moleculares de las soluciones se determinaron utilizando polietilenglicol y óxido de polietileno como patrones de calibración. Los pesos moleculares para los polímeros anteriores estaban por debajo de aproximadamente 200-300 KD.

30 Las pruebas de unión estática para Q se realizaron utilizando BSA (concentración de 25 mg/ml en tampón) a un pH de 8,0 con tampón Tris HCl 50 mM. El tampón de unión/lavado fue Tris-HCl 50 mM a un pH de 8,0 y el tampón de elución fue 50 mM/Tris-HCl/NaCl 1 M a un pH de 8,0. Las muestras de sílice secas se pesaron en viales y luego se agregaron soluciones de proteínas en un tampón de unión. Después de adsorción durante la noche, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se separó/desechó. La muestra de sílice se lavó tres veces con tampón de lavado con centrifugación y separación. Después de las etapas de lavado, se añadió tampón de elución y se repitió la elución una segunda vez. La adsorción UV/Vis se midió para la solución de elución combinada a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S Bio UV-Vis disponible en Thermo Fisher Scientific Inc.

40 Las pruebas de unión estática para S se realizaron utilizando lisozima de clara de huevo de pollo o gammaglobulina bovina (concentración de 25 mg/ml en tampón) a un pH de 4,0 con tampón HOAc/NaOAc 50 mM. El tampón de unión/lavado fue HOAc/NaOAc 50 mM a un pH de 4,0 y el tampón de elución fue NaCl 1 M en HOAc/NaOAc M 50 mM a un pH de 4,0. Las muestras de sílice secas se pesaron en viales y luego se agregaron soluciones de proteínas en un tampón de unión. Después de adsorción durante la noche, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se separó/desechó. La muestra de sílice se lavó tres veces con tampón de lavado con centrifugación y separación. Después de las etapas de lavado, se añadió tampón de elución y se repitió la elución una segunda vez. La adsorción UV/Vis se midió para la solución de elución combinada a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S Bio UV-Vis disponible en Thermo Fisher Scientific Inc.

50 Las pruebas de unión dinámica se realizaron utilizando columnas de vidrio Omni con un diámetro de 0,66 cm. Para 2 ml de columna, la longitud de la columna fue de aproximadamente 5,8 cm. Las muestras de sílice se delimitaron con agua DI, y luego la columna se empaquetó en suspensión con FPLC Akta y a una velocidad lineal de aproximadamente 4000 cm/h. Para la curva de ruptura para Q, la proteína BSA en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (o lisozima o gammaglobulina en tampón HOAc/NaOAc 50 mM pH 4,0 para S) se pasó a través de una columna con Akta a aproximadamente 500 o 1000 cm/h. Las señales UV-Vis a 280 nm se midieron utilizando un UV900 disponible en General Electric, y los cromatogramas se registraron y se representaron con Microsoft Excel. Las Capacidades de Unión Dinámica (DBC) se calcularon en un punto de ruptura del 5 % utilizando las siguientes ecuaciones:

$$DBC = \frac{(\text{volumen a 5 \% de ruptura} - \text{volumen del sistema}) \times \text{concentración de proteína}}{\text{Volumen de columna}}$$

Los resultados se registraron en las tablas siguientes.

La **Figura 2** demuestra las rutas sintéticas generales para hacer materiales de sílice Q y S.

Ejemplos 1-10

65 Se prepararon muestras de partículas de sílice porosas inicialmente unidas tratando las partículas con el agente de

tratamiento 1 (vinil silano), que es metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo y/o agente de tratamiento 2 (epoxi silano), que es (3-glicidoxipropil)trimetoxisilano. Los vinil y epoxi silanos se premezclaron. Un matraz de fondo redondo cargado con partículas porosas y la cantidad de mezcla de agente de tratamiento se añadió en el matraz. La mezcla se dejó reaccionar durante una noche. Se añadió ácido sulfúrico 0,5 M en una cantidad de 1/10 de sílice (en peso). La mezcla se procesó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. Se dejó enfriar el matraz y luego se empapó la sílice con ácido sulfúrico 1 M durante 30 minutos y luego se filtró. Luego se lavó con agua desionizada cinco veces, se filtró y se secó a 70 °C durante la noche. Las muestras resultantes se enviaron para análisis elemental (LECO) para el porcentaje de carbono en sílice y se etiquetaron Ejemplos 1-10, respectivamente. Los resultados de estos ejemplos se registran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

N.º de ejemplo	Tamaño de partícula (µm)	Tamaño de poro central nm (Å)	Área superficial (m²/g)	Cantidad de partículas (g)	Cantidad de epoxi silano (g)	Cantidad de vinil silano (g)	C% unión inicial
1	75	100 (1000)	45	100	9	9	2,75
2	75	100 (1000)	45	4000	240	240	2,29
3	75	100 (1000)	45	200	0	20	3,05
4	75	100 (1000)	45	40	0,5	0,5	0,92
5	75	100 (1000)	45	100	1,2	1,2	0,77
6	75	100 (1000)	45	200	2,5	2,5	0,63
7	75	80 (8009)	61	200	2,5	2,5	0,82
8	75	50 (500)	72	40	1,5	1,5	2,31
9	75	50 (500)	72	40	0,5	0,5	0,93
10	75	25 (250)	297	150	7,5	7,5	2,42

Excepto en el Ejemplo 3, se utilizaron cantidades iguales de dos silanos para estas funcionalizaciones y las cantidades de carbono obtenidas fueron en general proporcionales a las cantidades totales de silanos utilizadas. En el Ejemplo 3, solo se usó vinil silano para la unión en seco. Como se demuestra en la Tabla 1, la cantidad de carbono, medida por análisis elemental de las muestras de sílice limpia y seca después del proceso de unión, se usó como indicador para determinar la cantidad de grupos funcionales superficiales después de la funcionalización superficial.

Ejemplos 11-24

Los ejemplos 11-28 describen un proceso de preparación de materiales de intercambio aniónico fuerte (Tabla 2). En estos ejemplos, la sílice inicialmente unida de los Ejemplos 1-10 se trató superficialmente utilizando un primer monómero: Cloruro de (3-acrilamidopropil)trimetilamonio (solución acuosa al 75 %); un monómero alternativo 1: Cloruro de [3-(metacriloilamino)propil]trimetilamonio (solución acuosa al 50 %); un monómero alternativo 2: Cloruro de [2-(acrililoxi)etil]trimetilamonio (solución acuosa al 80 %); un segundo monómero: Cloruro de dialildimetilamonio (solución acuosa al 65 %); Iniciador V-50; y agua desionizada adicional (DIW).

Se equipó un matraz de fondo redondo de tres bocas con un agitador mecánico superior con ajuste hermético al gas, una entrada y salida de gas nitrógeno, y una manta calefactora con retroalimentación de termopar. La sílice y todos los reactivos excepto el iniciador se cargan primero en el matraz. El sistema se burbujeó con nitrógeno durante 20 minutos. Luego se introdujo el iniciador. Se burbujeó nitrógeno durante otros 20 minutos antes de que el matraz se calentara gradualmente a 65 °C. La mezcla se mantuvo a 65 °C durante 2 horas con agitación superior y luego se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en una solución de NaCl al 5 % en un vaso de precipitados. El matraz se enjuagó con agua DI para mover completamente la sílice residual dentro del matraz. Después de agitar la mezcla con un agitador superior durante unos minutos, se filtró y el lavado se repitió tres veces con NaCl al 5 % y tres veces con agua DI. Las muestras se dejaron secar al aire, excepto que se secó una pequeña cantidad de sílice a 90 °C durante la noche y luego se envió para un análisis elemental del contenido de carbono. Las capacidades de unión se calcularon para la muestra descrita en este documento anteriormente. Las muestras resultantes se etiquetaron Ejemplos 11-24. Los resultados analíticos y las capacidades de unión para estos Ejemplos se registraron en la siguiente Tabla 2:

Tabla 1

N.º de ejemplo	Sílice (n.º de la Tabla 1)	Cantidad de sílice (g)	Proporción de reactivos (sílice/monómero/2º monómero/iniciador/DIW)	C% _{unión inicial}	C% _{final}	C% de polímero (C% _{final} - C% _{unión inicial})	Proporción C _{poli} /C _{unión inicial}	Capacidades de unión para proteína BSA (mg/ml)
11	1	10	1:0,5:0,04:0,0045:6,5	2,75	4,46	1,71	0,62	70 (D)
12	2	2000	1:0,62:0,043:0,0046:4,0	2,29	6,24	3,88	1,72	103 (D)
13	3	60	1:0,62:0,043:0,0042:3,33	3,05	3,05	0	0	n/m
14	2	20	1:0,62:0,021:0,005:6	2,29	6,08	3,83	1,7	83 (S)
15	2	20	1:0,62:0,0,0032:6	2,29	6,05	3,80	1,7	76 (S)
16	4	30	1:0,82:0,043:0,0046:6,66)	0,92	5,01	4,09	4,4	142 (S)
17	5	30	1:0,83 (monómero alternativo 1): 0,043:0,046:6,66	0,77	5,92	5,15	6,7	154 (S); 99 (D)
18	5	30	1:0,83 (monómero alternativo 2): 0,043:0,046:6,66	0,77	3,09	2,32	3,0	94 (S)
19	6	30	1:0,82:0,043:0,0046:6,66)	0,63	4,73	4,1	6,5	139 (S)
20	6	30	1:0,83 (monómero alternativo 1): 0,043:0,046:6,66	0,63	4,77	4,14	6,6	145 (S)
21	7	30	1:0,82:0,043:0,0023:6,66)	0,82	5,06	4,24	5,2	163 (S); 120 (D)
22	8	30	1:0,82:0,043:0,0046:6,66)	2,31	6,03	5,10	5,5	142 (S)
23	9	30	1:0,82:0,043:0,0046:6,66)	0,93	6,95	4,64	2,0	136 (S)
24	10	30	1:0,75:0,036:0,0033:6,66	2,42	10,76	8,34	3,4	79 (S)

La proporción de reactivos es la cantidad de reactivo utilizado en la reacción en peso. Todos los monómeros utilizados en la Tabla 2 son soluciones acuosas, por lo que las cantidades reales se corrigen por concentración múltiple. Por ejemplo, en el Ejemplo 11 la cantidad de reactivos es: sílice = 10 g, monómero = 6,6 g, 2º monómero = 0,6 g, iniciador = 0,045 g, agua DI = 65 g, y la relación se calcula como 10: (6,6 x 0,75): (0,6 x 0,65): 0,045:65 = 1:0,5:0,04:0,0045:6,5.

$C\%_{\text{unión inicial}}$ es la cantidad de carbono en las muestras de sílice secas después de la etapa de unión inicial, según lo medido por análisis elemental. $C\%_{\text{final}}$ es la cantidad de carbono en las muestras de sílice seca purificada, medida por análisis elemental. $C_{\text{poli}} = C\%_{\text{final}} - C\%_{\text{unión inicial}}$ es la cantidad de carbono aportada por los grupos poliméricos en la superficie de la sílice. Proporción $C_{\text{poli}}/C_{\text{unión inicial}}$ es la división de los dos números de carbono, que es una medida del carbono aportado por el polímero en comparación con el contribuido por la unión inicial. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que una proporción más alta es una indicación de un polímero de cadena más larga con menos número de cadenas superficiales, y esto se prefiere contra una proporción más baja que indica una cadena más corta con más cadenas superficiales para una mayor unión de proteínas, ya que las cadenas más largas dan más flexibilidad para los polímeros unidos. Se usó albúmina de suero bovino (BSA) como proteína modelo para todas las pruebas de unión de muestras. Se prefieren valores de unión mayores. En la Tabla 2, (S) significa unión estática (SBC) donde la unión de BSA a la sílice modificada se midió de modo estático (véase el procedimiento de medición a continuación). (D) significa unión dinámica (DBC) donde la unión de BSA a la sílice modificada se midió en modo flujo dinámico (véase el procedimiento de medición a continuación). Tenga en cuenta que n/m significa no medido.

Como se puede ver en la Tabla 2, excepto para el Ejemplo 13, todas las muestras proporcionaron resultados de unión aceptables. En el Ejemplo 13, no se unió polímero a la superficie de sílice. En los ejemplos 14 y 15, el segundo monómero, cloruro de dialildimetilamonio, proporcionó mayor unión a proteína BSA en general. En el Ejemplo 16, aumentando la proporción de $C\%_{\text{poli}}/C\%_{\text{unión inicial}}$, mejoró la unión de BSA. En los Ejemplos 17, 18 y 20, se ensayaron monómeros alternativos. El monómero alternativo 1 dio una unión a BSA ligeramente más alta que una muestra del primer monómero (Ejemplo 19), mientras que el monómero alternativo 2 dio una unión a proteína mucho menor que el primer monómero. En el Ejemplo 21, la muestra se realizó con sílice con un diámetro/tamaño de poro de 80 nm (800 Å), que produjo la mayor unión a proteína BSA. El Ejemplo 22 dio una mayor unión a BSA que 23 porque tenía mayor proporción de carbono. En el Ejemplo 24, se obtuvo menor unión a proteína.

Ejemplos 25-28

Los ejemplos 25-28 muestran otro proceso para preparar materiales de intercambio aniónico fuerte. El procedimiento general del proceso para muestras de unión inicial para los Ejemplos 25-28 (Tabla 3) fue el siguiente: se mezclaron 50 g de sílice seca con 0,6 g de vinilsilano y 0,6 g de epoxisilano en un matraz de fondo redondo seco de 1 l en un Rotavap a temperatura ambiente durante la noche (16 horas), y luego la sílice se transfirió a un vaso de precipitados de 1 l y se empapó con 500 ml de ácido sulfúrico 1 M durante 1 hora. La filtración y lavado con 5 x 500 de agua DI proporcionaron muestras de sílice inicialmente unidas que se secaron a 70 °C durante la noche.

Ejemplos 25-27

El procedimiento del proceso de polimerización para los Ejemplos 25-27 fue el siguiente: De forma similar al proceso utilizado en los Ejemplos 11-24, se mezclaron 30 g de sílices secas de la etapa anterior con monómeros, iniciador y agua según la Tabla 3. Los resultados analíticos y mediciones de capacidad de unión y cálculos para los productos finales para los Ejemplos 25-27 también se registraron en la Tabla 3.

Ejemplo 28

El procedimiento del proceso de polimerización para el Ejemplo 28 fue el siguiente: En un vaso de precipitados de 250 ml, se mezclaron la cantidad de reactivos descrita para el Ejemplo 28 en la Tabla 3. Se agita para disolver todo en agua. La solución se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 30 g de sílice unida inicialmente (0,76 % de carbono). Se burbujeó gas nitrógeno en el matraz durante 30 minutos (el matraz se agitó ocasionalmente para permitir que sílice y solución acuosa se mezclaran bien), y luego el tubo de gas se retiró rápidamente y la parte superior de los matraces se selló con una cinta. El matraz se calentó gradualmente a 65 °C con un baño de agua (-30 minutos) y la temperatura se mantuvo a 65 °C durante 2 horas. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en 400-500 ml de solución de NaCl al 10 % en un vaso de precipitados de 1 l con un poco de agua DI aclarando para mover completamente la sílice residual dentro del matraz. La sílice se agitó con una espátula durante unos pocos minutos y luego las partículas se dejaron sedimentar. El sobrenadante de la fase líquida superior se decantó en residuos y la sílice residual se mezcló con 500 ml de solución de NaCl al 5 %. La muestra de sílice se lavó luego con 3 x 500 ml de solución de NaCl al 5 % con 3 x 500 ml adicionales de agua DI, cada lavado fue seguido de filtración al vacío. La muestra final se dejó secar al aire excepto que se secó una pequeña cantidad de muestra a 90 °C para análisis elemental de contenidos de carbono.

Tabla 2

Ejemplos	Tamaño medio de poro nm (Å)	C% de unión inicial	Monómero 1 (g)	Monómero 2 (g)	Iniciador (g)	Agua (g)	C% final	C% neto	5 % ruptura DBC para proteína BSA (mg/ml)
25	100 (1000)	0,83	33	2	0,14	200	4,66	3,83	115,9
26	200 (2000)	0,75	33	2	0,14	200	2,84	2,09	92,2
27	300 (3000)	0,77	33	2	0,14	200	2,47	1,70	84,4
28	80 (800)	0,76	16,5	1	0,07	100	5,49	4,73	129,1

Los ejemplos 29-38 demuestran un proceso para preparar material de intercambio catiónico fuerte S (véase la **Figura 2**).

Ejemplos 29-34

Se premezclaron vinil y epoxisilanos (2,5 g cada uno) en un vial de centelleo de 20 ml. Un matraz de fondo redondo de 2 l se cargó con 200 gramos de sílice D1000 y se añadió la cantidad de mezcla de agente de tratamiento gota a gota en el matraz con una buena mezcla. La mezcla en el matraz se dejó procesar en un rotovapor durante la noche. Se añadieron 20 ml de ácido sulfúrico 0,5 M. La mezcla se procesó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. Se dejó enfriar el matraz y luego se empapó la sílice con 500 ml de ácido sulfúrico 1 M durante 30 minutos y luego se filtró. Luego se lavó con agua DI cinco veces y se filtró. Se disolvieron 100 g de cloruro de tetrametilamonio en 1000 ml de metanol y la sílice se empapó en esta solución durante 1 hora, y luego la sílice se filtró y lavó con 3 x 500 ml de metanol. La sílice se secó a 70 °C durante la noche. La muestra se envió para análisis elemental (LECO) para determinar el porcentaje de carbono en sílice. Se encontró que la muestra contenía 0,79 g de carbono por 100 g de muestra (0,79 %). Todas las uniones iniciales para los Ejemplos 29-34 registradas en la Tabla 4 se prepararon como se describió en este documento anteriormente.

Se equipó un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 ml con un agitador mecánico superior con ajuste hermético a los gases, una entrada y salida de gas nitrógeno, y una manta calefactora con retroalimentación de termopar. La sílice se unió inicialmente y se trató con cloruro de tetrametilamonio (30 g) y 37,5 g de AMPS, una pequeña cantidad de CTA y 200 ml de agua DI se cargaron primero en el matraz. El sistema se burbujeó con nitrógeno durante 20 minutos. Luego se introdujeron 0,15 g del iniciador V501. Se burbujeó nitrógeno durante otros 20 minutos antes de calentar gradualmente el matraz a 65 °C. La mezcla se mantuvo a 65 °C durante 2 horas con agitación general, y luego a 80 °C durante otras 2 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en 600 ml de solución de NaCl al 5 % en un vaso de precipitados. El matraz se enjuagó con agua DI para mover completamente la sílice residual dentro del matraz. Después de agitar la mezcla con un agitador superior durante unos minutos, se filtró y el lavado se repitió tres veces con 500 ml de NaCl al 5 % y tres veces con 500 ml de agua DI. La muestra se dejó en aire para secar excepto que se secó una pequeña cantidad de sílice a 90 °C durante la noche y luego se envió para un análisis elemental del contenido de carbono y azufre.

Tabla 4

N.º de ejemplo	Tamaño de poro de sílice nm (Å)	C% inicial	CTA usado (g)	C% final	S%	SBC (lisozima) (mg/ml)	SBC (globulina) (mg/ml)
29	100 (1000)	0,74	0,3	2,88	0,85	153	39
30	100 (1000)	0,98	0,3	3,47	0,77	153	34
31	100 (1000)	0,74	0,2	3,64	1,01	166	19
32	100 (1000)	0,71	0,2	3,37	1,03	160	16
33	100 (1000)	0,74	0	6,29	1,61	68	2
34	100 (1000)	0,71	0	6,26	1,61	63	3

En los Ejemplos 29-34, se usaron las proteínas lisozima de clara de huevo de gallina (M_w de aproximadamente 17 kD) y gammaglobulina bovina (M_w de aproximadamente 140 kD) para estudios de capacidad de unión estática (SBC) para los materiales de intercambio catiónico. El procedimiento de prueba fue el mismo que el de BSA para sílice Q descrito anteriormente en los Ejemplos 11-24, con la excepción de que se utilizan diferentes proteínas (todavía concentraciones de 25 mg/ml), y el tampón de unión y lavado fue HOAc/NaOAc 50 mM a pH 4,0. El tampón de elución fue NaCl 1 M en HOAc/NaOAc 50 mM a pH 4,0.

Se encontró que a diferencia de la sílice Q, la polimerización de AMPS requiere la participación de una pequeña cantidad de agente de transferencia de cadena (CTA), por ejemplo, S'-bis(ácido α,α' -dimetil- α'' -acético)-tritiocarbonato. Sin CTA, la unión de proteína a las muestras de sílice fue mucho menor. Como puede verse en la Tabla 4, la cantidad de CTA tuvo una influencia significativa no solo en la cantidad de polímero (juzgada por los contenidos de carbono y azufre) sino también en la capacidad de unión estática de las muestras. Cantidades mayores de CTA condujeron a cantidades menores de unión de polímero, menor unión de lisozima pero mayor unión para la proteína globulina de tamaño mucho mayor. Sin CTA, se lograron cantidades de unión significativamente menores tanto para lisozima como para globulina.

Ejemplos 35 y 36

Los ejemplos 35 y 36 demuestran el tamaño de los polímeros con respecto a la cantidad de CTA usada en la polimerización (sin participación de sílice). Un matraz de fondo redondo de tres bocas se cargó con 37,5 g (181 mmol)

de AMPS, 1,4 g (18,1 mmol) de ácido metacrílico, 0,2 g (1 g para el Ejemplo 32) de CTA, y 200 ml de agua DI. La polimerización se realizó (sin sílice) similar a la descrita anteriormente. Después de polimerización la muestra se envió para el análisis de GPC para determinar el peso molecular de los polímeros fabricados. Se encontró que M_w para el Ejemplo 31 fue 87471 y M_w para el Ejemplo 32 fue 20678.

Ejemplo 37

En este ejemplo, se presenta un proceso alternativo para preparar una fase de intercambio catiónico fuerte. El proceso consiste en unir químicamente un grupo funcional que contiene un grupo azo térmicamente lábil y también grupos ácido carboxílico hidrófilos. Como se muestra en la Figura 3, el iniciador azoico se acopla primero con aminopropiltrimetoxisilano, y luego el grupo funcional se une a sílice. La polimerización procede con calor y en presencia de los monómeros.

N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), se disolvieron 11,5 g en 350 ml de cloruro de metileno y la solución se enfrió con hielo hasta aproximadamente 5 °C. A la solución se añadieron 7,78 g de 4,4'-azobis(ácido cianovalérico) (iniciador V-501), seguido de 10 g de aminopropiltrimetoxisilano. La mezcla se agitó en frío durante 3 horas, y luego se dejó calentar a temperatura ambiente en otras 2 horas. Después de la reacción, los sólidos no disueltos (en su mayoría subproducto de urea) se separaron por filtración y el filtrado se mezcló con 100 g de sílice no tratada del Ejemplo 7 (80 nm (800 Å)). La mezcla se puso en un matraz de fondo redondo de 1 l, se procesó en un rotavapor a temperatura ambiente durante la noche, y luego se filtró y lavó con 4 x 400 ml de metanol. Los sólidos se dejaron secar al aire durante la noche a temperatura ambiente. Se envió una pequeña cantidad de muestra para el análisis elemental, y se obtuvo un índice de carbono de 2,03 % para la muestra.

Se mezclaron 30 g de la sílice anterior con 40 g de monómero AMPS en 200 ml de agua. Después de burbujear nitrógeno en la mezcla acuosa durante 30 minutos, el matraz de fondo redondo de tres bocas se calentó mientras se agitaba a 65 °C durante 2 horas bajo nitrógeno. Después de la reacción, la mezcla se filtró y lavó con 3 x 500 ml de NaCl al 5 % y luego 3 x 500 ml de agua DI. Después de secar la muestra, el análisis elemental de la muestra seca mostró un índice de carbono de 4,23 % y un índice de azufre de 1,17 %. La unión estática de proteína BSA (con un pH de 4,0, tampón de acetato de sodio 50 mM) indicó que la capacidad de unión de BSA para esta muestra fue de 150 mg/ml.

Ejemplos 38

En este ejemplo, se usó un conjunto diferente de reacciones para preparar material de intercambio catiónico fuerte. Como se muestra en la **Figura 4**, el gel de sílice se unió primero con aminopropiltrimetoxisilano, y luego la sílice modificada se acopló a un iniciador azoico con una catálisis de acoplamiento (DCC) en DMF, seguido de polimerización a temperatura superior en presencia de monómero AMPS.

D1000 (tamaño medio de partícula de 75 µm con tamaño medio de poro de 100 nm (1000 Å)), 200 g, se unió inicialmente a 20 g de aminopropiltrimetoxisilano con un procedimiento similar al de los Ejemplos 1-10. Después de procesar durante la noche, la sílice se empapó en 600 ml de HCl 0,1 M y luego se filtró. Se realizaron tres lavados con 1 l de agua DI con cada paso, seguido de filtración al vacío. La torta de filtración de sílice se secó a 70 °C durante la noche y se determinó que la cantidad de carbono con sílice seca era del 0,80 %.

La sílice seca de arriba, 35 g, se mezcló con una solución de 1,92 g de DCC, 2,24 g de iniciador azoico V-501 y 0,8 g de trietilamina en 100 ml de disolvente DMF seco. La mezcla se colocó en un matraz de fondo redondo de 500 ml y se procesó en un rotavapor a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla resultante se filtró y lavó con 2 x 200 ml de DMF y 2 x 150 ml de acetona. Se secó una muestra en horno y el análisis elemental mostró un contenido de carbono de 1,74 %. La sílice restante se dejó secar dentro de una campana extractora a temperatura ambiente durante 6 horas.

Se mezclaron 34 g de sílice anterior con 40 g de monómero AMPS en 200 g de agua DI. Después de lavar el sistema con nitrógeno durante 20 minutos, se calentó mientras se agitaba a 65 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 2 horas. Después de eso, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con 3 x 500 ml de NaCl al 5 %, seguido de 3 x 500 ml de agua DI. Después de secar la muestra, el análisis elemental de la muestra seca mostró un índice de carbono de 5,47 % y un índice de azufre de 1,69 %, y una unión estática (5 % de ruptura) de 125 mg/ml de proteína lisozima a pH 7,0 (50 mmol de tampón fosfato).

Ejemplos 39 y 40 (no de la invención)

En los ejemplos 39 y 40, se utilizaron partículas de resina epoxi porosa (resina polimérica de polimetacrilato) (véase la **Figura 5**). Dado que las partículas (tamaño de partícula promedio de 50 µm o 100 µm) tienen grupos epoxi que se hidrolizan para dar grupos diol en medios acuosos, sólo se necesitarán grupos vinilo para la modificación con polimerización de polímeros Q. Por lo tanto, se trataron 100 g de las partículas con 40 ml de alilamina (disponible en Aldrich) en 400 ml de NMP a temperatura ambiente durante 1 hora y 60 °C durante 1 hora. Después de enfriarse, el sólido se filtró y lavó con 3 x 500 ml de agua, seguido de 500 ml de metanol, y se secó al aire durante la noche. La

polimerización de 30 g de resina modificada anterior se realizó con el procedimiento descrito en el Ejemplo 11. Como puede verse en la Tabla 5, ambos ejemplos proporcionaron una unión estática aceptable de proteína BSA.

Tabla 5

Partícula base	Tamaño de partícula	C% de polimerización de monómeros Q	Unión estática de proteína BSA (mg/g)
Ejemplo 39	50	7,5	220
Ejemplo 40	100	n/a	73

5 Aunque la invención se ha descrito con un número limitado de realizaciones, estas realizaciones específicas no pretenden limitar el alcance de la invención tal como se ha reivindicado y descrito de otra manera en el presente documento. Puede ser evidente para los expertos en la materia tras revisar las realizaciones ejemplares de este documento que son posibles modificaciones equivalentes y variaciones adicionales. Todas las partes y porcentajes en los ejemplos, así como el resto de la memoria descriptiva, son en peso, a menos que se especifique lo contrario. 10 Además, cualquier intervalo de números mencionado en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones, tal como el que representa un conjunto particular de propiedades, unidades de medida, las condiciones, estados físicos o porcentajes, pretende incorporar de manera literal en el presente documento de manera expresa a modo de referencia o de otra manera, cualquier número que se encuentre dentro de tal intervalo, incluyendo cualquier subconjunto de 15 números dentro de cualquier intervalo así mencionado. Por ejemplo, siempre que se desvela un intervalo numérico con un límite inferior, R_L y un límite superior R_U , se divulga específicamente cualquier número R que se encuentra dentro del intervalo. En particular, se divulgan específicamente los siguientes números R dentro del intervalo: $R = R_L + k(R_U - R_L)$, en los que k es una variable que varía del 1 % al 100 % con un 1 % de incremento, por ejemplo, k es 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %.... 50 %, 51 %, 52 %.... 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Además, también se desvela 20 específicamente cualquier intervalo numérico representado por cualquiera de los dos valores de R , como se calculó anteriormente. Cualquier modificación de la invención, además de las mostradas y descritas en este documento, será evidente para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende incluir dichas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un material de soporte de partículas funcionalizado que comprende:

- 5 una partícula de sílice que tiene una superficie de partícula; y
una combinación de grupos funcionales unidos a y que se extienden desde la superficie de partícula de sílice, comprendiendo dicha combinación de grupos funcionales
- 10 (i) un primer conjunto de grupos funcionales que comprenden dobles enlaces insaturados en donde los grupos funcionales son suficientes para polimerizar uno o más monómeros sobre la superficie de la partícula, y
(ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que comprenden al menos un grupo funcional hidrófilo suficiente para aumentar la humectabilidad de dicha superficie de partícula.

15 2. El material de soporte de partículas funcionalizado de la reivindicación 1, en donde dicho segundo conjunto de grupos funcionales comprende grupos hidroxilo, grupos diol, grupos oxietileno, grupos polietileno, grupos ácido carboxílico, grupos amina, grupos amida, o cualquier combinación de los mismos.

20 3. El material de soporte de partículas funcionalizado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho primer conjunto de grupos funcionales comprende grupos vinilo, grupos azo, grupos alilo, grupos acrílo, grupos metacrilo, o cualquier combinación de los mismos.

4. El material de soporte de partículas funcionalizado de la reivindicación 1, en donde dicho primer conjunto de grupos funcionales comprende grupos vinilo, y dicho segundo conjunto de grupos funcionales comprende grupos diol.

25 5. El material de soporte de partículas funcionalizado de la reivindicación 1, en donde dicho primer y segundo conjuntos de grupos funcionales son parte de una molécula que comprende grupos azo y grupos ácido carboxílico.

6. Un método para fabricar un material de soporte de partículas funcionalizado que comprende:

- 30 tratar una superficie de partícula de una partícula de sílice para dar como resultado una combinación de grupos funcionales unidos a y que se extienden desde la superficie de partícula de sílice, comprendiendo la combinación de grupos funcionales
- (i) un primer conjunto de grupos funcionales que comprenden al menos un doble enlace que son suficientes para permitir la polimerización de uno o más monómeros sobre la superficie de partícula mediante el primer conjunto de grupos funcionales, y
- 35 (ii) un segundo conjunto de grupos funcionales que comprenden grupos hidrófilos que aumenta la humectabilidad de dicha superficie de partícula.

40 7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho primer conjunto de grupos funcionales comprende grupos vinilo, grupos azo, grupos alilo, grupos acrílo, grupos metacrilo, o cualquier combinación de los mismos.

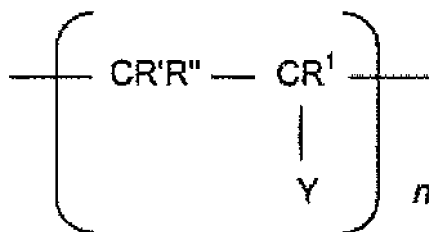
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde dicho segundo conjunto de grupos funcionales comprende grupos hidroxilo, grupos diol, grupos oxietileno, grupos polietileno, grupos ácido carboxílico, grupos amina, grupos amida, o cualquier combinación de los mismos.

45 9. El método de la reivindicación 6, en donde dicha etapa de tratamiento comprende exponer la superficie de partícula de sílice a (i) al menos un silano que comprende un grupo funcional del primer conjunto de grupos funcionales, y (ii) al menos un silano que comprende un grupo funcional del segundo conjunto de grupos funcionales.

50 10. El método de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además:
polimerizar al menos una parte del primer conjunto de grupos funcionales.

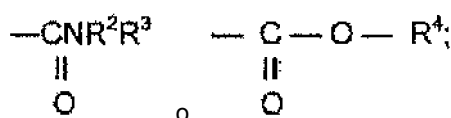
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende además:
polimerizar al menos una parte del primer conjunto de grupos funcionales, comprendiendo dicha etapa de polimerización hacer reaccionar el primer conjunto de grupos funcionales con uno o más monómeros en presencia de uno o más monómeros espaciadores para formar cadenas poliméricas que se extienden desde la superficie de partícula.

60 12. El método de la reivindicación 11, en donde las cadenas poliméricas comprenden unidades repetitivas idénticas o diferentes de la siguiente fórmula



en donde

- 5 R^1 es H o CH_3 ;
 R' y R'' son cada uno independientemente H o CH_3 ;
 Y es



- 10 R^2 y R^3 son cada uno independientemente

- (a) alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo, alquilocicloalquilo C_{1-10} o alquilfenilo C_{1-10} ,
 (b) uno de los grupos anteriores en (a) monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o
 15 dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo, o sulfonilo,
 (c) un radical cíclico o bicíclico que tiene 5-10 átomos de C, en donde uno o más grupos CH o CH_2 están
 reemplazados con (i) N o NH, (ii) N o NH y S, o (iii) N o NH y O, o
 (d) uno de R^2 o R^3 es H;
 y en donde R^2 y R^3 se coordinan entre sí para que ambos radicales sean ácidos o básicos, o uno de los radicales
 20 sea neutro y uno sea ácido o básico; y

- R^4 es alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo o alquil C_{1-10} -cicloalquilo, o cicloalquilfenilo C_{1-10} , cada uno
 monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo o sulfonilo;
 y
 25 n es 2 a 1000.

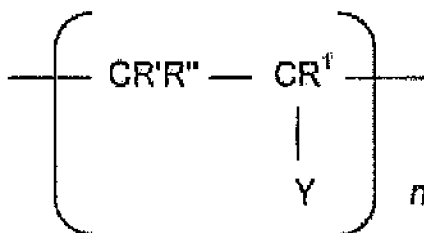
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la polimerización incluye un agente de transferencia de cadena que reduce la longitud de cadena o el peso molecular del polímero.

- 30 14. Uso de un material de soporte de partículas funcionalizado como se define en la reivindicación 1 en una columna o cartucho de cromatografía.

15. Una columna o cartucho de cromatografía que aloja material de soporte de partículas funcionalizado como se define en la reivindicación 1.

- 35 16. La columna o cartucho de cromatografía de la reivindicación 15, en donde al menos una parte de dicho primer conjunto de grupos funcionales se polimeriza con uno o más monómeros y uno o más monómeros espaciadores para formar cadenas poliméricas que se extienden desde dicha superficie de partícula.

- 40 17. La columna o cartucho de cromatografía de la reivindicación 16, en donde las cadenas poliméricas comprenden unidades repetitivas idénticas o diferentes de la siguiente fórmula

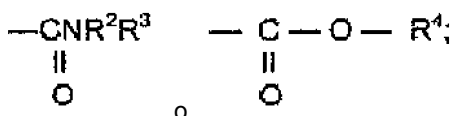


en donde

R¹ es H o CH₃;

R' y R'' son cada uno independientemente H o CH₃;

Y es



R² y R³ son cada uno independientemente

(a) alquilo C₁₋₁₀, fenilo, fenil-alquilo C₁₋₁₀, cicloalquilo, alquilcicloalquilo C₁₋₁₀ o alquilfenilo C₁₋₁₀,

(b) uno de los grupos anteriores en (a) monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo, o sulfonilo,

(c) un radical cíclico o bicíclico que tiene 5-10 átomos de C, en donde uno o más grupos CH o CH₂ están reemplazados con (i) N o NH, (ii) N o NH y S, o (iii) N o NH y O, o

(d) uno de R² o R³ es H;

y en donde R² y R³ se coordinan entre sí para que ambos radicales sean ácidos o básicos, o uno de los radicales sea neutro y uno sea ácido o básico; y

R⁴ es alquilo C₁₋₁₀, fenilo, fenil-alquilo C₁₋₁₀, cicloalquilo o alquil C₁₋₁₀-cicloalquilo, o cicloalquilfenilo C₁₋₁₀, cada uno monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono o dialquilamino, trialquilamonio, carboxilo o sulfonilo; y n es 2 a 1000.

18. Un método para fabricar la columna o cartucho de cromatografía de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, comprendiendo dicho método:

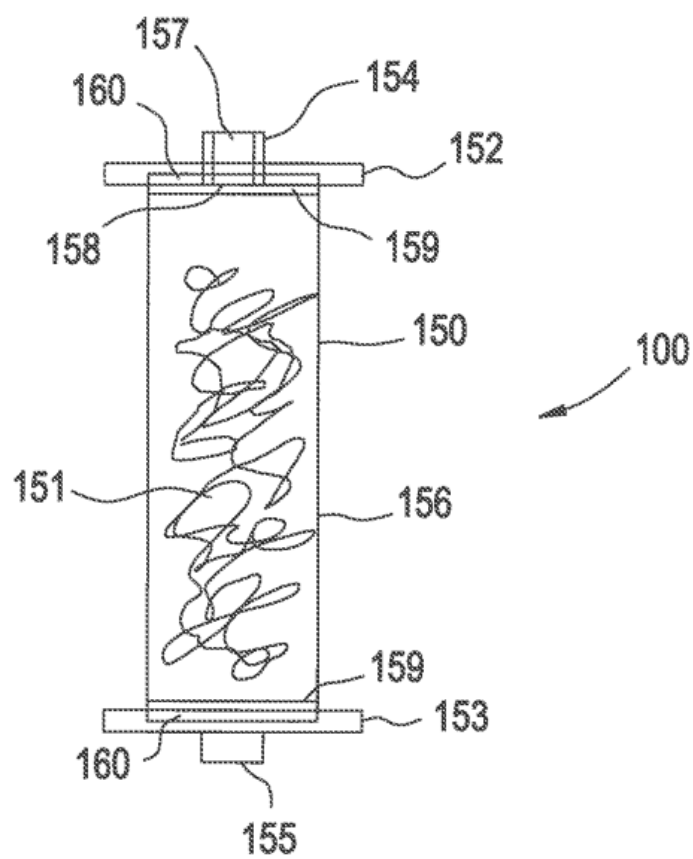
1. sellar un primer extremo de una estructura tubular;

2. llenar al menos parcialmente una cavidad de columna de la estructura tubular con el material de soporte de partículas funcionalizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el material de soporte de partículas funcionalizado formado mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10;

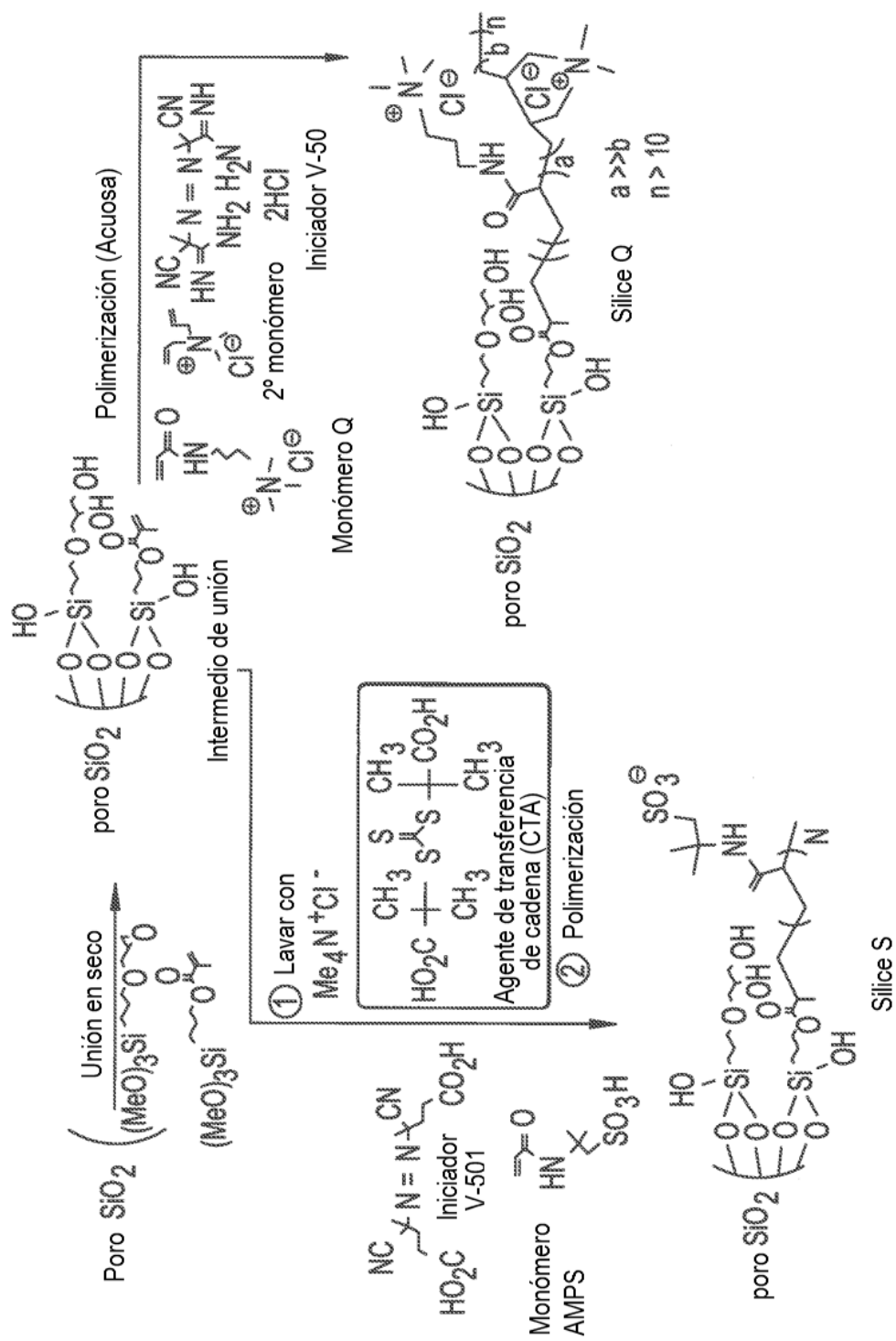
3. llenar al menos parcialmente la cavidad de columna de la estructura tubular con una primera solución tampón para encapsular el material de soporte de partículas funcionalizado; y, opcionalmente,

4. sellar un extremo opuesto de la estructura tubular.

FIG. 1



2. ELG



மேல்

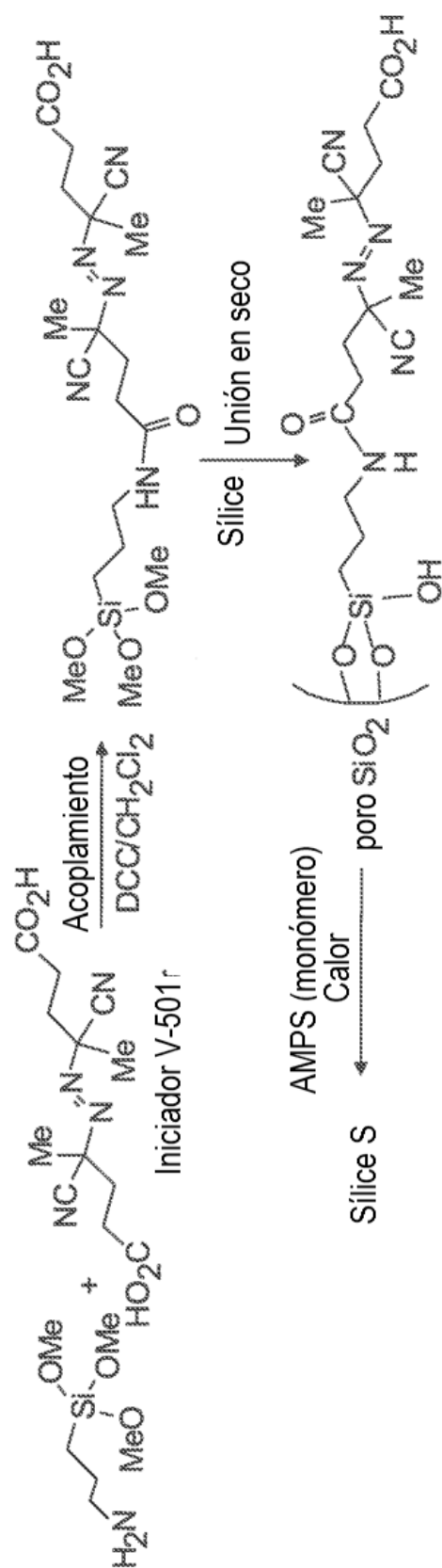


FIG. 4

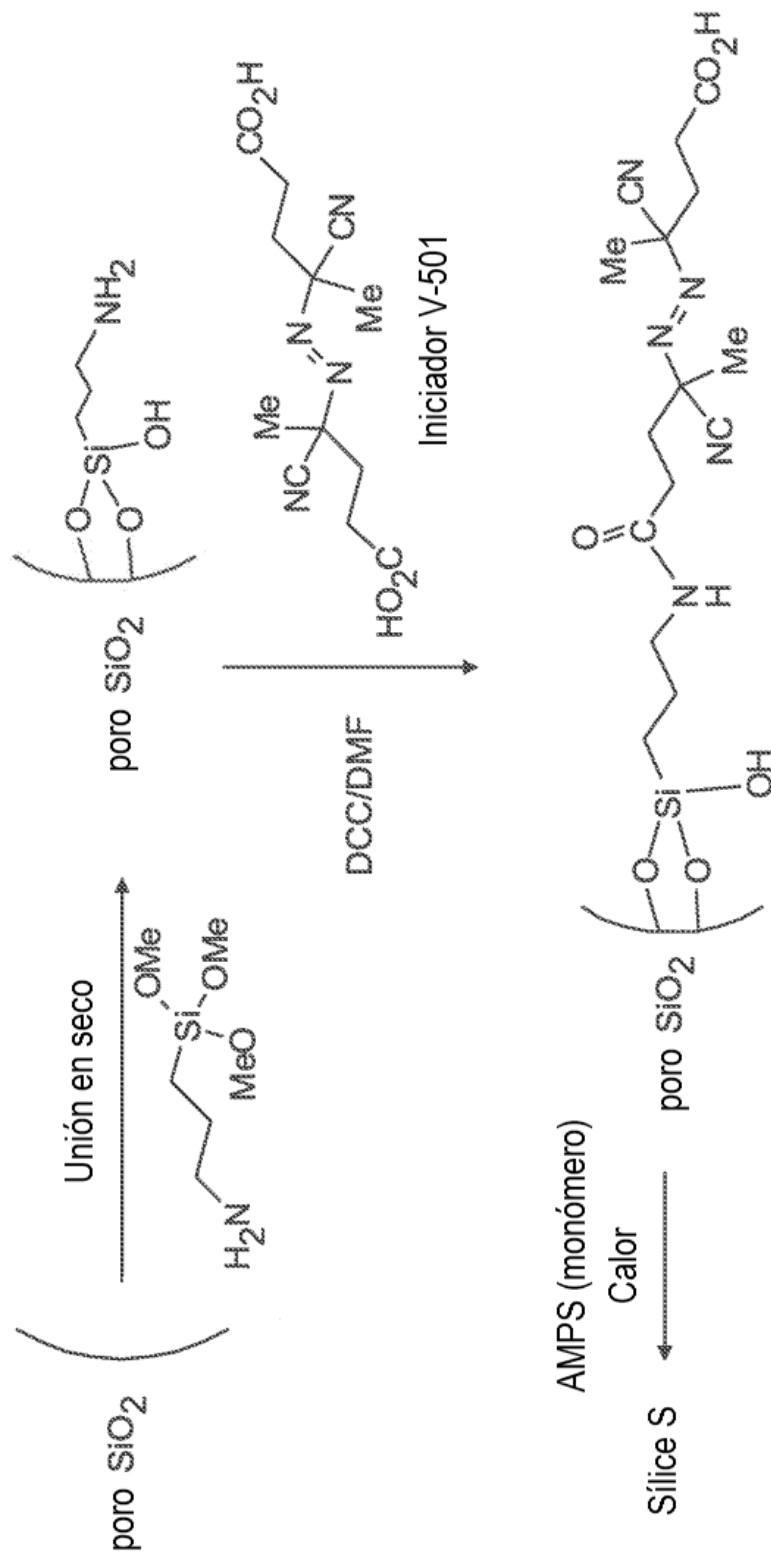


FIG. 5

