

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 731**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C08F 283/00** (2006.01)

**C12N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/JP2015/055892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15146487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15769789 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3124618**

54 Título: **Método para separar y concentrar una sustancia diana utilizando un nuevo polímero de injerto catiónico**

30 Prioridad:

**24.03.2014 JP 2014060419**

**24.03.2014 JP 2014060420**

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

**20.12.2019**

73 Titular/es:

**NITTO BOSEKI CO., LTD. (100.0%)  
1 Aza Higashi, Gonome, Fukushima-shi  
Fukushima 960-8161, JP**

72 Inventor/es:

**ASHIZAWA KAZUHO;  
NODA KENTA;  
WATANABE KOJI;  
TERUUCHI YOKO y  
BUNYA MASARU**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 735 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para separar y concentrar una sustancia diana utilizando un nuevo polímero de injerto catiónico

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un método de separación y concentración de biomoléculas diana, mediante el uso de un polímero de injerto, que puede producirse de un modo seguro y estable, con un costo inicial bajo y una operación sencilla, y a un kit utilizado para el método.

**Técnica anterior**

- 10 Un polímero de intercambio iónico es un tipo de resina sintética y tiene una estructura para la ionización como un grupo iónico en una parte de su estructura molecular. El polímero de intercambio iónico realiza el intercambio iónico con un ion en un disolvente, tal como el agua. Su comportamiento está de acuerdo con la selectividad para el ion. Los polímeros de intercambio iónico se clasifican, a grandes rasgos, en polímeros de intercambio catiónico y polímeros de intercambio aniónico. Al usar una diferencia en la adsorción entre un ion fijo en el polímero y un contraión (el ion a intercambiar) en varias soluciones, es posible separar los iones contenidos en las soluciones.

- 15 Las características de carga eléctrica de una biomolécula están determinadas por diversos factores, tales como la carga de las moléculas completas, la densidad de carga, el método de distribución de una carga superficial y el pH de una solución. Por ejemplo, la proteína contiene muchos tipos de aminoácidos iónicos, tales como aminoácidos débilmente ácidos y débilmente básicos, y tiene tanto una carga positiva como una carga negativa en la superficie de la molécula de la proteína. La suma de las cargas se denomina carga superficial efectiva, y el estado de carga de un aminoácido depende del pH. Por lo tanto, una carga superficial efectiva de una molécula de una proteína cambia a carga positiva o negativa, dependiendo del pH de la solución.

- 20 La cromatografía de intercambio iónico es un método para recolectar una biomolécula basándose en la unión reversible y la elución de la biomolécula con un vehículo que tiene una carga opuesta, utilizando dicho cambio de estado de carga (es decir, la carga superficial efectiva) de la biomolécula causada por el pH o la concentración de sal (por ejemplo, bibliografía relacionada con patentes 1 y 2 y bibliografía no relacionada con patentes 1).

- 25 Sin embargo, cuando se realiza una operación de recolección de este tipo, se emplea un tensioactivo, una sal de alta concentración o similares durante la elución. Por lo tanto, es difícil mantener la estructura tridimensional de la diana o recoger la diana mientras está viva.

Lista de citas

Bibliografía relacionada con patentes

- 30 Bibliografía relacionada con patentes 1: documento de patente japonesa número JP 1996-173194 A.

Bibliografía relacionada con patentes 2: documento de patente japonesa número JP 2002-125695 A.

Bibliografía no relacionada con patentes

Bibliografía no relacionada con patentes 1: *Microbiology* 152 (2006), 3575-3583.

**Compendio de la invención**

- 35 Problema técnico

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para separar y concentrar una sustancia diana, mediante la utilización de un nuevo polímero de injerto catiónico, en lugar de un polímero catiónico existente, y un kit para el ello.

Solución al problema

- 40 Es decir, la presente invención está constituida por los siguientes puntos 1 a 11.

1. Un método para separar y concentrar una sustancia diana mediante la utilización de un polímero de injerto catiónico, que comprende lo siguiente:

(1) la etapa de poner el polímero de injerto catiónico en contacto con una muestra que contiene la sustancia diana, para hacer que la sustancia diana se una al polímero de injerto catiónico en condiciones básicas;

- 45 (2) la etapa de separar el complejo unido del polímero de injerto catiónico y la biomolécula diana y

(3) la etapa de eluir la sustancia diana del complejo unido,

en donde el polímero de injerto catiónico es un polímero de injerto de poliamina obtenido por la polimerización de un derivado de poliamina obtenido mediante la reacción entre: (a) un compuesto polimérico, que tiene al menos un grupo amino, y (b) un compuesto que tiene al menos un grupo epoxi, y (c) un monómero etilénicamente insaturado;

- 5 2. El método de acuerdo con el punto 1 anterior, que comprende, además, añadir un ion metálico divalente o trivalente en la etapa (1);
3. El método de acuerdo con el punto 1 o con el punto 2 anteriores, que comprende, además, la etapa de lavar el complejo unido en la etapa (2) y
4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 anteriores, en el que el polímero de injerto catiónico se fija a una superficie de fase sólida.
- 10 5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 anteriores, que comprende la etapa de añadir un polímero de injerto catiónico que no está unido a la sustancia diana en la etapa (3).
6. Un kit utilizado para el método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5 anteriores, que comprende un polímero de injerto catiónico.
7. El kit de acuerdo con el punto 6 anterior, que comprende, además, una sal de ion metálico.
- 15 8. El kit de acuerdo con el punto 6 anterior, que comprende, además, una solución de reacción que contiene una solución básica y una sal de ion metálico divalente o trivalente.
9. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6 a 8 anteriores, que comprende, además, una solución de lavado y
- 20 10. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6 a 9 anteriores, que comprende, además, una solución de dispersión que contiene una solución ácida o un agente quelante.
11. El kit de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6 a 10 anteriores, que comprende, además, una solución de agregación.

Efectos ventajosos de la invención

- 25 El método de la presente invención permite que una sustancia diana que se encuentra en una muestra se separe y se concentre de manera eficiente, y que la sustancia diana resulte menos dañada que con un método conocido en un proceso de separación y concentración y, por lo tanto, que se la analice fácilmente con posterioridad. Más específicamente, el método de la presente invención puede aplicarse al análisis utilizando un espectroscopio de masas.

#### Breve descripción de los dibujos

- 30 Figura 1. Gránulo de precipitación del complejo unido de *Escherichia coli* y polímero de injerto catiónico.  
La *Escherichia coli* está ausente en el tubo izquierdo y presente en el tubo derecho.
- Figura 2. Observación microscópica de fluorescencia del complejo unido de *Escherichia coli* que expresa la GFP [*green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde] y polímero de injerto catiónico.  
La GFP expresada por la *Escherichia coli* se detectó con una longitud de onda de láser (488 nm). El polímero de injerto catiónico y la *Escherichia coli* se detectaron con luz visible. Las imágenes se adquirieron continuamente con una longitud de onda de láser y luz visible, y se superpusieron con una pantalla de pseudo color. El dibujo de la izquierda ilustra un estado en el que la *Escherichia coli* es capturada por el polímero de injerto catiónico. El dibujo de la derecha ilustra un estado en el que el gránulo se dispersa con una solución de dispersión.
- 35 Figura 3. Confirmación de supervivencia (viabilidad) de la *Escherichia coli* separada.
- 40 Se permitió que un polímero de injerto catiónico reaccionara con la *Escherichia coli*. Se cultivó tanto el sobrenadante después de la centrifugación como una solución en la que se dispersó un gránulo con una solución de dispersión. La imagen de la izquierda indica el sobrenadante, y la imagen de la derecha indica la solución de dispersión.
- Figura 4. Electroforesis mediante el uso del ácido nucleico separado y recogido.  
La franja 1 indica una imagen de electroforesis de una muestra no tratada con un polímero de injerto catiónico, y la franja 2 indica una imagen de electroforesis de una muestra tratada con el polímero de injerto catiónico.
- 45 Figura 5. Detección de la célula recogida.  
(1) Sobrenadante (izquierda) y gránulo (derecha) después de la reacción entre la célula y el polímero de injerto

catiónico y la centrifugación.

(2) Estado en el que el gránulo se dispersa con una solución de dispersión.

5 Tanto en (1) como en (2), se detectó un núcleo de la célula con una longitud de onda de láser de 350 nm, y el polímero de injerto catiónico se detectó con luz visible. Las imágenes se adquirieron de manera continua, con longitud de onda de láser y luz visible. Las imágenes se superpusieron con una pantalla de pseudo color, y se observaron un estado de agregación y un estado de dispersión.

Figura 6. Observación microscópica de fluorescencia de células recolectadas.

10 Se capturó una célula con un polímero de injerto catiónico y se dispersó con una solución de dispersión. A partir de entonces, se realizó la inmunotinción. Se detectó un núcleo de la célula con una longitud de onda de láser de 350 nm, y se detectó un anticuerpo para que reaccionara con un antígeno (MCAM) expresado en una superficie de la célula con 488 nm. Las imágenes se adquirieron de manera continua, con dos tipos de longitudes de onda de láser. Las imágenes se superpusieron por una pantalla de pseudo color, y se observó el antígeno en una superficie de la célula.

Figura 7. Detección de la vesícula recogida.

15 (1) Sobrenadante (izquierda) y gránulo (derecha) después de la reacción entre la vesícula y el polímero de injerto catiónico y de la centrifugación.

(2) Estado en el que el gránulo se dispersa con solución de dispersión.

20 Tanto en (1) como en (2), se detectó una vesícula con una longitud de onda de láser de 488 nm, y el polímero de injerto catiónico se detectó con luz visible. Las imágenes se adquirieron de manera continua con longitud de onda de láser y luz visible. Las imágenes se superpusieron por una pantalla de pseudo color, y se confirmaron un estado de agregación y un estado de dispersión.

Figura 8. Observación microscópica de fluorescencia de la vesícula recogida.

Una vesícula capturada por un polímero de injerto catiónico se dispersó con una solución de dispersión, y luego se realizó la inmunotinción.

25 La vesícula se detectó con una longitud de onda de láser de 488 nm y el anticuerpo se detectó con una longitud de onda de láser de 594 nm. Las imágenes se adquirieron de manera continua con dos tipos de longitudes de onda de láser. Las imágenes se superpusieron por una pantalla de pseudo color, y se confirmó el estado del antígeno en una superficie de la vesícula.

30 Figura 9. Detección de la *Escherichia coli* recolectada utilizando una solución que contenía tensioactivo (electroforesis).

Figura 10. Detección de la *Escherichia coli* recolectada utilizando una solución que contenía tensioactivo (espectrometría de masas).

Figura 11. Separación y detección de bacteriófagos.

Figura 12. Confirmación de la supervivencia de la *Escherichia coli* separada.

35 La *Escherichia coli* se separó mediante la utilización de un polímero de injerto de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialildimetil-amonio (PAAEpo-g-DADMAC [por sus siglas en inglés]) y un polímero de injerto de polialilamina modificada con butirato de glicidilo y cloruro de dialildimetil-amonio (PAAGB-g-DADMAC [por sus siglas en inglés]). Cada uno de los polímeros de injerto se mezcló con perlas de látex, y luego se los dejó reaccionar con una célula bacteriana.

40 Figura 13. Confirmación de la supervivencia de la *Escherichia coli* separada.

La *Escherichia coli* se separó mediante la utilización de un polímero de injerto de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialildimetil-amonio (PAAEpo-g-DADMAC). Se permitió que el polímero de injerto reaccionara con una célula bacteriana, y luego se añadieron perlas de látex.

Figura 14. Confirmación de la supervivencia de la *Escherichia coli* separada.

45 La *Escherichia coli* se separó mediante la utilización de un polímero de injerto de polialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialildimetil-amonio (DAAGly-g-DADMAC [por sus siglas en inglés]). Cada uno de los polímeros de injerto se mezcló con perlas de látex y luego se dejó reaccionar con una célula bacteriana.

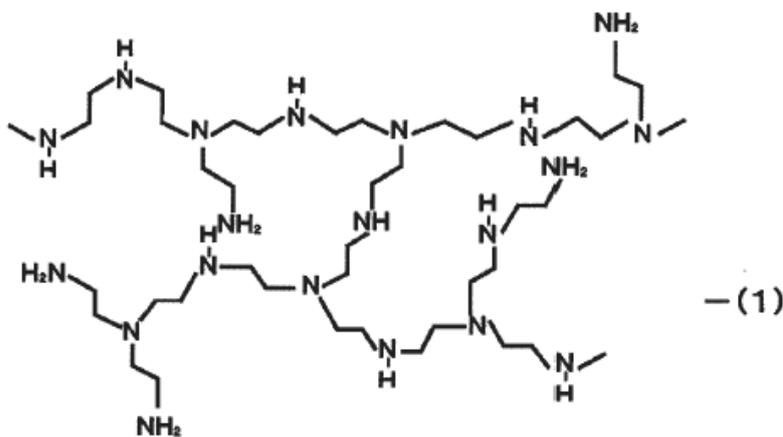
Figura 15. Confirmación de la supervivencia de la *Escherichia coli* separada.

La *Escherichia coli* se separó mediante la utilización de un polímero de injerto de polidialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialildimetil-amonio (DAAGly-g-DADMAC). Se permitió que el polímero de injerto reaccionara con una célula bacteriana y luego se añadieron perlas de látex.

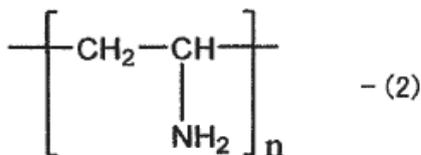
5 **Descripción de las realizaciones**

Se obtiene un “polímero de injerto catiónico” por polimerización de un derivado de poliamina, obtenido mediante una reacción entre: (a) un compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino y (b) un compuesto que tiene al menos un grupo epoxi y (c) un monómero etilénicamente insaturado [el compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a) se puede seleccionar del grupo que consiste en: un polímero de etilenimina representado por la fórmula general (1), un polímero de vinilamina representado por la fórmula general (2), un polímero de alilamina representado por el general fórmula (3), un polímero de dialilamina representado por la fórmula general (4) y un polímero de amina acrílica representado por la fórmula general (5) (en las siguientes fórmulas generales, n es un número entero variable entre 10 y 200.000; m es un número entero variable entre 5 y 3000; 1 es un número entero variable entre 5 y 5000; o es un número entero variable entre 10 y 10.000, y p es un número entero comprendido entre 1 y 100)].

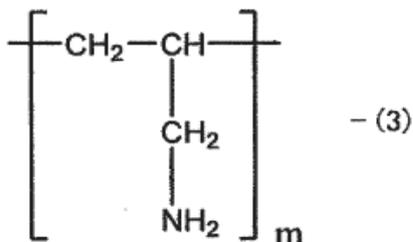
Fórmula 1



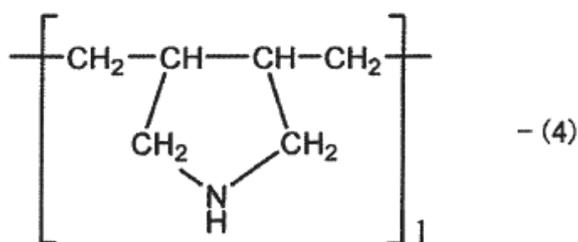
Fórmula 2



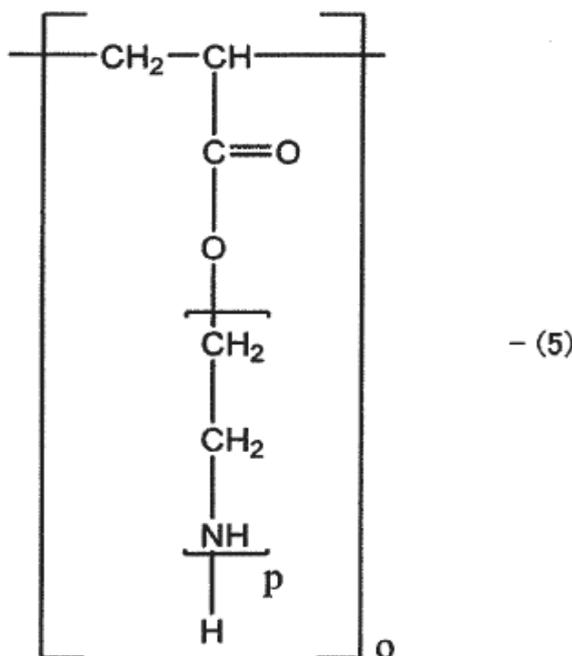
20 Fórmula 3



Fórmula 4



Fórmula 5



5 El "compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a)" solo debe tener al menos un grupo amino, y puede contener una unidad constituyente que no tenga un grupo amino en sus unidades constituyentes. Por lo tanto, cada uno de los polímeros que tienen las estructuras representadas por las fórmulas generales anteriores (1) a (5) puede contener una unidad constituyente que no tenga grupo amino, además de cada una de las unidades constituyentes de las estructuras representadas por las fórmulas generales anteriores (1) a (5), o no debe contener la unidad constituyente que no tiene grupo amino. Los ejemplos de la unidad constituyente que no tiene grupo amino incluyen dióxido de azufre, acrilamida, alcohol alílico y ácido acrílico. Sin embargo, la unidad constituyente que no tiene grupo amino no se limita a ello.

15 El "grupo amino" en el "compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a)" puede ser un grupo amino primario, un grupo amino secundario o un grupo amino terciario, y se prefiere en particular que sea un grupo amino primario o un grupo amino secundario.

20 El número del "grupo amino" en el "compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a)" no tiene limitaciones particulares, pero con preferencia varía de 5 a 15.000, y de manera particularmente preferible, varía de 8 a 3000 por polímero desde el punto de vista de la reactividad, de la utilidad o similares. En términos del número por peso molecular del compuesto polimérico, el número varía, con preferencia, de 5 a 230, y con particular preferencia, de 10 a 130 por peso molecular 10.000.

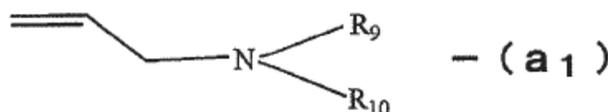
El peso molecular del "compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a)" no tiene limitaciones particulares, pero con preferencia varía de 500 a 10.000.000, y de manera particularmente preferible, de 500 a 1.000.000 en términos de un peso molecular promedio en número desde el punto de vista de la reactividad, de la viscosidad, del manejo, del rendimiento o similares.

25 El número de unidades de repetición del compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a) utilizado en la primera invención de la presente solicitud no tiene limitaciones particulares, aunque con preferencia fluctúa de 10 a 150.000, y particularmente de 10 a 3000, desde el punto de vista de la reactividad, de la viscosidad, del manejo, del

rendimiento, o similares.

El "compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a)" puede ser un "monómero de alilamina que tenga, además, al menos un grupo alilo y al menos un grupo amino (a)". Se puede usar cualquier compuesto polimerizable que tenga al menos un grupo alilo y al menos un grupo amino en una estructura del mismo, aunque es preferible un compuesto de alilamina que tenga una estructura representada por la fórmula general (a1).

Fórmula 6



En la fórmula general (a1),  $R_9$  o  $R_{10}$ , al menos uno de ellos, es un átomo de hidrógeno, y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que tenga de 1 a 8 átomos de carbono y, con preferencia, es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tenga de 1 a 3 átomos de carbono.

Se prefiere en particular desde el punto de vista de la polimerización o similares que uno de  $R_9$  y  $R_{10}$  es también un grupo alilo en la fórmula general (a1), es decir, el monómero de alilamina (a') es un monómero de dialilamina que tiene dos grupos alilo.

Es preferible que al menos una parte del monómero de alilamina (a') sea un monómero de dialilamina que tenga dos grupos alilo, desde el punto de vista de obtener una alta capacidad de polimerización. Se prefiere más que el 30 % en mol o más del monómero de alilamina (a') sea un monómero de dialilamina. Se prefiere en particular que el 50 % en mol o más del monómero de alilamina (a') sea un monómero de dialilamina.

En la fórmula general (a1), cuando  $R_9$  o  $R_{10}$ , uno de ellos, (por ejemplo,  $R_9$ ) es un átomo de hidrógeno, el otro (en este caso,  $R_{10}$ ) sea, preferiblemente, un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo alilo o un grupo bencilo. Es decir, el compuesto de alilamina que tiene una estructura representada por la fórmula general (a1) es, con preferencia, alilamina, metilalilamina, etil alilamina, dialilamina o bencilalilamina.

Preferiblemente, también puede usarse una sal de ácido orgánico o una sal de ácido inorgánico del compuesto de alilamina que tiene una estructura representada por la fórmula general (a1) como el monómero de alilamina que tiene al menos un grupo alilo y al menos un grupo amino (a') en el primera invención de la presente solicitud. Como contraión en la sal de ácido orgánico o la sal de ácido inorgánico, se prefiere un ion halógeno (con mayor preferencia,  $Cl^-$ ,  $Br^-$  o  $I^-$ ), un ion metil-sulfato, un ion etil-sulfato, un ion metanosulfonato, un ion 2-hidroxi-1-etanosulfonato, un ion acetato o un ion hidroxil acetato.

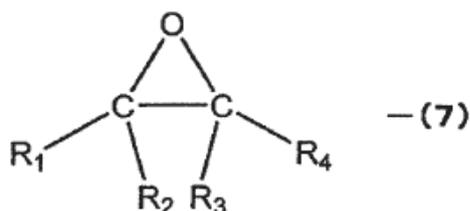
En la definición anterior, el polímero de injerto catiónico puede ser un polímero de injerto de poliamina en el que el "compuesto que tiene al menos un grupo epoxi (b)" es un compuesto representado por la fórmula general (6) (R en la fórmula general (6) es un grupo hidrocarbonado monovalente sustituido o no sustituido).

Fórmula 7

En la definición anterior, el polímero de injerto catiónico puede ser un polímero de injerto de poliamina, en el que el "compuesto que tiene al menos un grupo epoxi (b)" sea un compuesto representado por la fórmula general (7), seleccionado del grupo que consiste en: (1) óxido de etileno, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es un átomo de hidrógeno en la fórmula; (2) un compuesto epoxi en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que tiene un grupo hidroxil en una cadena y que tiene de 1 a 8 átomos de carbono (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula son átomos de hidrógeno); (3) un compuesto epoxi en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo monovalente, sustituido o no sustituido (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula son átomos de hidrógeno); (4) un compuesto epoxi en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que tiene un enlace éter en una cadena y de 1 a 8 átomos de carbono (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno); (5) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno); (6) un compuesto epoxi en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo insaturado (no todos los átomos de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno); (7) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un hidrógeno átomo o un grupo hidrocarburo que contiene un grupo hidrocarburo alicíclico o un grupo hidrocarburo cíclico, que tiene un enlace insaturado (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno); (8) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ , y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que contiene un anillo aromático o un anillo heterocíclico (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno); (9) un compuesto epoxi polifuncional, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo

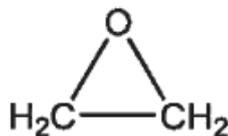
5 que contiene un anillo epoxi (no todos los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno átomos); (10) un compuesto epoxi, en el que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que contiene un alcoxisililo en una cadena y que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (no todos los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno); (11) un compuesto epoxi, en el que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un átomo de flúor en una cadena (no todos los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno); (12) un compuesto epoxi, en el que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un carboxilo grupo en una cadena (no todos los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno); (13) un compuesto epoxi, en el que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de la fórmula cada es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que contiene un enlace éster o un enlace amida en una cadena y que tiene de 1 a 12 átomos de carbono (no todos los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno); y (14) un compuesto epoxi, en el que cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un grupo sulfonato en una cadena (no todos los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno).

15 Fórmula 8



Los ejemplos del “compuesto que tiene al menos un grupo epoxi (b)” incluyen óxido de etileno (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

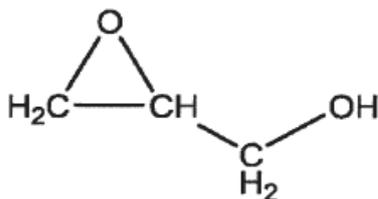
Fórmula 9



20

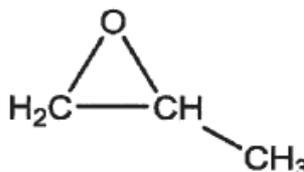
Glicidol (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

Fórmula 10



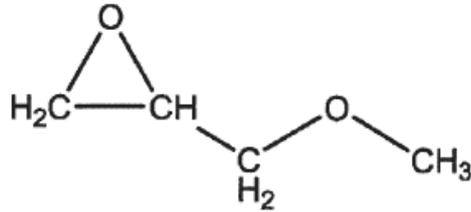
Óxido de propileno (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

25 Fórmula 11



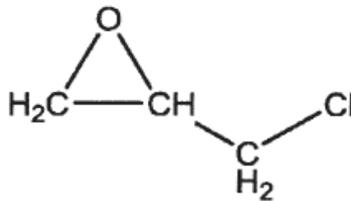
óxido de butileno, óxido de 2,3-butileno, 1,2-epoxi hexano y 1,2-epoxi hexadecano, glicidil metil éter (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

Fórmula 12



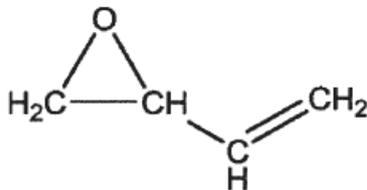
etil glicidil-éter, glicidil isopropil-éter e isocianurato de triglicidilo,  
epiclorhidrina (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

5 Fórmula 13



epibromhidrina y 2-(clorometil)-1,2-epoxi butano,  
Monóxido de 1,3-butadieno (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

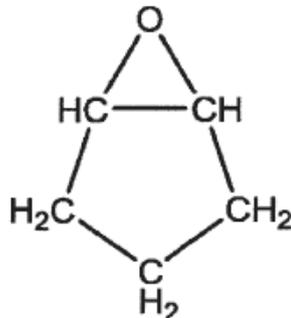
Fórmula 14



10

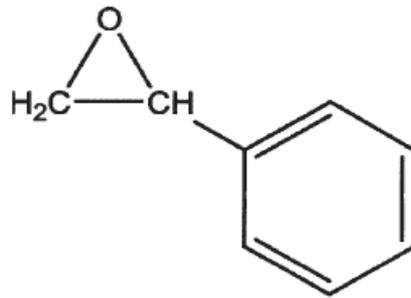
1,2-epoxi-5-hexeno y alil glicidil-éter,  
1,2-epoxi ciclopentano (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

Fórmula 15



15 1,2-epoxi ciclohexano y 1,2-epoxi-4-vinil ciclohexano, 3,4-epoxi tetrahidrofurano,  
óxido de estireno (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

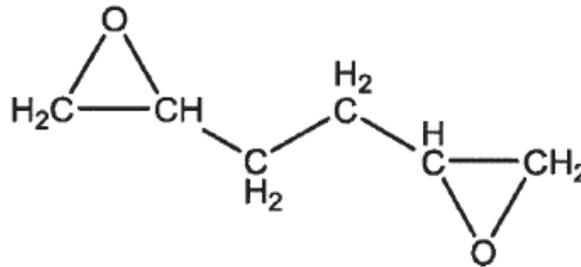
Fórmula 16



glicidil fenil éter y 4-glicidiloxi carbazol,

1,2:3,4-diepoxi butano (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

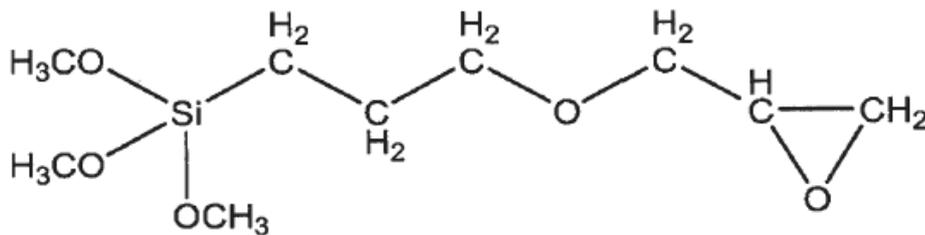
5 Fórmula 17



1,4-butandiol diglicidil-éter y etilenglicol diglicidil-éter,

3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

Fórmula 18

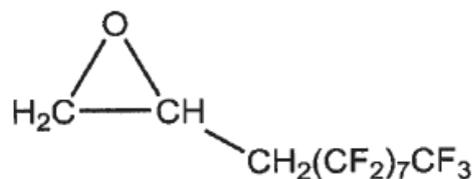


10

y 3-glicidiloxipropil (dimetoxi) metilsilano,

1,2-epoxi-1H, 1H, 2H, 3H, 3H heptadecafluoro-undecano (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

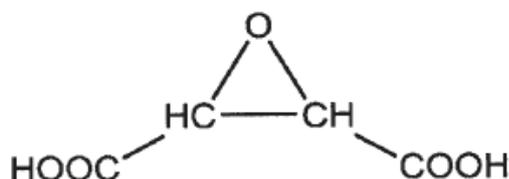
Fórmula 19



15

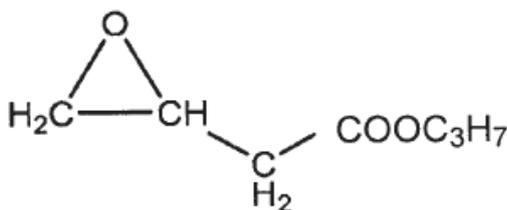
ácido epoxi succínico (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

Fórmula 20



butirato de glicidilo (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

FÓRMULA 21

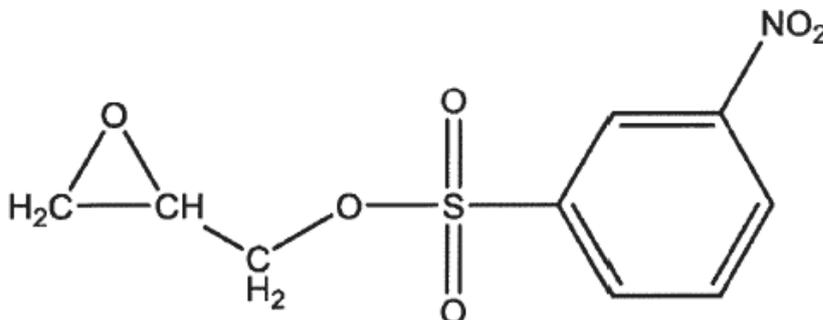


5

y N-glicidilftalimida y

glicidil-nitrobenzenosulfonato (remítase a la siguiente fórmula para ver una estructura del mismo),

Fórmula 22



10 y glicidil-p-toluensulfonato. Sin embargo, el compuesto (b) que tiene al menos un grupo epoxi no está limitado a ello.

En la definición anterior, el polímero de injerto catiónico puede ser un polímero de injerto de poliamina en el que el "monómero etilénicamente insaturado (c)" se selecciona del grupo que consiste en un monómero de vinilo, un monómero de estireno, un monómero de metacrilato, un monómero de acrilato, y monómero de acrilamida, un monómero de alilo, un monómero de dialilo y un ácido carboxílico insaturado.

15 El peso molecular del monómero etilénicamente insaturado (c) no tiene limitaciones particulares, pero es con preferencia de 28 a 1100, y de manera particularmente preferible de 28 a 500, desde el punto de vista de la eficacia del injerto o similar.

El número de átomos de carbono en el monómero etilénicamente insaturado (c) no tiene limitaciones particulares, pero, con preferencia, varía de 2 a 50, y de manera particularmente preferible, de 2 a 30.

20 Los ejemplos más específicos del monómero etilénicamente insaturado (c) utilizado con preferencia en la presente invención incluyen estireno, divinilbenceno, hidrato de p-estirensulfonato sódico, cloruro de vinilbencil trimetilamonio, acetato de vinilo, 1-vinilimidazol, 2-vinilpiridina, acrilonitrilo, clorhidrato de alilamina, clorhidrato de dialilina, clorhidrato de dialil dimetilamonio, particularmente una solución acuosa al 60 % del mismo, dimetil-acrilamida, hidroxietil-acrilamida, dimetilaminopropil-acrilamida, sal cuaternaria de metil-cloruro de dimetilaminopropil-acrilamida, N-(3-dimetilaminopropil)metacrilamida, 3-(trimetoxisilil)propil-metacrilato, acrilato de metilo y acrilato de butilo. Entre estos monómeros, se prefieren en particular dimetil-acrilamida, cloruro de dialil dimetil-amonio, estireno, acrilonitrilo y similares, desde el punto de vista de la reactividad con un átomo de carbono adyacente a un grupo hidroxilo en el polímero del tronco, de la utilidad de un grupo en un terminal de la cadena lateral después de realizar el injerto o similar.

La estructura química, el número de CAS o similares de cada uno de estos monómeros resultan una obviedad para un experto en la técnica y, por lo tanto, se omitirá su descripción.

5 El monómero etilénicamente insaturado (c) puede usarse individualmente o en combinación de dos o más tipos de los mismos, de acuerdo con un propósito de la presente invención. Cuando el monómero etilénicamente insaturado (c) se usa en una combinación de dos o más de sus tipos, todos los monómeros pueden corresponder a los ejemplos preferidos anteriores, o solo algunos monómeros pueden corresponder a los ejemplos preferidos anteriores.

10 La cantidad de grupos amino por unidad de peso contenida en el polímero de injerto catiónico fluctúa, con preferencia, de 0,1 a 17 mmol/g y, con particular preferencia, de 1 a 10 mmol/g. Cuando el polímero de injerto catiónico no se fija a una superficie de fase sólida, el diámetro promedio de partícula es, con preferencia, de 250 nm o menos y, con mayor preferencia, varía de 100 nm a 200 nm.

Como formas del "polímero de injerto catiónico", se ilustran los siguientes polímeros de injerto.

(1) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y dimetil acrilamida.

15 Se añadió por goteo óxido de propileno (2 equivalentes con respecto a la amina) a una polialilamina al 20 % en masa (peso molecular promedio en peso: 3000) mientras la polialilamina se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de una reacción a 20 °C durante 24 horas, la solución se concentró para obtener polialilamina modificada con óxido de propileno como una solución acuosa.

20 Se añadió agua a una polialilamina al 42 % en masa modificada con óxido de propileno preparada, de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 14 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 10. Posteriormente, cada uno de los siguientes, dimetilacrilamida al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 12,01 g de solución acuosa de APS [*ammonium persulfate*, persulfato de amonio] al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y dimetil acrilamida como una solución acuosa (peso molecular promedio en peso: 120.000).

25 (2) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio.

30 Se añadió agua a una polialilamina al 50 % en masa modificada con óxido de propileno, preparada de manera similar al punto (1), de modo tal que la concentración llegara a ser del 30 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 10. Posteriormente, se añadió cloruro de dialil-dimetilamonio (3 equivalentes con respecto a la amina) al 65 % en masa. Además, se añadieron 96,08 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (20 % en mol con respecto al monómero) por separado, y se realizó una polimerización durante 72 horas para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil- dimetilamonio, como una solución acuosa (peso molecular promedio en peso: 24.000).

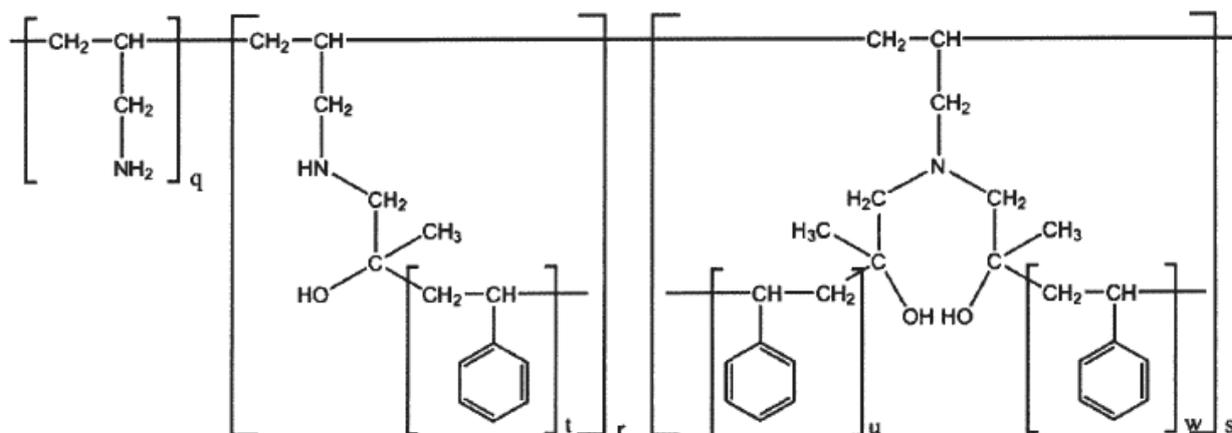
(3) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno.

35 Se añadió por goteo óxido de propileno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) a una polialilamina al 20 % en masa, mientras que la polialilamina se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de una reacción a 20 °C durante 24 horas, la solución se concentró para obtener polialilamina modificada con óxido de propileno como una solución acuosa.

40 Se añadió agua a la polialilamina modificada con óxido de propileno de modo tal que la concentración alcanzara el 20 % en masa; luego se añadió estireno (0,3 equivalentes con respecto a la amina), y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. A continuación, se añadieron 12,01 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (20 % en mol con respecto al monómero), y la polimerización se llevó a cabo durante 24 horas. Posteriormente, la solución resultante se calentó a 70 °C durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno con la siguiente estructura estimada (en la siguiente fórmula general: q es un número entero de 0 a 3000; r es un número entero de 0 a 3000; s es un número entero de 0 a 3000; t es un número entero de 0 a 10.000; u es un número entero de 0 a 10.000 y w es un número entero de 0 a 10.000) . El polímero de injerto tenía un diámetro medio de partícula de 120 nm.

45

Fórmula 23



(4) Producción de polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y dimetil acrilamida (producción a un pH de 7).

- 5 Se añadió agua a una polialilamina al 42 % en masa modificada con óxido de propileno, preparada de manera similar al punto (1), de modo tal que la concentración llegara a ser del 14 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. Posteriormente, se añadió un 35 % en masa de ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7. Cada uno de los siguientes, dimetilacrilamida (3 equivalentes con respecto a amina) y 12,01 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se agregó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y dimetil acrilamida, como una solución acuosa (peso molecular promedio en peso: 210.000).

(5) Polímero de injerto de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialil-dimetilamonio.

- 15 Se añadió agua a una polialilamina al 20 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 13 % en masa, y se añadió por goteo epoxi octano (0,1 equivalentes con respecto a la amina), mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 40 °C durante 24 horas y luego se concentró para obtener polialilamina modificada con epoxi octano como una solución acuosa.

- 20 Se añadió agua a la polialilamina al 30 % en masa modificada con epoxi octano, preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 19 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se añadió allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron, además, 14,42 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialildimetilamonio como una solución acuosa.

(6) Polímero de injerto de polialilamina modificada con etilenglicol diglicidil-éter y cloruro de dialil-dimetilamonio.

- 30 Se añadió agua a una polialilamina al 20 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 13 % en masa, y se añadió por goteo etilenglicol diglicidil-éter (0,05 equivalentes con respecto a la amina) mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 40 °C durante 24 horas y luego se concentró para obtener polialilamina modificada con etilenglicol diglicidil-éter como una solución acuosa.

- 35 Se añadió agua a la polialilamina al 30 % en masa modificada con etilenglicol diglicidil-éter preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 19 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, el cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 14,42 g del solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), cada uno de ellos, se añadió allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con etilenglicol diglicidil-éter y dialil-dimetilamonio como un gel amarillo.

(7) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de estireno y cloruro de dialil-dimetilamonio

- 40 Se añadió agua a una polialilamina al 20 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 13 % en masa, y se añadió por goteo óxido de estireno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) mientras la solución se

enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 40 °C durante 24 horas y luego se concentró para obtener polialilamina modificada con óxido de estireno como una solución acuosa.

5 Se añadió agua a la polialilamina al 30 % en masa modificada con óxido de estireno preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 19 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, se incorporaron cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), cada uno por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Después, se añadieron adicionalmente 14,42 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de estireno y cloruro de dialildimetilamonio como una solución acuosa.

(8) Polímero de injerto de polialilamina modificada con butirato de glicidilo y cloruro de dialil-dimetilamonio

15 Se añadió agua a una polialilamina al 20 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 13 % en masa, y se añadió por goteo butirato de glicidilo (0,1 equivalentes con respecto a la amina) mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 40 °C durante 24 horas y luego se concentró para obtener polialilamina modificada con butirato de glicidilo como una solución acuosa.

20 Se añadió agua a la polialilamina al 30 % en masa modificada con butirato de glicidilo preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 19 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron además 14,42 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con butirato de glicidilo y cloruro de dialildimetilamonio como una solución acuosa.

(9) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno

30 Se añadió agua a la polialilamina modificada con óxido de propileno, preparada de manera similar al punto (3), de modo tal que la concentración llegara al 20 % en masa; luego se añadió estireno (0,3 equivalentes con respecto a la amina), y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. A continuación, se añadieron 12,53 g de solución acuosa de SPS al 28,5 % en masa (20 % en mol con respecto al monómero), y se realizó una polimerización durante 24 horas. Posteriormente, la solución resultante se calentó a 70 °C durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno. El polímero de injerto tenía un diámetro medio de partícula de 135 nm.

(10) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno.

35 Se añadió agua a la polialilamina modificada con óxido de propileno, preparada de manera similar al punto (3) de modo tal que la concentración alcanzara el 20 % en masa, luego se añadió estireno (0,3 equivalentes con respecto a la amina), y la solución resultante se agitó a 80 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Después, se añadieron por goteo 12,01 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (20 % en mol con respecto al monómero), y se realizó una polimerización durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno. El polímero de injerto tenía un diámetro medio de partícula de 144 nm.

(11) Polímero de injerto de polialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialil-dimetilamonio

45 Se añadió agua a la dialilamina de modo tal que la concentración llegara a ser del 79 % en masa, y se añadió por goteo glicidol (1 equivalente con respecto a la amina) mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 45 °C durante 24 horas y luego se concentró para obtener dialilamina modificada con glicidol, como una solución acuosa.

50 Se añadió ácido clorhídrico al 35 % en masa (1 equivalente con respecto a la amina) a la dialilamina modificada con glicidol al 78 % en masa. Después de eso, se incorporó agua, de modo tal que la concentración llegara a ser del 50 % en masa. La solución resultante se calentó a 60 °C, se le añadió diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-metil propionamida) (6 % en mol con respecto al monómero) por separado, y la polimerización se llevó a cabo durante 24 horas. La solución resultante se purificó por electrodiálisis para obtener polialilamina modificada con glicidol como una solución acuosa.

55 Se añadió agua a la polialilamina modificada con glicidol al 43 % en masa, preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 30 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 11. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 36,04 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó por separado, y la polimerización se realizó

durante 24 horas. Después, se añadieron además 36,04 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), y la polimerización se realizó a 50 °C, durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de polidialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialil-dimetilamonio, como solución acuosa (peso molecular promedio en peso: 84.000).

5 (12) Polímero de injerto de polietilenimina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio

Se añadió por goteo óxido de propileno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) a una polietilenimina al 47 % en masa (peso molecular promedio en peso: 2000) mientras la polietilenimina se agitaba. Se permitió que la solución resultante reaccionara a 20 °C, durante 24 horas, para obtener una solución acuosa de polietilenimina modificada con óxido de propileno.

- 10 Se añadió agua a la polietilenimina modificada con óxido de propileno al 50 % en masa, preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 14 % en masa y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 31,23 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto de polietilenimina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio como una solución acuosa.

(13) Polímero de injerto de polivinilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio

- 20 Se añadió por goteo óxido de propileno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) a una polivinilamina al 15 % en masa (peso molecular promedio en peso: 150.000) mientras la polivinilamina se agitaba. Después de la reacción a 20 °C durante 24 horas, la solución se concentró, para obtener una solución acuosa de polivinilamina modificada con óxido de propileno al 23 % en masa.

- 25 Se añadió agua a la polivinilamina modificada con óxido de propileno al 23 % en masa, preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 15 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 31,23 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de polivinilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio como una solución acuosa.

(14) Polímero de injerto de polidialilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio

- 30 Se añadió agua a la dialilamina, de modo tal que la concentración llegara a ser del 78 % en masa, y se añadió por goteo óxido de propileno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Se permitió que la solución reaccionara a 20 °C durante 24 horas para obtener dialilamina modificada con óxido de propileno como una solución acuosa.

- 35 Se añadió ácido clorhídrico al 35 % en masa (1 equivalente con respecto a la amina) a la dialilamina modificada con óxido de propileno al 79 % en masa, para obtener el clorhidrato de dialilamina modificada con óxido de propileno al 59 % en masa, en forma de una solución acuosa. Se añadió agua a los 41,33 g resultantes del clorhidrato de dialilamina modificada con óxido de propileno al 59 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 7 % en masa, y la solución resultante se calentó a 60 °C. Posteriormente, se añadieron 123,99 g del clorhidrato de dialilamina modificada con óxido de propileno al 59 % en masa y diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-metil propionamida) (5,6 % en mol con respecto al monómero), por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. La solución resultante se purificó por electrodiálisis para obtener polidialilamina modificada con óxido de propileno como una solución acuosa.

- 45 Se añadió agua a la polidialilamina modificada con óxido de propileno al 30 % en masa, preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 24 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporaron por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Después, se añadieron 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), y se realizó una polimerización a 60 °C durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto de polidialilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio como solución acuosa (peso molecular promedio en peso: 19.000).

(15) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio (peso molecular promedio en peso: 2000, uso de polialilamina modificada con óxido de propileno en la que se ha agregado óxido de propileno en una cantidad de 0,1 equivalentes con respecto a la amina).

- 55 Se añadió por goteo óxido de propileno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) a una polialilamina (peso molecular promedio en peso: 1600) al 15 % en masa, mientras la polialilamina se enfriaba con agua helada y se

agitaba. Después de una reacción a 20 °C durante 24 horas, la solución se concentró, para obtener polialilamina modificada con óxido de propileno como una solución acuosa.

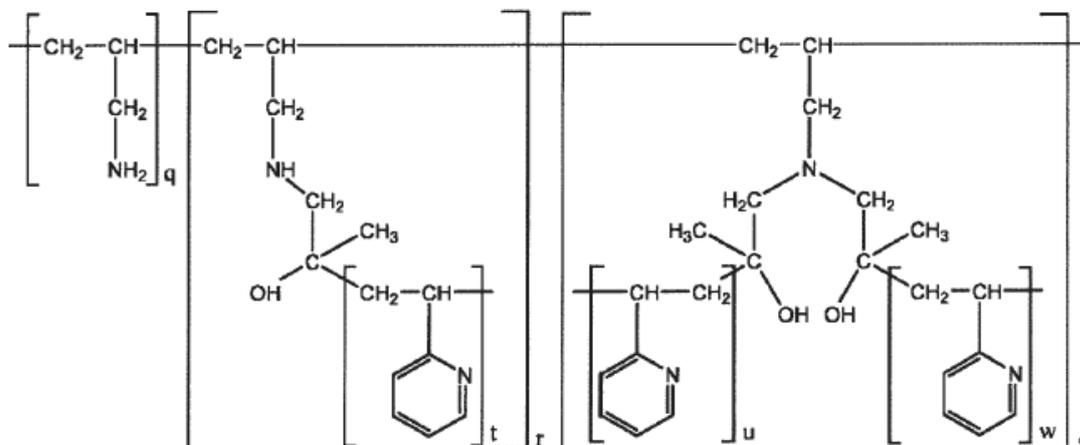
5 Se añadió agua a la polialilamina al 30 % en masa modificada con óxido de propileno preparada de acuerdo con el método anterior, de modo tal que la concentración llegara a ser del 18 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 10. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), y se realizó una polimerización a 60 °C durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y cloruro de dialil-dimetilamonio como solución acuosa (peso molecular promedio en peso: 16.000).

(16) Polímero de injerto de polialilamina modificada con óxido de propileno y 2-vinilpiridina

15 Se añadió agua a la polialilamina modificada con óxido de propileno, preparada de manera similar al punto (3), de modo tal que la concentración llegara a ser del 20 % en masa. Posteriormente, se añadió 2-vinilpiridina (0,3 equivalentes con respecto a la amina), y la solución resultante se agitó a 20 °C. La solución de reacción tenía un pH de 12. Después, se añadieron por goteo 12,01 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (20 % en mol con respecto al monómero), y se realizó una polimerización durante 24 horas para obtener un polímero de injerto de óxido de polialilamina modificada con óxido de propileno y 2-vinilpiridina. El polímero de injerto tenía un diámetro medio de partícula de 225 nm.

20 Se estimó que el polímero de injerto resultante tenía la siguiente estructura a partir de materias primas de inicio o similares (en la siguiente fórmula general, q es un número entero de 0 a 3000; r es un número entero de 0 a 3000; s es un número entero de 0 a 3000; t es un número entero de 0 a 10.000; u es un número entero de 0 a 10.000; y w es un número entero de 0 a 10.000).

Fórmula 24



25 Una "muestra" es una mezcla que se sospecha que incluye una "diana" como una diana de detección. La "muestra" deriva de un cuerpo vivo, que incluye un ser humano (por ejemplo, sangre, saliva, un fluido corporal o un tejido corporal), el medio ambiente (por ejemplo, el suelo, el agua de mar o el agua ambiental (agua termal, agua de baño o agua de la torre de enfriamiento)), o un producto artificial o natural (por ejemplo, alimentos procesados como pan, alimentos fermentados, como yogur, una planta cultivada, como arroz o trigo, un microorganismo o un virus).

30 La "muestra" puede ser un producto obtenido mediante la purificación y separación de estos, según sea necesario. Sus ejemplos incluyen plasma sanguíneo y suero sanguíneo obtenidos de la sangre.

A la "muestra" se le puede añadir una sal de ion metálico.

35 La "muestra" puede contener un tensioactivo, y el tensioactivo puede añadirse antes de que se detecte la "diana". Los ejemplos de tensioactivo incluyen un tensioactivo Triton (marca registrada) (poli (oxietileno)octilfenil-éter o similar), un tensioactivo Tween (marca registrada) (éster de ácido graso de polioxietileno-sorbitán o similar), un tensioactivo Brij (marca registrada) alquiléter de polioxietileno o similar, laurato de sacarosa (Dojindo), saponina (Sigma-Aldrich), BPSH (NIKKOL), NOIGEN TDS-70 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) y TritonX-705 (Sigma Aldrich).

40 La "diana" es un objeto que debe ser detectado mediante la presente invención. La "diana" no tiene limitaciones,

pero con preferencia puede tener una carga negativa. Sus ejemplos incluyen una célula, hongos, bacterias, un virus, un producto de degradación de los mismos, un péptido y un ácido nucleico.

5 La célula puede ser no solo una célula presente en un cuerpo vivo sino también una célula cultivada. La célula puede ser no solo una célula normal, sino también una célula cancerosa (por ejemplo, una célula tumoral que circula (CTC, *circulating tumor cell*) en la sangre).

El término hongo es un nombre genérico de un organismo generalmente llamado seta, moho o levadura. Sus ejemplos incluyen *Trichophyton*, *candida* y *Aspergillus*.

10 Cada una de las bacterias es un procarionta que tiene una membrana celular. Sus ejemplos incluyen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium botulinum*, tétanos y *Streptococci*.

El virus es una estructura diminuta, capaz de autorreplicarse usando una célula de otro organismo, y está formada por una cubierta de proteína y un ácido nucleico contenido en ella. Sus ejemplos incluyen norovirus, rotavirus, virus de la influenza, adenovirus, coronavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la hepatitis, virus del herpes y VIH.

15 Los productos de degradación de la célula, los hongos, las bacterias y el virus son sustancias para su constitución y pueden contener un lípido de ácido fosfórico de una fracción de membrana o similares de orgánulos (núcleo, aparato de Golgi, mitocondrias o similares), la célula, los hongos o las bacterias (incluso una vesícula con su parte interior hacia afuera), o puede ser un complejo de las sustancias que constituyen la célula, los hongos, las bacterias y el virus, o similares. Los productos de degradación de la célula, los hongos, las bacterias y el virus pueden ser una vesícula diminuta de membrana (por ejemplo, Micropartícula endotelial: EMP [*Endothelial Microparticle*]) o una vesícula generada por apoptosis, aunque la vesícula diminuta de membrana o la vesícula no estén presentes en una célula normal.

20

25 El péptido contiene una proteína completa, lo que significa una serie de moléculas formadas al conectar varios aminoácidos y el funcionamiento en un cuerpo vivo, y puede incluir varias de las denominadas modificaciones postraduccion (por ejemplo, glicosilación: modificación de la cadena de azúcar).

30 El ácido nucleico puede ser un desoxirribonucleótido (ADN), un ribonucleótido (ARN) o una mezcla o un complejo unido del mismo. Una base constituyente del mismo es un nucleótido natural, por ejemplo, guanina (G), adenina (A), timina (T), citosina (C) o uracilo (U). Sin embargo, puede haber cualquier otra base modificada natural o artificial. Aquí, la "base modificada" significa una base obtenida al someter los cinco nucleótidos anteriores a una modificación química. Sus ejemplos incluyen metil-citidina, pseudouridina, 4-tiouridina, dihidrouridina, queuosina e hipoxantina (inosina (I)), aunque la base modificada no está limitada a ellos. También se incluye el ADNc producido por una reacción de transcripción inversa, utilizando ARN como plantilla.

35 "En condiciones básicas" significa que el pH es de 8 o más, con preferencia, de 9 o más, con mayor preferencia, de 10 o más, y aún con mayor preferencia, de 11 o más. Es preferible formar la condición básica utilizando una solución básica. Los ejemplos de la solución básica incluyen una base débil, una base fuerte, tal como una solución acuosa de NaOH y un tampón, con una capacidad de tampón a un pH de 8 o más, (por ejemplo, un tampón de glicina, CHES [por sus siglas en inglés] o CAPS [por sus siglas en inglés]).

40 Una forma en la que un polímero de injerto catiónico "se pone en contacto" con una muestra que contiene una sustancia diana incluye una forma en la que se agrega un polímero de injerto catiónico a una muestra, además de una forma en la que se incorpora una solución de polímero de injerto catiónico a una muestra.

La "unión" significa un estado en el que un polímero de injerto catiónico interactúa con la diana mediante un enlace de coordinación y/o un enlace iónico.

"Separar" un complejo unido significa desenrollar un complejo unido en una condición ácida o desenrollar la "unión" anterior de un polímero de injerto catiónico y una diana en presencia de un agente quelante.

45 "En una condición ácida" significa que el pH es de 7 o menos, con preferencia, de 6 o menos, y con mayor preferencia, de 5 o menos. Es preferible formar la condición ácida usando una solución ácida. Los ejemplos de la solución ácida incluyen un tampón de glicina, una solución de ácido fórmico y una solución de ácido acético.

50 Los ejemplos del agente quelante incluyen ácido etilendiamin-tetraacético (EDTA [por sus siglas en inglés]) y ácido glicol éter-diamintetraacético (EGTA [por sus siglas en inglés]). El pH no tiene limitaciones, siempre y cuando un protón en un agente quelante se desprenda al pH, aunque con preferencia, el pH varía de 6,0 a 8,0.

"Eluir la sustancia diana" significa que la sustancia diana se disuelve en una solución adecuada, después de la reacción de "separación" anterior. Cuando la sustancia diana es una célula viva, "eluir la sustancia diana" significa recolección sin romper una membrana celular.

Los ejemplos del ion metálico divalente o trivalente incluyen  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $SR^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,

$Al^{3+}$ ,  $CR^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Sn^{2+}$ .

5 “Fijación a una superficie de fase sólida” significa que el “polímero de injerto catiónico” se distribuye de manera despareja. Específicamente, “fijación a una superficie de fase sólida” significa que el “polímero de injerto catiónico” se fija a una superficie de vidrio, una membrana de nailon, una oblea semiconductora, microperlas, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas coloidales o similares, o que la superficie está recubierta con el “polímero de injerto catiónico”, aunque no se limita a ello. Como método de fijación, el “polímero de injerto catiónico” puede fijarse directamente a una superficie de vidrio o similar, utilizando una técnica conocida, o puede fijarse indirectamente a través de una molécula enlazadora. Un polímero de injerto catiónico fijado a una superficie de fase sólida puede sintetizarse polimerizando un monómero sobre la superficie de fase sólida.

10 “Fijación a una superficie de fase sólida” también puede significar que con el “polímero de injerto catiónico” se llena una columna cromatográfica o similar.

15 “Lavar un complejo unido” significa una operación para eliminar impurezas unidas no específicamente a un polímero de injerto catiónico, mientras se mantiene la unión entre el “polímero de injerto catiónico” y la “sustancia diana”. Para el lavado, se puede usar la misma solución que la solución usada en la reacción de unión, o se puede usar otra solución. Se puede usar una solución salina fisiológica o un alcohol.

20 Los ejemplos de “agregación de un polímero de injerto catiónico no unido a una sustancia diana” incluyen la separación de un polímero de injerto catiónico, mediante una interacción hidrófoba, o la agregación de un polímero de injerto catiónico mediante una interacción iónica con un polianión, como un contraión o un tensoactivo aniónico para la separación. Más específicamente, un polímero de injerto catiónico se agrega mediante una interacción hidrofóbica de acetonitrilo o una interacción iónica con un polianión o un tensoactivo iónico, usando una solución de agregación (que incluye un disolvente polar aprótico (como el acetonitrilo), un tensoactivo aniónico (como el octanosulfonato de sodio) o decanosulfonato de sodio), y un polianión (polialilamina carboximetilada: CMPAA [por sus siglas en inglés])).

25 El “polímero de injerto catiónico”, la “solución de reacción”, la “solución de lavado”, la “solución de dispersión” y la “solución de agregación” anteriores pueden incluir no solo un tipo líquido (un tipo emulsionado en el caso del “polímero de injerto catiónico”), sino también un producto obtenido por secado de la solución.

### Ejemplos

La presente invención se describirá de un modo más detallado con los siguientes ejemplos, ejemplos comparativos y ejemplos de referencia, aunque no se limita a ellos.

30 Ejemplo 1

Separación de *Escherichia coli* y confirmación de recuperación.

#### 1. Método

Se determinó la recuperación de *Escherichia coli* recolectada con un polímero de injerto catiónico utilizando un analizador de células sanguíneas (Sysmex).

35 Las muestras y los reactivos son los siguientes.

#### 1) Muestra

La *Escherichia coli* se produjo utilizando un kit de expresión de la GFP, fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.

La *Escherichia coli* producida se añadió a suero sanguíneo humano normal, en una cantidad necesaria ( $1$  a  $2 \times 10^4$  células/ $\mu$ l) y la mezcla resultante se usó como muestra.

40 2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M

II: solución de dispersión: glicina 500 mM-HCl, pH 5,0

#### 3) Polímero de injerto catiónico

45 Se añadió por goteo óxido de propileno (0,1 equivalentes con respecto a la amina) a una polialilamina al 20 % en masa (peso molecular promedio en peso: 3000), mientras que la polialilamina se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la reacción a 20 °C durante 24 horas, la solución se concentró, para obtener polialilamina modificada con óxido de propileno como una solución acuosa.

Se añadió agua a la polialilamina modificada con óxido de propileno de modo tal que la concentración alcanzara el 20 % en masa, luego se añadió estireno (0,3 equivalentes con respecto a la amina), y la solución resultante se agitó

5 a 20 °C. Después de eso, se añadieron 12,01 g de una solución acuosa de persulfato de amonio (APS) a una concentración del 28,5 % en masa (20 % en mol con respecto al monómero), y la polimerización se realizó durante 24 horas. Posteriormente, la solución resultante se calentó a 70 °C durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto catiónico de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno (diámetro de partícula promedio: 120 nm) (el polímero de injerto (3) anterior, de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno)).

4) Analizador de células sanguíneas

Se detectó *Escherichia coli* en una plaqueta (PLT) utilizando el analizador de células sanguíneas.

La medición se realizó de acuerdo con un protocolo del analizador de células sanguíneas.

La separación de la *Escherichia coli* y la confirmación de la recuperación se realizaron de la siguiente manera.

10 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 50 µl de un polímero de injerto catiónico al 20 % y 100 µl de una solución de reacción y se dejó reaccionar durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, con una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. Se recogió el sobrenadante, y el sedimento de precipitación resultante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión, para obtener una suspensión. Se determinó una recuperación de *Escherichia coli* para el sobrenadante o  
15 la suspensión utilizando el analizador de células sanguíneas. Como control, se usó *Escherichia coli* antes de una reacción con un polímero de injerto catiónico.

2. Resultado

La tabla 1 muestra los resultados de la medición con el analizador de células sanguíneas.

Tabla 1

	Ejemplo 1 10 <sup>4</sup> células/µl	Control 10 <sup>4</sup> células/µl
Sobrenadante	0,2	1,7
Suspensión	1,2	-

20 Los resultados de la tabla 1 indican que la recuperación fue de alrededor del 70 %, lo cual fue una recuperación excelente.

Ejemplo 2

Confirmación de supervivencia (viabilidad) de la *Escherichia coli* separada

25 1. Método

Se separó la *Escherichia coli* en sangre con un polímero de injerto catiónico, y la confirmación de la supervivencia de la *Escherichia coli* separada se realizó por cultivo.

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

1) Muestra

30 Se añadió la *Escherichia coli* producida utilizando el kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. a suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria, de una manera similar al ejemplo 1, y la mezcla resultante se usó como muestra.

2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

35 II: solución de dispersión: glicina-HCl 500 mM, pH 5,0.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

La separación de *Escherichia coli* y la confirmación de supervivencia (viabilidad) de la misma se realizaron de la siguiente manera.

40 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 50 µl de un polímero de injerto catiónico al 20 % y 100 µl de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El

sobrenadante se eliminó y el sedimento de precipitación resultante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión, para obtener una suspensión (figura 2). Cinco milésimas de cada sobrenadante y la suspensión se cultivaron a 37 °C, durante 18 horas, utilizando un medio de agar de cultivo de bacterias LB, y se realizó la confirmación de la supervivencia (figura 3).

- 5 Como ejemplos comparativos, se obtuvo un gránulo de precipitación de una manera similar a los ejemplos. Posteriormente, se añadieron 500 µl de una solución de NaCl 1,5 M (ejemplo comparativo 1) y 500 µl de TritonX-100 al 1,5 % (ejemplo comparativo 2), y el gránulo se dispersó completamente. Cada uno de los sobrenadantes y las soluciones de dispersión se cultivaron de manera similar a los ejemplos, y se confirmó la viabilidad.

2. Resultado

- 10 La tabla 2 muestra los resultados del cultivo.

Tabla 2

	Ejemplo 2 Colonia	Ejemplo comparativo 1 Colonia	Ejemplo comparativo 2 Colonia
Sobrenadante	0	0	0
Suspensión	112	53	16

Los resultados de la tabla 2 indican que las bacterias se pueden recolectar mientras están vivas sin someterlas a bacteriólisis, utilizando el método de la presente invención.

- 15 Ejemplo 3

Medición mediante espectrometría de masas.

1. Método

- 20 La *Escherichia coli* recolectada con un polímero de injerto catiónico se sometió a identificación bacteriana utilizando una espectrometría de masas MALDI TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-time of flight* (desorción/ionización láser asistida por matriz, tiempo de vuelo), MALDI BioTyper (marca registrada) (Bruker Daltonics K.K.).

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

1) Muestra

Se produjo *Escherichia coli* utilizando un kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.

- 25 La *Escherichia coli* producida se añadió a una solución salina fisiológica en una cantidad necesaria y la mezcla resultante se usó como muestra.

2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

II: solución de dispersión: ácido fórmico al 70 %.

- 30 III: solución de agregación: acetonitrilo 100 %.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

4) Espectrometría de masas

Como matriz se empleó la matriz HCCA, en porciones, fabricada por Bruker Daltonics K.K.

- 35 La medición se realizó de acuerdo con un protocolo de MALDI Bio Typer (marca registrada). La determinación de la identificación bacteriana se evaluó mediante una puntuación especificada por BioTyper (marca registrada).

La separación de la *Escherichia coli* y la medición mediante espectrometría de masas se realizaron de la siguiente manera.

- 40 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 50 µl de un polímero de injerto catiónico al 20 % y 100 µl de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa para obtener un gránulo de precipitación (figura

5 1). El sobrenadante se eliminó, el gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 50 µl de una solución de extracción-dispersión, y se extrajo una proteína en una célula bacteriana. Después de eso, se añadieron 200 µl de una solución de agregación, y la mezcla resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para precipitar un polímero de injerto catiónico. El sobrenadante se recogió para utilizarlo como muestra para la medición utilizando la espectrometría de masas.

2. Resultado

La tabla 3 muestra el resultado de la medición utilizando la espectrometría de masas.

Tabla 3

Puntuación del ejemplo 3
2,12

10 El resultado de la tabla 3 indica que la puntuación de identificación fue de 1,7 o más, lo cual se tradujo en una precisión de identificación excelente. Este resultado indica que es posible extraer una proteína en *Escherichia coli* y realizar una medición utilizando la espectrometría de masas.

Ejemplos 4 y 5

Separación de ácido nucleico en suero sanguíneo y confirmación de recuperación.

15 1. Método

Se separó un ácido nucleico añadido al suero sanguíneo con un polímero de injerto catiónico. El ácido nucleico resultante se sometió a electroforesis en agarosa, se tiñó con SYBR Safe (invitrogen) y se detectó mediante LAS4000 (GE). La recuperación se determinó a partir de una intensidad de fluorescencia de un punto.

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

20 1) Muestra

Como ácido nucleico, se utilizaron un plásmido y un genoma. El plásmido se extrajo de *Escherichia coli* (ejemplo 4) y el genoma se extrajo de una célula Hela (ejemplo 5). La solución plasmídica extraída se cultivó utilizando un medio de agar de cultivo de bacterias LB y no se formó colonia alguna. Por lo tanto, se confirmó que no había contaminación de *Escherichia coli*. Tampoco se confirmó contaminación de la célula presente en la solución de genoma extraída utilizando un microscopio de fluorescencia.

25 El ADN extraído se añadió a un suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria para usar como muestra. Como control, se usó suero de sangre humana normal que no contenía ADN.

2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

30 II: solución de dispersión: 500 mM EDTA-2Na, pH 8,0.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

4) Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa al 1,0 %.

35 Para ajustar una muestra para electroforesis, se usó 6 × Loading Dye (TOYOBO).

La separación del ácido nucleico y su método de detección se llevaron a cabo de la siguiente manera.

40 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 50 µl de un polímero de injerto catiónico al 20 % y 100 µl de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. Al sobrenadante y a la suspensión, se les añadieron 500 µl de un reactivo de extracción de ácido nucleico fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) fabricado por Nacalai Tesque, Inc., y se separó en una fase de fenol y una fase acuosa. Se recogieron 300 µl de ADN en la fase acuosa, se mezclaron 600 µl de etanol y 30 µl de una solución acuosa de acetato de sodio, y el ADN se precipitó mediante precipitación con etanol. El precipitado se suspendió en 100 µl de agua destilada y se mezcló con Loading Dye, para utilizarlo como muestra para la electroforesis. La

electroforesis se realizó utilizando un gel de agarosa al 1 %. La tinción se realizó con SYBR Safe y luego se detectó de forma fluorescente con LAS4000 (figura 4).

2. Resultado

La tabla 4 muestra los resultados de una cantidad recogida de ADN.

5

Tabla 4

	Ejemplo 4 $\mu\text{g/ml}$	Ejemplo 5 $\mu\text{g/ml}$
Antes del tratamiento	54	280
Después del tratamiento	32	112
Recuperación	60 %	40 %

Los resultados de la tabla 4 indican que la recuperación del ADN del plásmido fue del 60 % y que la recuperación del ADN del genoma fue del 40 %.

Ejemplo 6

10 Separación de células en suero sanguíneo, recuperación y confirmación de la estructura tridimensional y de la estructura superficial

1. Método

Se separó una célula añadida al suero sanguíneo con un polímero de injerto catiónico. La recuperación de la célula se confirmó utilizando el analizador de células sanguíneas (Sysmex). Se confirmó una reacción antígeno-anticuerpo en la superficie de la célula utilizando un microscopio de fluorescencia (Life technologies).

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

1) Muestra

Como célula, se usó una célula Hela, y la célula Hela se añadió a un suero sanguíneo humano normal en una cantidad necesaria ( $1 \text{ a } 2 \times 10^6$  células/ml), y la mezcla resultante se usó como muestra.

20 2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

II: solución de dispersión: EDTA 500 mM-2Na, pH 8,0

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

25 4) Analizador de células sanguíneas

La célula se midió como WBC.

La medición se realizó de acuerdo con un protocolo del analizador de células sanguíneas, de una manera similar al ejemplo 1.

5) Anticuerpo

30 Como anticuerpo primario, se diluyeron CD 146 antihumano (MCAM) y un anticuerpo monoclonal (N 1238) (MONOSAM) 50 veces, para su utilización.

Como un anticuerpo secundario, se diluyó IgG anti-ratón Alexa Fluor 594 (Life Technologies), 500 veces para su uso.

Se permitió que el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario reaccionaran, mezclando por inversión durante una hora, protegidos de la luz, para preparar un anticuerpo con marcaje fluorescente.

35 Los métodos para separar y detectar una célula se realizaron de la siguiente manera.

Se mezclaron 500  $\mu\text{l}$  de una muestra, 50  $\mu\text{l}$  de un polímero de injerto catiónico al 20 % y 100  $\mu\text{l}$  de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. Se recogió el sobrenadante y el sedimento de precipitación resultante se dispersó completamente con 500  $\mu\text{l}$  de una

solución de dispersión (figura 5). Se midió la recuperación del sobrenadante recogido o la suspensión resultante utilizando el analizador de células sanguíneas. Como control, se usó una célula antes de una reacción con un polímero de injerto catiónico.

5 Posteriormente, la suspensión se mezcló con un anticuerpo con marcaje fluorescente, y se dejó reaccionar mediante una mezcla por inversión, durante una hora, protegida de la luz, para confirmar una reacción antígeno-anticuerpo usando un microscopio de fluorescencia (figura 6).

2. Resultado

La tabla 5 muestra los valores medidos de WBC, utilizando el analizador de células sanguíneas.

Tabla 5

	Ejemplo 6 10 <sup>2</sup> células/μl	Control 10 <sup>2</sup> células/μl
Sobrenadante	0,1	17,5
Suspensión	17,1	-

10 Los resultados de la tabla 5 indican que la recuperación fue de alrededor del 98 %, lo que se tradujo en una recuperación excelente.

15 El analizador de células sanguíneas mide una sustancia que tiene un núcleo como WBC. Por lo tanto, se puede recolectar una célula mientras se mantiene una estructura tridimensional utilizando el método de la presente invención.

Se confirmó una reacción antígeno-anticuerpo entre la célula Hela y el anticuerpo MCAM, utilizando un microscopio de fluorescencia. Estos resultados indican que la célula se puede recolectar mientras mantiene una estructura de superficie de la misma.

Ejemplo 7

20 Separación de la vesícula en el suero sanguíneo, recuperación y confirmación de la estructura tridimensional y de la estructura superficial

1. Método

25 Una vesícula añadida al suero sanguíneo se separó con un polímero de injerto catiónico. La recuperación de la vesícula se confirmó utilizando el analizador de células sanguíneas. El hecho de que la vesícula separada mantuviera la estructura tridimensional y la estructura superficial se confirmaba con un microscopio de fluorescencia (tecnologías de vida).

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

1) Muestra

Se produjo una vesícula aplastando una célula de Hela con un sonicador.

30 Para observar la vesícula utilizando un microscopio de fluorescencia, la célula se trituró en una solución acuosa con un tinte fluorescente (DyLight, Ex/Em: 493/518), incluida en un kit de etiquetado de anticuerpos DyLight 488 (Thermo), y el tinte fluorescente se incorporó en la vesícula.

La vesícula producida se añadió al suero sanguíneo humano normal en una cantidad necesaria para usar como muestra.

35 2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

II: solución de dispersión: 500 mM EDTA-2Na, pH 8,0.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

40 4) Analizador de células sanguíneas

La vesícula se midió como WBC.

La medición se realizó de acuerdo con un protocolo del analizador de células sanguíneas, de una manera similar al ejemplo 1.

5) Anticuerpo

5 Como anticuerpo primario, se diluyeron un CD 146 antihumano (MCAM) y un anticuerpo monoclonal (N 1238) (MONOSAM) 50 veces para su uso.

Como anticuerpo secundario, se diluyó IgG antirratón Alexa Fluor 594 (Life Technologies), 500 veces para su uso.

Se dejó que el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario reaccionaran mezclando por inversión, durante una hora, protegidos de la luz, para preparar un anticuerpo con marcaje fluorescente.

Los métodos para separar y detectar una vesícula se realizaron de la siguiente manera.

10 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 100 µl de un polímero de injerto catiónico al 10 % y 50 µl de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. Se recogió el sobrenadante y el gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión para obtener una suspensión (figura 7). Se midió la recuperación del sobrenadante recogido o  
15 la suspensión resultante utilizando el analizador de células sanguíneas. Como control, se usó una vesícula antes de la reacción con un polímero de injerto catiónico.

Posteriormente, la suspensión se mezcló con un anticuerpo con marcaje fluorescente, y se dejó reaccionar mediante una mezcla por inversión durante una hora, protegida de la luz para confirmar la reacción antígeno-anticuerpo usando un microscopio de fluorescencia (figura 8).

20 2. Resultado

La tabla 6 muestra los valores medidos de la vesícula utilizando el analizador de células sanguíneas.

Tabla 6

	Ejemplo 7 10 <sup>2</sup> células/µl	Control 10 <sup>2</sup> células/µl
Sobrenadante	0,1	22,5
Suspensión	18.5	-

25 Los resultados de la tabla 6 indican que la recuperación de la vesícula fue del 82 %, lo cual se tradujo en una recuperación excelente.

El estado en el que un tinte fluorescente se incorporaba en la vesícula en la suspensión, y en el que un borde de la vesícula quedaba rodeado por un anticuerpo con marcaje fluorescente se confirmó usando un microscopio de fluorescencia. Estos resultados indican que es posible recolectar la vesícula mientras que al mismo tiempo se mantiene una estructura tridimensional y una estructura superficial de la misma.

30 Ejemplo de referencia 1

Separación de una partícula de virus y confirmación de la recolección.

1. Método

35 Como modelo de un virus formado por una cubierta de proteína y un ácido nucleico contenido en ella, se utilizó un bacteriófago. La solución de fago que tenía un título constante se ajustó, el bacteriófago se recogió mediante el método de la presente invención, y el título se calculó después de la recolección, contando una placa en la que la *Escherichia coli* se sometió a bacteriolisis.

1) Muestra

Bacteriófago

Hospedador: *Escherichia coli*

40 2) Reactivo

I: solución de reacción: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

II: solución de dispersión: glicina-HCl 500 mM, pH 5,0.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

Los métodos para separar y detectar el bacteriófago se realizaron de la siguiente manera.

5 Se mezclaron 500 µl de una muestra de bacteriófagos, 100 µl de un polímero de injerto catiónico al 10 % y 50 µl de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. Se recogió el sobrenadante y el gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión, para obtener una suspensión. La solución resultante se diluyó en serie. La solución diluida se mezcló con una solución de cultivo de *Escherichia coli* del hospedador. La mezcla resultante se añadió a agar blando y se cultivó en una placa de agar durante la noche. El título del fago recogido se calcula a partir del número de la placa.

Ejemplo 8

Confirmación de la supervivencia (viabilidad) de las bacterias recolectadas utilizando una solución que contiene tensioactivo

15 1. Método

Se recoge la *Escherichia coli* precipitada en un agente de separación en un tubo de recolección de sangre mientras está viva, usando una solución que contiene tensioactivo no iónico.

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

1) Muestra

20 La *Escherichia coli* se produjo utilizando un kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.

La *Escherichia coli* producida se añadió a una solución salina fisiológica, en una cantidad de  $2 \times 10^8$  células/ml, y la mezcla resultante se usó como muestra.

2) Reactivo

I: solución de tensioactivo al 1 %.

25 En los Experimentos 1 a 6, se usaron laurato de sacarosa (Dojindo), saponina (Sigma-Aldrich), BPSH (NIKKOL), NOIGEN TDS-70 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.), Triton X-705 (Sigma-Aldrich) y CHAPS (Dojindo), como tensioactivos.

Tabla 7

Clasificación	Tensioactivo	
No iónico	Experimento 1	Laurato de sacarosa
	Experimento 2	Saponina
	Experimento 3	BPSH
	Experimento 4	NOIGEN TDS-70
	Experimento 5	Triton X-705
Zwitteriónico	Experimento 6	CHAPS

30 II: solución de reacción: glicina 1M, pH 11,0, cloruro de magnesio 3M.

III: solución de dispersión: glicina 500 mM, pH 5,0.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

35 La recolección de la célula bacteriana y la confirmación de supervivencia (viabilidad) de la misma se realizaron de la siguiente manera.

A un tubo de recolección de sangre, se añadieron 3 ml de una solución bacteriana, en la que se había dispersado *Escherichia coli* en una solución salina fisiológica, y se centrifugó a 3000 rpm durante cinco minutos. Luego, se retiró el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml de una solución de agente tensioactivo al 1 % al tubo de

recolección de sangre y se dispersó una célula bacteriana precipitada sobre una superficie de un agente de separación.

5 La suspensión de células bacterianas se dejó reposar a 20 °C, durante 30 minutos y durante tres horas. Posteriormente, se mezclaron 100 µl de un polímero de injerto catiónico al 10 % y 100 µl de una solución de reacción y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Después, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se eliminó y el gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión, para obtener una suspensión. Se cultivó una centésima parte de la suspensión a 37 °C durante 18 horas, utilizando un medio de agar de cultivo de bacterias LB, y el número de colonias confirmó el número de bacterias vivas.

10 Como control, se usó una solución salina fisiológica, en lugar de la solución de tensioactivo (Control 1).

## 2. Resultado

La tabla 8 muestra el número de colonias en una muestra después del cultivo.

Tabla 8

		Número de colonias	
		Reposo permitido durante 30 minutos	Reposo permitido durante 3 horas
Control 1	Solución salina fisiológica	>5000	>5000
Experimento 1	Laurato de sacarosa	4000	3200
Experimento 2	Saponina	2200	1864
Experimento 3	BPSH	712	540
Experimento 4	NOIGEN XL60	196	112
Experimento 5	TritonX-705	2016	1224
Experimento 6	CHAPS	84	61

15 Cuando se emplearon los tensioactivos no iónicos usados en los experimentos 1 a 5, en particular, cuando se usó laurato de sacarosa, las bacterias se pudieron recoger mientras están vivas.

### Ejemplo 9

20 Medición de la *Escherichia coli* recolectada usando una solución que contiene tensioactivo y espectrometría de masas

#### 1. Método

25 La *Escherichia coli* precipitada en un agente de separación en un tubo de recolección de sangre se recogió usando una solución que contenía tensioactivo, y se dejó reaccionar con un polímero catiónico. Después de eso, el producto de reacción se lavó con acetonitrilo al 70 %. De este modo se preparó una muestra capaz de suprimir el efecto de un componente sanguíneo y de ser medida utilizando la espectrometría de masas.

Las muestras y los reactivos son los siguientes.

#### 1) Muestra

Se produjo *Escherichia coli* utilizando un kit de expresión de la GFP, fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.

30 Se añadieron sangre entera y la *Escherichia coli* producida a un frasco de cultivo, para el cultivo bacteriano (BD) en una cantidad de  $2 \times 10^8$  células/ml para usar como muestra.

#### 2) Reactivo

I: solución de recolección: tensioactivo al 0,1 %.

II: solución de reacción 1: glicina 1 M, pH 11,0.

III: solución de reacción 2: cloruro de magnesio 3 M.

35 IV: solución de lavado: acetonitrilo al 70 %.

V: solución de extracción: ácido fórmico al 70 %.

VI: solución de separación: acetonitrilo al 100 %.

3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

5 4) Electroforesis

Se usó gel E-R155e-PAGEL al 15 % (ATTO).

Se utilizó el reactivo de tinción II de plata 2D (Cosmo Bio) para la tinción en gel.

5) espectrometría de masas

10 La medición se realizó de acuerdo con un manual de instrucciones, utilizando un Auto FlexII flex Control 2.0 (Bruker).

El análisis de flexión se utilizó para el análisis espectral de masas.

La eliminación del componente sanguíneo se confirmó de la siguiente manera.

15 Se recogió sangre. A un frasco de cultivo, se incorporaron 10 ml de la sangre recogida y de allí se transfirieron 3 ml a un tubo de recolección de sangre. El tubo de recolección de sangre se centrifugó a 3000 rpm durante cinco minutos, para separar el componente de células sanguíneas de la célula bacteriana. Al tubo de recolección de sangre, se añadieron 500 µl de una solución de recolección, y la *Escherichia coli* adsorbida por la superficie de un agente de separación en el tubo de recolección de sangre se recogió en un tubo de 1,5 ml. Aquí, en los experimentos 7 a 12, se usaron laurato de sacarosa, NOIGEN XL60, saponina, BPSH, TritonX-705 y CHAPS como tensioactivos contenidos en la solución de recolección.

20 Como control 2, se usó agua destilada en lugar del tensioactivo incorporado en la solución de recolección para su examen. En el tubo que contenía la solución de recolección, se mezclaron 100 µl de un polímero de injerto catiónico al 10 %, 100 µl de la solución de reacción 1 y 100 µl de la solución de reacción 2, y se dejó que reaccionaran durante un minuto. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se retiró. El  
25 gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de lavado y se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se recogió en un tubo de 1,5 ml para usarlo como muestra 1. El gránulo de precipitación se dispersó completamente con 50 µl de una solución de extracción. Posteriormente, se añadieron 150 µl de una  
30 solución de precipitación por agregación, y la mezcla resultante se centrifugó durante 30 segundos mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml para usar como muestra 2.

El espectro de masas del mismo se midió usando un Auto FlexII.

35 Para comprobar el efecto de los contaminantes, se realizó la confirmación por electroforesis. Como muestra utilizada para la medición, el control 2 y las muestras 1 y 2 obtenidas en los experimentos 7 a 12 se centrifugaron a 15.000 rpm durante 30 minutos. Los sobrenadantes se recogieron y se liofilizaron durante la noche para la concentración. Las muestras secas se disolvieron en 50 µl de tampón de muestra SDS para usar como muestra para electroforesis. La electroforesis se realizó utilizando gel E-R155e-PAGEL al 15 %.

## 2. Resultado

La tabla 9 muestra los resultados de la electroforesis.

40 En la muestra 1, se confirmaron bandas principales alrededor de los pesos moleculares de 10.000 y 30.000. Este resultado indica que un componente sanguíneo adsorbido por un polímero catiónico se puede retirar con una solución de lavado. La muestra 2 tuvo un número mayor de bandas de 30.000 o menos que el control 2. Este resultado indica que se detectó una banda de proteína derivada de una célula bacteriana al eliminar el componente sanguíneo con la solución de lavado.

45 La tabla 10 muestra el espectro de masas obtenido usando un Auto FlexII.

Para determinar si la ionización en la espectrometría de masas se inhibe por un tensioactivo utilizado, el número de picos de masa se contó con una función de Find Mass List de un *software* para el análisis flexible de procesamiento de datos del espectro de masas obtenido. La tabla 9 muestra los resultados del mismo. La tabla 10 muestra las condiciones de conteo.

50 Con el fin de confirmar el efecto de evitar la influencia de un componente sanguíneo, se determinó la relación de una

intensidad máxima de un pico de masa derivado del componente sanguíneo con respecto a un pico de masa derivado de una célula bacteriana. Como el pico de masa derivado de la célula bacteriana, se seleccionaron 6250 m/z y 9740 m/z de los picos de masa detectados cuando se usó una colonia como muestra. Como pico de masa derivado del componente sanguíneo, se seleccionaron 15130 m/z, que era el pico de masa de la hemoglobina. La tabla 11 muestra estos resultados.

5

Tabla 9

		Número contado
Control 2	Solución salina fisiológica	58
Experimento 7	Laurato de sacarosa	65
Experimento 8	NOIGEN XL60	64
Experimento 9	Saponina	31
Experimento 10	BPSH	46
Experimento 11	TritonX-705	21
Experimento 12	CHAPS	53

Tabla 10

Algoritmo de detección de picos	Snap
Umbral de ruido de la señal	3
Umbral de intensidad relativa	0
Umbral de intensidad mínima	0
Número máximo de picos	100
Ancho de picos	5 m/z

10

Tabla 11

		9738/15130(m/z)	6250/15130(m/z)
Control 2	Solución salina fisiológica	0,75	1,79
Experimento 7	Laurato de sacarosa	1,28	4,88
Experimento 8	NOIGEN XL60	1,44	1,53
Experimento 9	Saponina	0,05	0,81
Experimento 10	BPSH	0,42	0,59
Experimento 11	TritonX-705	0,29	0,17
Experimento 12	CHAPS	0,72	1,19

La tabla 9 indica que, en los experimentos 7 y 8, el número de picos de masa contado es mayor que en el control 2 y, por lo tanto, se puede promover la ionización. En consecuencia, la tabla 9 indica que, en los experimentos 9 a 11, el número de picos de masa contado es menor que en el control 2 y, por ende, se puede inhibir la ionización.

15 La tabla 11 indica que, en los experimentos 7 y 8, la relación entre un pico de masa derivado de una célula bacteriana y un pico de masa derivado de la sangre es de 1,0 o más, y el pico derivado de una célula bacteriana se detectó a una intensidad mayor que el pico derivado de la sangre. Por otro lado, la tabla 11 indica que, en los experimentos 9 a 12, la relación entre un pico de masa derivado de una célula bacteriana y un pico de masa derivado de la sangre es de 1,0 o menos, que el pico derivado de la sangre se detectó a una intensidad mayor que el pico derivado de una célula bacteriana y que el efecto de evitar la influencia de un componente sanguíneo fue bajo.

20

A partir de estos resultados, los métodos de los experimentos 7 y 8 pueden suprimir el efecto de un componente sanguíneo y posibilitan la medición utilizando la espectrometría de masas.

Ejemplo 10A

Separación de partículas de virus y confirmación de recolección (prueba adicional del ejemplo de referencia 1)

1. Método

1) Muestra

- 5 Usando el fago T7 de la *Escherichia coli* (código: 20007) adquirido de NBRC (Instituto Nacional de Tecnología y Centro de Evaluación de Biotecnología), se preparó un bacteriófago de acuerdo con un protocolo específico de NBRC y un procedimiento experimental general, por ejemplo, "serie biotecnológica invencible-cuaderno de laboratorio de ingeniería genética (primer volumen) 2. Sección de bacteriófagos (Yodosha)".

10 Una célula bacteriana seca se suspendió en 200 µl de solución de agua condensada (polipéptido al 10 %, extracto de levadura al 2 %, MgSO<sub>4</sub> al 1 %) y luego se tendió en un medio de agar al 0,6 % que incluía aproximadamente 10<sup>5</sup> células de *Escherichia coli* (polipéptido del 10 %), extracto de levadura al 5 %, NaCl al 2,5 %, agar al 1 %). Esta placa de medio se cultivó a 37 °C durante la noche. El agar de una porción en la que no se habían formado colonias se raspó (aproximadamente varios cm<sup>2</sup>) y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Allí se colocó 1 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y el tubo se agitó a 20 °C, durante 90 minutos. Posteriormente, la solución resultante se centrifugó a 3000 rpm  
15 durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante, para usarlo como muestra de bacteriófagos (refrigerada).

2) Reactivo

I: solución de reacción 1: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0.

II: solución de reacción 2: solución de cloruro de magnesio 3 M.

III: solución de dispersión: glicina 1 M-HCl, pH 5,0

20 3) Polímero de injerto catiónico

Se preparó un polímero de injerto catiónico de una manera similar al ejemplo 1.

La separación de un bacteriófago y la confirmación del título del mismo se realizaron de la siguiente manera.

25 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 100 µl de un polímero de injerto catiónico al 20 %, 100 µl de la solución de reacción 1 y 100 µl de la solución de reacción 2. Posteriormente, la mezcla resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se retiró, y el gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 100 µl de una solución de dispersión, para obtener una suspensión. La suspensión se mezcló con un medio de agar, que contenía aproximadamente 10<sup>5</sup> células de *Escherichia coli* y se cultivó a 37 °C, durante 18 horas, para confirmar la bacteriólisis de *Escherichia coli* (figura 11).

30 Una muestra de bacteriófago antes de reaccionar con un polímero de injerto catiónico se infectó con *Escherichia coli* como control positivo.

2. Resultado

Se halló que el bacteriófago puede separarse con el polímero de injerto.

Ejemplo 10B

35 Confirmación de la supervivencia (viabilidad) de la *Escherichia coli* separada

1. Método

1) Muestra

40 La *Escherichia coli* producida utilizando el kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. se añadió a un suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria, de una manera similar al ejemplo 1, y la mezcla resultante se usó como muestra. *Escherichia coli*: alrededor de 10<sup>8</sup> células.

2) Reactivo

I: solución de reacción 1: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0

II: solución de reacción 2: solución de cloruro de magnesio 3 M

III: solución de dispersión: glicina-HCl 1 M, pH 5,0.

45

## 3) Polímero de injerto catiónico

Se usaron el polímero de injerto de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialil-dimetilamonio (PAAEpo-g-DADMAC) (5) anterior y el polímero de injerto de polialilamina de glicidil butirato modificado y cloruro de dialil-dimetilamonio (PAAGB-g-DADMAC) (8) anterior.

5 Específicamente, se añadió agua a una polialilamina al 20 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 13 % en masa, y se añadió por goteo epoxi octano (0,1 equivalentes con respecto a la amina), mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 40 °C durante 24 horas y luego se concentró, para obtener polialilamina modificada con epoxi octano como una solución acuosa. Se añadió agua a una polialilamina en masa modificada con epoxi octano al 30 %, preparada de modo tal que la concentración llegara a ser del 19 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a la amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Luego de ello, se añadieron además 14,42 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialildimetilamonio como una solución acuosa.

De un modo alternativo, se añadió agua a una polialilamina al 20 % en masa, de modo tal que la concentración llegara a ser del 13 % en masa, y se añadió por goteo butirato de glicidilo (0,1 equivalentes con respecto a la amina) mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 40 °C, durante 24 horas y luego se concentró para obtener polialilamina modificada con butirato de glicidilo como una solución acuosa. Se añadió agua a una polialilamina modificada con butirato de glicidilo al 30 % en masa, preparada de modo tal que la concentración llegara a ser del 19 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. Después de ello, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a la amina) y 14,42 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporó allí por separado, y la polimerización se realizó durante 24 horas. Con posterioridad, se añadieron adicionalmente 14,42 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), para obtener un polímero de injerto de polialilamina modificada con butirato de glicidilo y cloruro de dialildimetilamonio como una solución acuosa.

El polímero de injerto anterior y unas perlas de látex producidos por un método conocido se mezclaron de manera que el polímero de injerto tuviera una concentración final del 8 % y que las perlas de látex —por ejemplo, látex de poliestireno LE (diámetro de partícula promedio: 120 nm, fabricado por Nittobo Medical Co., Ltd.)— tuvieran una concentración final del 5 %, para obtener una solución de polímero de injerto.

Además, el polímero de injerto anterior de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno (PAA-g-PSt) utilizado en el ejemplo 1 se usó como control positivo.

35 La separación de la *Escherichia coli* y la confirmación de supervivencia (viabilidad) de la misma se realizaron de la siguiente manera.

Se mezclaron 500 µl de una muestra, 100 µl del polímero de injerto anterior, 100 µl de la solución de reacción 1 y 200µµl de la solución de reacción 2. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifugación y se centrifugó nuevamente a 15.000 rpm, durante cinco minutos. El precipitado resultante se dispersó en 500 µl de una solución de dispersión.

El gránulo de precipitación obtenido mediante la eliminación del sobrenadante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión para obtener una suspensión.

45 100 µl de la suspensión derivada del sobrenadante y 100 µl de la suspensión derivada del gránulo de precipitación se añadieron a 5 ml de un medio de solución LB, y se cultivaron a 37 °C, durante 18 horas. Para la confirmación de la supervivencia de la *Escherichia coli*, se midió la absorbancia de cada una de las muestras de solución de cultivo antes y después del cultivo, utilizando un espectrofotómetro, y se usó la cantidad de cambio de las mismas como la cantidad de *Escherichia coli*.

50 50 µl de la suspensión derivada del sobrenadante y 50 µl de la suspensión derivada del gránulo de precipitación se aplicaron sobre un medio de agar de cultivo de bacterias LB, y se cultivaron a 37 °C durante 18 horas. La viabilidad de la *Escherichia coli* se confirmó mediante la formación de una colonia (figura 12).

Como control negativo, se examinó un caso que contenía látex de poliestireno LE, pero que no contenía el polímero de injerto anterior.

## 2. Resultado

55 Como se muestra en la siguiente tabla 12, se ha encontrado que un polímero de injerto que no forma una partícula

puede separar y concentrar una sustancia diana.

Tabla 12

Clase de polímero	Gránulo			Sup.			Gránulo/sup.	Recuperación (%)
	Antes del cultivo	Después del cultivo	$\Delta$	Antes del cultivo	Después del cultivo	$\Delta$	$\Delta$	
PAAGB-g-DADMAC + látex	0,48	1,12	0,64	0,29	0,32	0,03	19,5	34,8
PAAEpo-g-DADMAC + látex	0,47	1,60	1,13	0,10	0,09	-0,01	94,1	61,2
Solo látex (control negativo)	0,04	0,07	0,03	0,04	0,09	0,05	0,7	1,8
PAA-g-PSt (control positivo)	0,36	1,45	1,09	0,09	0,14	0,05	21,8	59,0

## Ejemplo 11

5 Confirmación de la supervivencia (viabilidad) de la *Escherichia coli* separada

## 1. Método

## 1) Muestra

La *Escherichia coli* producida utilizando el kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. se añadió a un suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria, de una manera similar al ejemplo 1, y la mezcla resultante se usó como muestra. *Escherichia coli*: alrededor de  $10^8$  células.

## 2) Reactivo

I: solución de reacción 1: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0.

II: solución de reacción 2: solución de cloruro de magnesio 3 M.

III: solución de dispersión: glicina-HCl 1 M, pH 5,0.

## 15 3) Polímero de injerto catiónico

Se utilizó el polímero de injerto anterior (5) de polialilamina modificada con epoxi octano y cloruro de dialildimetilamonio (PAAEpo-g-DADMAC).

La separación de la *Escherichia coli* y la confirmación de la supervivencia (viabilidad) de la misma se realizaron de la siguiente manera.

20 Se mezclaron 500  $\mu$ l de una muestra, 100  $\mu$ l del polímero de injerto anterior, 100  $\mu$ l de la solución de reacción 1 y 200  $\mu$ l de la solución de reacción 2. La muestra y el polímero de injerto anterior se mezclaron. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ l de perlas de látex producidas por un método conocido, por ejemplo, látex de poliestireno LE (diámetro de partícula promedio: 120 nm, fabricado por Nittobo Medical Co., Ltd.) y se mezclaron bien. Después, la mezcla resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para  
25 obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifugación y se centrifugó otra vez a 15.000 rpm durante cinco minutos. El precipitado resultante se dispersó en 500  $\mu$ l de una solución de dispersión.

El gránulo de precipitación obtenido mediante el retiro del sobrenadante se dispersó completamente con 500  $\mu$ l de una solución de dispersión, para obtener una suspensión.

30 50  $\mu$ l de la suspensión derivada del sobrenadante y 50  $\mu$ l de la suspensión derivada del gránulo de precipitación se aplicaron sobre un medio de agar de cultivo de bacterias LB, y se cultivaron a 37 °C durante 18 horas. La viabilidad de la *Escherichia coli* se confirmó mediante la formación de una colonia.

## 2. Resultado

35 En caso de que el polímero de injerto se mezclara con las perlas de látex de antemano, la célula bacteriana se capturaba de una manera similar al caso en el que las perlas de látex se añadieran después de la reacción con una célula bacteriana (figura 13).

Ejemplo 12

Confirmación de supervivencia (viabilidad) de la *Escherichia coli* separada

1. Método

1) Muestra

- 5 La *Escherichia coli* producida utilizando el kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. se añadió a un suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria, de una manera similar al ejemplo 1, y la mezcla resultante se usó como muestra. *Escherichia coli*: alrededor de  $10^8$  células.

2) Reactivo

I: solución de reacción 1: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0.

- 10 II: solución de reacción 2: solución de cloruro de magnesio 3 M.

III: solución de dispersión: glicina-HCl 1 M, pH 5,0.

3) Polímero de injerto catiónico

Se utilizó el polímero de injerto (11) anterior de polidialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialil-dimetilamonio.

- 15 Específicamente, se añadió agua a la dialilamina, de modo tal que la concentración llegara a ser del 79 % en masa, y se añadió por goteo glicidol (1 equivalente con respecto a la amina) mientras la solución se enfriaba con agua helada y se agitaba. Después de la adición por goteo, se permitió que la solución reaccionara a 45 °C durante 24 horas y luego se concentró para obtener dialilamina modificada con glicidol como una solución acuosa.

- 20 Al 78 % en masa de dialilamina modificada con glicidol, se añadió un 35 % en masa de ácido clorhídrico (1 equivalente con respecto a la amina). Después de eso, se añadió agua al mismo, de modo tal que la concentración llegara a ser del 50 % en masa. La solución resultante se calentó a 60 °C, se le añadió diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-metil propionamidina) (6 % en mol con respecto al monómero), y la polimerización se llevó a cabo durante 24 horas. La solución resultante se purificó por electrodiálisis para obtener polidialilamina modificada con glicidol como una solución acuosa. Se añadió agua a la polidialilamina modificada con glicidol al 43 % en masa, preparada de modo tal que la concentración llegara a ser del 30 % en masa, y la solución resultante se agitó a 20 °C. Posteriormente, cada uno de los siguientes, cloruro de dialil-dimetilamonio al 65 % en masa (3 equivalentes con respecto a amina) y 36,04 g de solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero) se incorporaron allí, y la polimerización se realizó para 24 horas. Después, se añadieron además 36,04 g de una solución acuosa de APS al 28,5 % en masa (10 % en mol con respecto al monómero), y la polimerización se realizó a 50 °C durante 24 horas, para obtener un polímero de injerto de polidialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialil-dimetilamonio como solución acuosa.

- 35 El polímero de injerto anterior y las perlas de látex producidas por un método conocido se mezclaron de manera que el polímero de injerto tuviese una concentración final del 8 % y que las perlas de látex, por ejemplo, látex de poliestireno LE (diámetro de partícula promedio: 120 nm, fabricado por Nittobo Medical Co., Ltd.) tuvieran una concentración final del 5 %, para obtener una solución de polímero de injerto.

Además, el polímero de injerto (3) anterior de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno (PAA-g-PSt) utilizado en el ejemplo 1 se usó como control positivo.

La separación de la *Escherichia coli* y la confirmación de supervivencia (viabilidad) de la misma se realizaron de la siguiente manera.

- 40 Se mezclaron 500 µl de una muestra, 100 µl del polímero de injerto anterior, 100 µl de la solución de reacción 1 y 200 µl de la solución de reacción 2. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifugación y se centrifugó de nuevo a 15.000 rpm durante cinco minutos. El precipitado resultante se dispersó en 500 µl de una solución de dispersión.

- 45 El gránulo de precipitación obtenido mediante la eliminación del sobrenadante se dispersó completamente con 500 µl de una solución de dispersión para obtener una suspensión.

- 100 µl de la suspensión derivada del sobrenadante y 100 µl de la suspensión derivada del gránulo de precipitación se añadieron a 5 ml de un medio LB, y se cultivaron a 37 °C durante 18 horas. Para la confirmación de la supervivencia de *Escherichia coli*, se midió la absorbancia de cada una de las muestras de cultivo antes y después del cultivo, usando un espectrofotómetro, y se usó la cantidad de cambio de las mismas como la cantidad de *Escherichia coli*.

50  $\mu$ l de la solución de dispersión derivada del sobrenadante y 50  $\mu$ l de la solución de dispersión derivada del gránulo de precipitación se aplicaron sobre un medio de agar de cultivo de bacterias LB, y se cultivaron a 37 °C durante 18 horas. La viabilidad de *Escherichia coli* se confirmó mediante la formación de una colonia (figura 14).

5 Como control, se examinó el caso que contenía látex de poliestireno LE, pero que no contenía el polímero de injerto anterior.

## 2. Resultado

Tabla 13

Clase de polímero	Gránulo			Sup.			Gránulo/sup.	Recuperación (%)
	Antes del cultivo	Después del cultivo	$\Delta$	Antes del cultivo	Después del cultivo	$\Delta$	$\Delta$	
DAAGly-g-DADMAC+látex	0,69	1,55	0,86	0,69	0,75	0,06	13,8	46,4
Solo látex (control negativo)	0,04	0,07	0,03	0,04	0,09	0,05	0,7	1,8
PAA-g-PSt (control positivo)	0,36	1,45	1,09	0,09	0,14	0,05	21,8	59,0

### Ejemplo 13

10 Medición mediante espectrometría de masas.

#### 1. Método

##### 1) Muestra

15 La *Escherichia coli* producida utilizando el kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. se añadió a un suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria, de una manera similar al ejemplo 1, y la mezcla resultante se usó como muestra. *Escherichia coli*: alrededor de  $10^8$  células.

##### 2) Reactivo

I: solución de reacción 1: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0.

II: solución de reacción 2: solución de cloruro de magnesio 3 M.

III: solución de dispersión: ácido fórmico al 70 %.

20 IV: solución de agregación: acetonitrilo al 100 %.

##### 3) Polímero de injerto catiónico

Se usó el polímero de injerto (11) anterior de polidialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialil-dimetilamonio utilizado en el ejemplo 12.

25 El polímero de injerto anterior y las perlas de látex producidas por un método conocido se mezclaron de manera que el polímero de injerto tuviera una concentración final del 8 % y que las perlas de látex, por ejemplo, látex de poliestireno LE (diámetro de partícula promedio: 120 nm, fabricado por Nittobo Medical Co., Ltd.) tuvieran una concentración final del 5 %, para obtener una solución de polímero de injerto.

Además, el polímero de injerto (3) anterior de polialilamina modificada con óxido de propileno y estireno (PAA-g-PSt) utilizado en el ejemplo 1 se usó como control positivo.

30 La separación de la *Escherichia coli* y la medición mediante espectrometría de masas se realizaron de la siguiente manera.

Se mezclaron 500  $\mu$ l de una muestra, 50  $\mu$ l del polímero de injerto anterior, 100  $\mu$ l de la solución de reacción 1 y 200  $\mu$ l de la solución de reacción 2. Posteriormente, el producto resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación.

35 El sobrenadante se retiró, y el gránulo de precipitación resultante se dispersó completamente con 30  $\mu$ l de una solución de dispersión. Después, se mezclaron 100  $\mu$ l de una solución de agregación con la misma, y luego la mezcla resultante se centrifugó durante 60 segundos, mediante una pequeña máquina centrífuga de mesa. El

sobrenadante resultante se usó como una muestra para la medición utilizando la espectrometría de masas. La espectrometría de masas se manejó de una manera similar al ejemplo 3.

Como control, se examinó un caso que contenía látex de poliestireno LE, pero que no contenía el polímero de injerto anterior.

5 2. Resultado

Tabla 14

Clase de polímero	Puntuación
DAAGly-g-DADMAC+látex	2,13
Solo látex (control negativo)	<0
PAA-g-PSt (control positivo)	2,10

10 A partir de la medición mediante espectrometría de masas, se ha revelado que la *Escherichia coli* puede capturarse/recolectarse sin la adición de la solución de reacción 2 (ion magnesio), cuando se utiliza una solución mixta de un polímero de injerto de polidialilamina modificada con glicidol y dialil-dimetilamonio cloruro y perlas de látex.

Tabla 15

Solución de reacción	Puntuación
No se utiliza la solución de reacción 2 (es decir, no hay ion magnesio)	1,86
Se utiliza la solución de reacción 2 (es decir, hay ion magnesio)	2,13

Ejemplo 14

15 Confirmación de la supervivencia (viabilidad) de la *Escherichia coli* separada

1. Método

1) Muestra

20 La *Escherichia coli* producida utilizando el kit de expresión de la GFP fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc. se añadió a un suero de sangre humana normal, en una cantidad necesaria, de una manera similar al ejemplo 1, y la mezcla resultante se usó como muestra. *Escherichia coli*: alrededor de  $10^8$  células.

2) Reactivo

I: solución de reacción 1: glicina 1 M-NaOH, pH 11,0.

II: solución de reacción 2: solución de cloruro de magnesio 3 M.

III: solución de dispersión: glicina-HCl 1 M, pH 5,0.

25 3) Polímero de injerto catiónico

Se usó el polímero de injerto (11) anterior de polidialilamina modificada con glicidol y cloruro de dialil-dimetilamonio utilizado en el ejemplo 12.

La separación de la *Escherichia coli* y la confirmación de supervivencia (viabilidad) de la misma se realizaron de la siguiente manera.

30 Se mezclaron 500  $\mu$ l de una muestra, 100  $\mu$ l del polímero de injerto anterior, 100  $\mu$ l de la solución de reacción 1 y 200  $\mu$ l de la solución de reacción 2. La muestra y el polímero de injerto anterior se mezclaron. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ l de perlas de látex, producidas por un método conocido, por ejemplo, látex de poliestireno LE (diámetro de partícula promedio: 120 nm, fabricado por Nittobo Medical Co., Ltd.) y se mezclaron bien. Después, la mezcla resultante se centrifugó durante 30 segundos, mediante una máquina centrífuga pequeña de mesa, para obtener un gránulo de precipitación. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifugación y se centrifugó otra vez a 15.000 rpm durante cinco minutos. El precipitado resultante se dispersó en 500  $\mu$ l de una solución de dispersión.

El gránulo de precipitación obtenido mediante la eliminación del sobrenadante se dispersó completamente con 500  $\mu$ l de una solución de dispersión para obtener una suspensión.

50 µl de la suspensión derivada del sobrenadante y 50 µl de la suspensión derivada del gránulo de precipitación se aplicaron sobre un medio de agar de cultivo de bacterias LB, y se cultivaron a 37 °C durante 18 horas. La viabilidad de la *Escherichia coli* se confirmó mediante la formación de una colonia.

## 2. Resultado

- 5 En caso de que el polímero de injerto se mezclara con las perlas de látex de antemano, la célula bacteriana se capturaba de una manera similar al caso en el que las perlas de látex se añadieran después de la reacción con una célula bacteriana (figura 15).

### Aplicabilidad industrial

- 10 El método de la presente invención y el kit para el mismo son capaces de separar y purificar una diana de un modo más eficiente que un método convencional, que utilice un polímero de intercambio iónico, y también pueden detectar la diana incluso cuando la cantidad en que dicha diana está presente en una muestra sea extremadamente baja.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para separar y concentrar una biomolécula diana mediante la utilización de un polímero de injerto catiónico, que comprende lo siguiente:

- 5 (1) la etapa de poner el polímero de injerto catiónico en contacto con una muestra que contiene la biomolécula diana, para que la biomolécula diana se una al polímero de injerto catiónico en condiciones básicas;
- (2) la etapa de separar el complejo unido del polímero de injerto catiónico y la biomolécula diana y
- (3) la etapa de eluir la biomolécula diana del complejo unido,

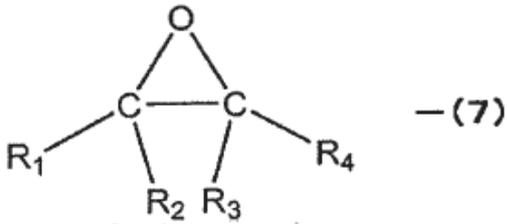
10 en donde el polímero de injerto catiónico es un polímero de injerto de poliamina, obtenido por la polimerización de un derivado de poliamina obtenido por una reacción entre: (a) un compuesto polimérico, que tiene al menos un grupo amino y (b) un compuesto que tiene al menos un grupo epoxi, y (c) un monómero etilénicamente insaturado y

el compuesto que tiene al menos un grupo epoxi (b) es un compuesto representado por la fórmula general (7) y seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

- (1) óxido de etileno, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es un átomo de hidrógeno,
- 15 (2) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo saturado lineal o ramificado, que tiene un grupo hidroxilo en la cadena y que tiene de 1 a 8 átomos de carbono (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- (3) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo monovalente, sustituido o no sustituido (no todos los átomos de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- 20 (4) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo de hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que tiene un enlace éter en la cadena y que tiene de 1 a 8 átomos de carbono (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- (5) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno (no todos los átomos de hidrógeno son  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$ ),
- 25 (6) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo insaturado (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- (7) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un grupo hidrocarburo alicíclico o un grupo hidrocarburo cíclico que tiene un enlace insaturado (no todos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ , y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- 30 (8) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un anillo aromático o un anillo heterocíclico (no todos los de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- (9) un compuesto epoxi polifuncional, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un anillo epoxi (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- 35 (10) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que contiene un alcóxido en la cadena y que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- (11) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un átomo de flúor en la cadena (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- 40 (12) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo, que contiene un grupo carboxilo en la cadena (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno),
- (13) un compuesto epoxi, en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado saturado, lineal o ramificado, que contiene un enlace éster o un enlace amida en la cadena y que tiene de 1 a 12 átomos de carbonos (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son átomos de hidrógeno) y
- 45 (14) un compuesto epoxi en el que cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  de la fórmula es, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que contiene un grupo sulfonato en la cadena (no todos los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son
- 50

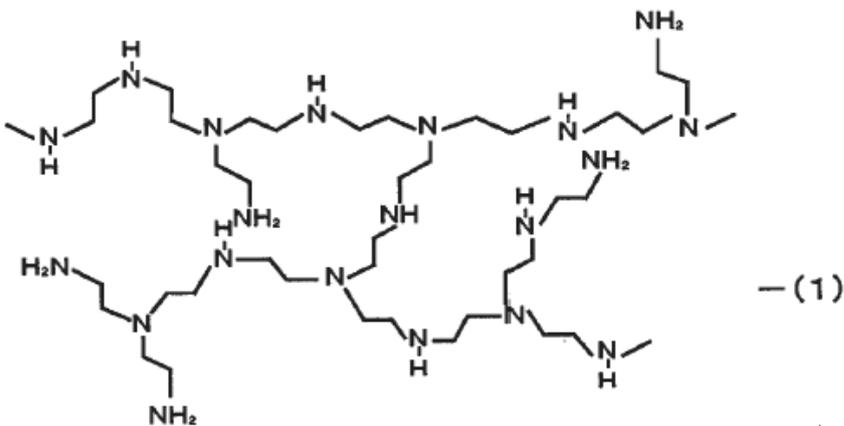
átomos de hidrógeno).

Fórmula 7

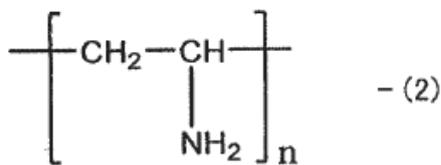


5 2. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino (a) se  
 10 selecciona del grupo que consiste en: un polímero de etilenimina, que tiene una estructura representada por la  
 fórmula general (1); un polímero de vinilamina, que tiene una estructura representada por la fórmula general (2); un  
 polímero de alilamina, que tiene una estructura representada por la fórmula general (3); un polímero de dialilamina,  
 que tiene una estructura representada por la fórmula general (4) y un polímero de amina acrílica, que tiene una  
 estructura representada por la fórmula general (5); (en las siguientes fórmulas generales, n es un número entero  
 variable de 10 a 200.000; m es un número entero variable entre 5 y 3000; 1 es un número entero variable de 5 a  
 5000; o es un número entero variable de 10 a 10.000 y p es un número entero variable de 1 a 100).

Fórmula 1

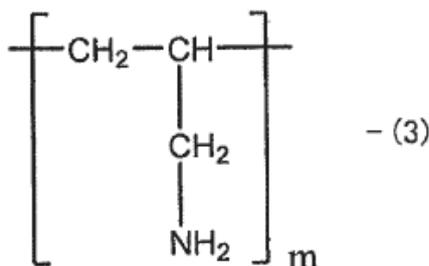


Fórmula 2

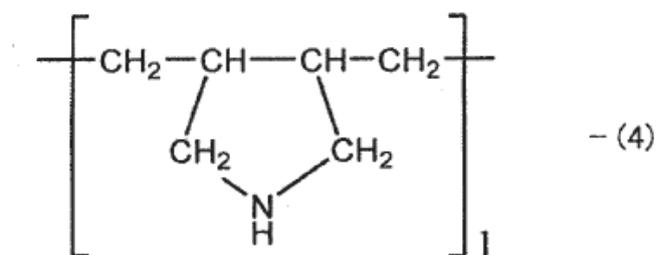


15

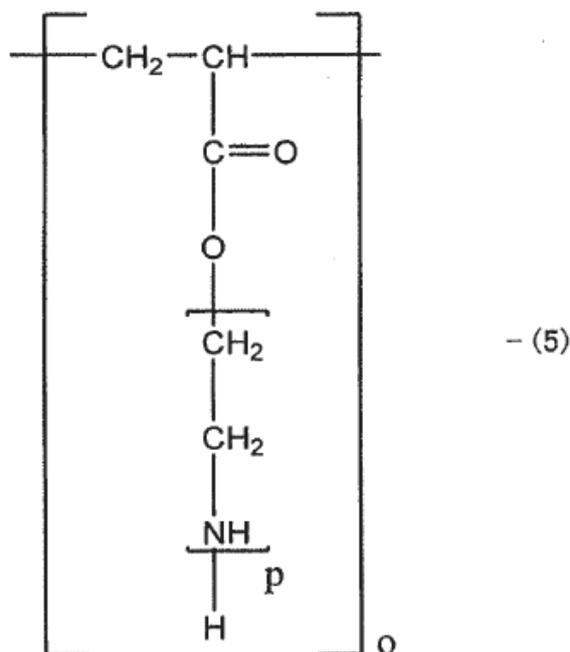
Fórmula 3



Fórmula 4



Fórmula 5



- 5 3. El método según la reivindicación 1, en el que el monómero etilénicamente insaturado (c) se selecciona del grupo que consiste en un monómero de vinilo, un monómero de estireno, un monómero de metacrilato, un monómero de acrilato, un monómero de acrilamida, un monómero de alilo, un monómero de dialilo y un ácido carboxílico insaturado.
- 10 4. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino de (a) es polialilamina, polidialilamina, polietilenimina o polivinilamina;
- el compuesto que tiene al menos un grupo epoxi de (b) es óxido de propileno, epoxi octano, etilenglicol diglicidil-éter, óxido de estireno, butirato de glicidilo o glicidilo y
- el monómero etilénicamente insaturado de (c) es dimetil acrilamida, cloruro de dialil dimetilamonio, estireno o 2-vinilpiridina.
- 15 5. El método según la reivindicación 1, en el que el compuesto polimérico que tiene al menos un grupo amino de (a) es polialilamina;
- el compuesto que tiene al menos un grupo epoxi de (b) es óxido de propileno y
- el monómero etilénicamente insaturado de (c) es estireno.
- 20 6. El método según la reivindicación 1, en el que el diámetro de partícula promedio del polímero de injerto de poliamina es de 250 nm o menos y, con preferencia, de 100 nm a 200 nm.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, añadir un ion metálico divalente o trivalente en la etapa (1).

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende, además, la etapa de lavar el complejo unido en la etapa (2).
9. El método según con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polímero de injerto catiónico se fija a una superficie de fase sólida.
- 5 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la etapa de agregar el polímero de injerto catiónico que no está unido a la biomolécula diana en la etapa (3).
11. Un kit que comprende el polímero de injerto catiónico según se lo define en las reivindicaciones 1-10.
12. El kit según la reivindicación 11, que comprende, además, una sal de ion metálico divalente o trivalente.
- 10 13. El kit según la reivindicación 11, que comprende, además, una solución de reacción que contiene una solución básica y una sal de ion metálico divalente o trivalente.
14. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende, además, una solución de lavado.
15. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende, además, una solución de dispersión que contiene una solución ácida o un agente quelante.
- 15 16. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende, además, una solución de agregación.

FIGURA 1

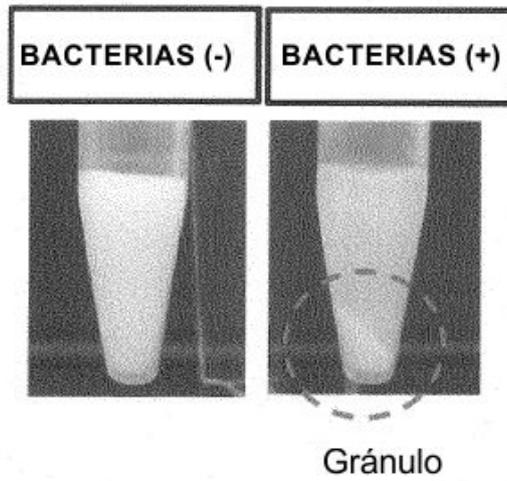


FIGURA 2



FIGURA 3

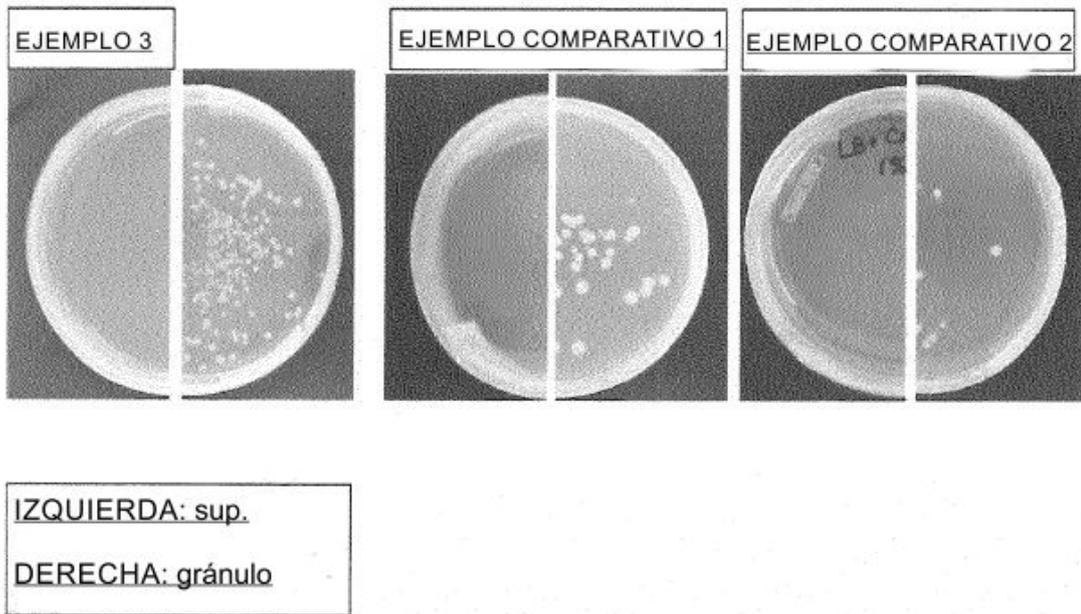


FIGURA 4

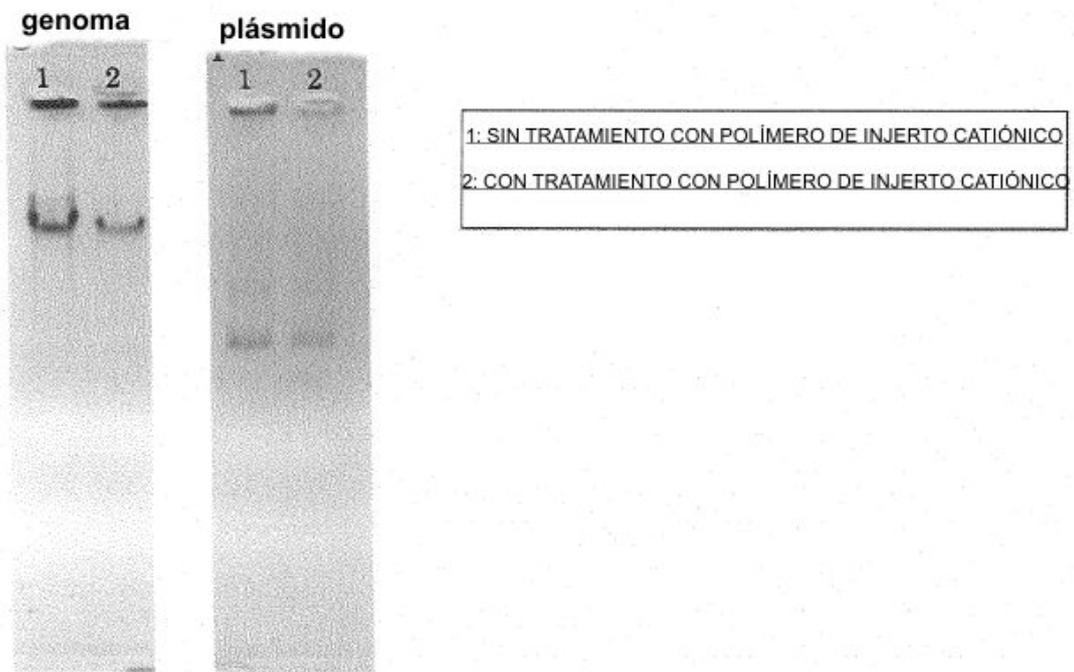
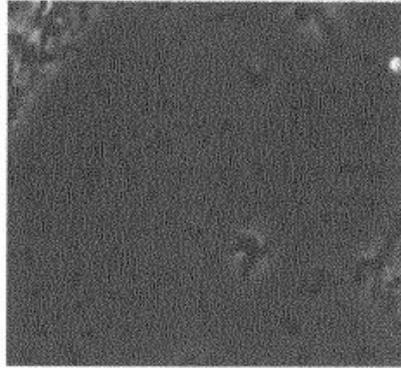
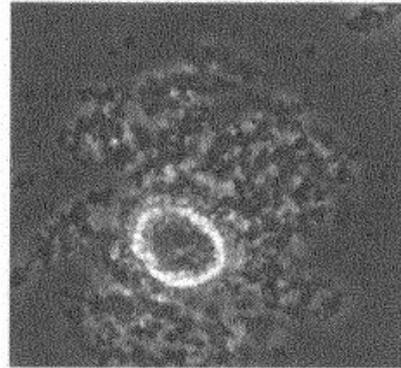


FIGURA 5

(1) ESTADO AGREGADO

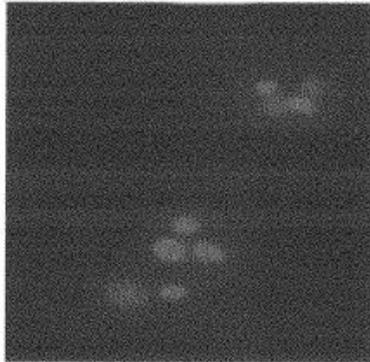


sup.



gránulo  
AZUL (DAPI): CÉLULA (NÚCLEO)  
NEGRO: POLÍMERO DE INJERTO  
CATIÓNICO

(1) ESTADO DISPERSO



gránulo  
AZUL (DAPI): CÉLULA  
(NÚCLEO)

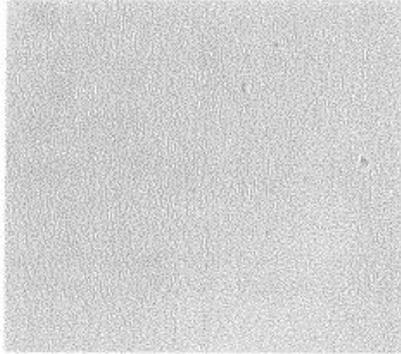
FIGURA 6



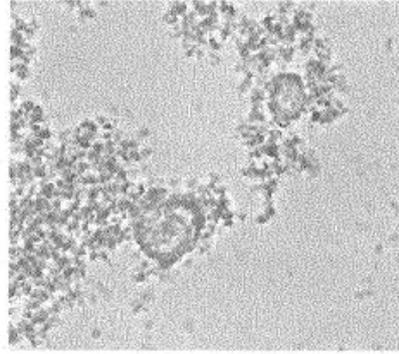
AZUL (DAPI): CÉLULA (NÚCLEO)  
VERDE (Alexa 488): ANTICUERPO (MCAM)

FIGURA 7

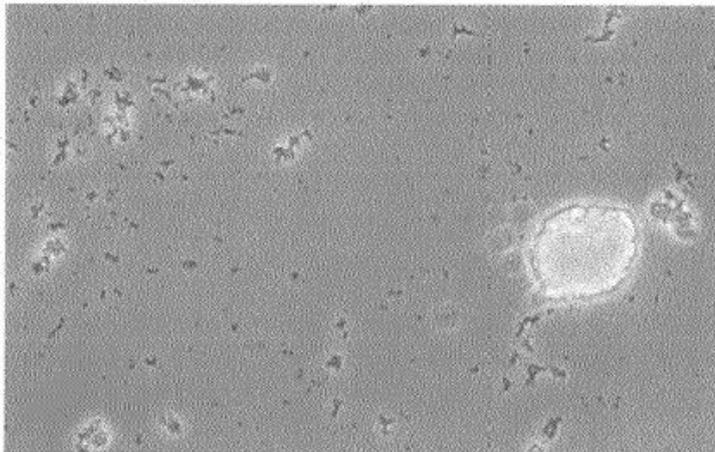
(1) ESTADO AGREGADO



sup.



gránulo  
NEGRO: POLÍMERO DE INJERTO  
CATIÓNICO  
VERDE (DyLight 188) VESÍCULA



gránulo  
VERDE (DyLight 188) VESÍCULA  
NEGRO: POLÍMERO DE INJERTO  
CATIÓNICO

FIGURA 8

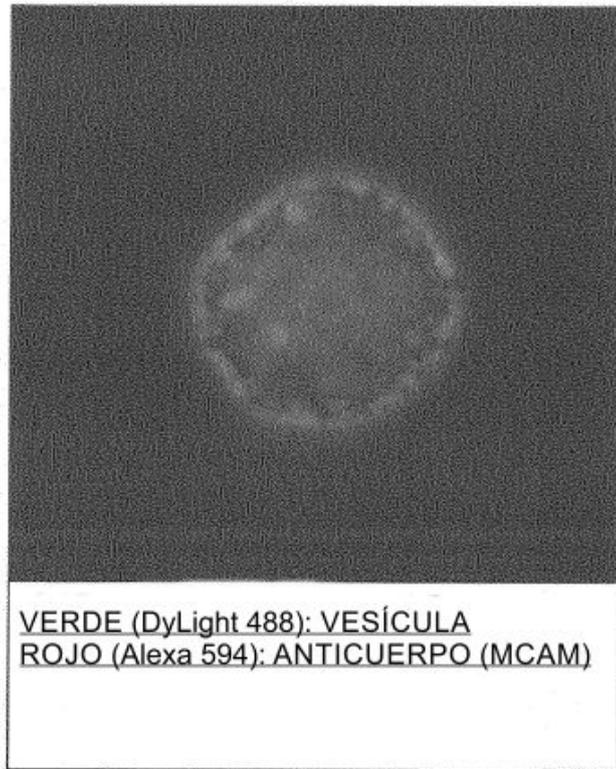


FIGURA 9

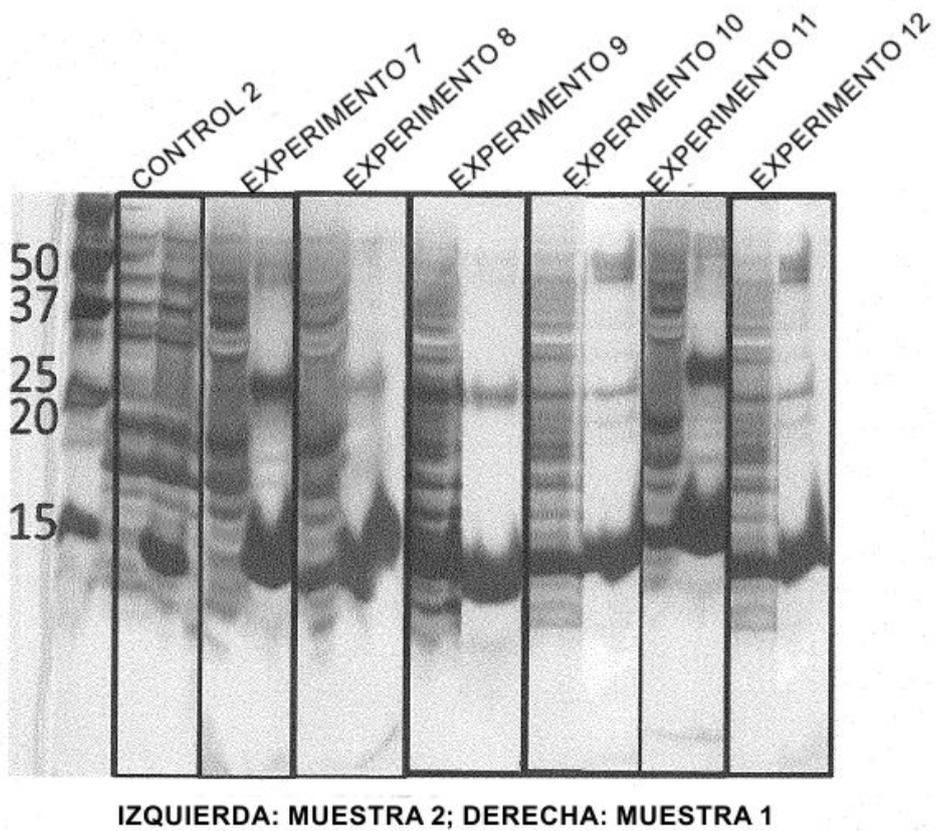


FIGURA 10

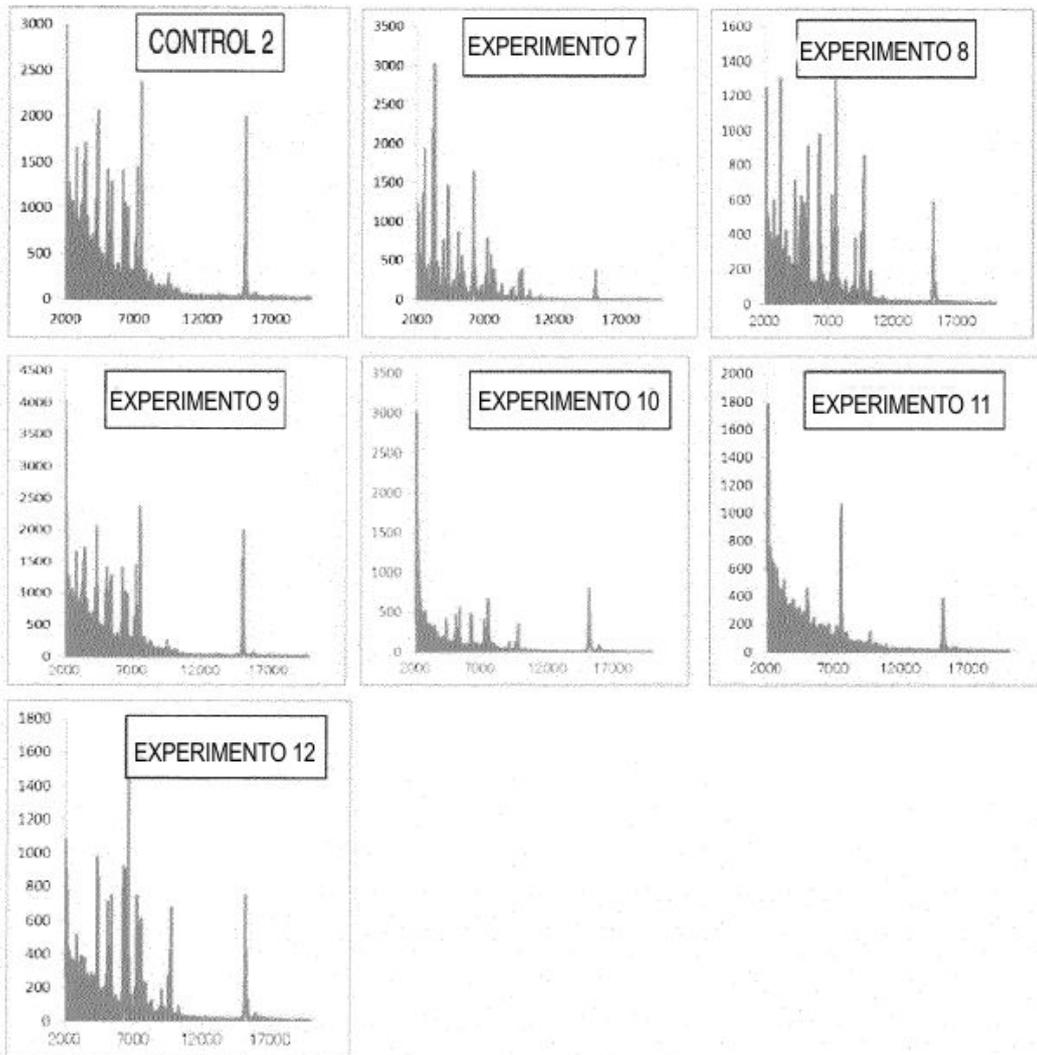
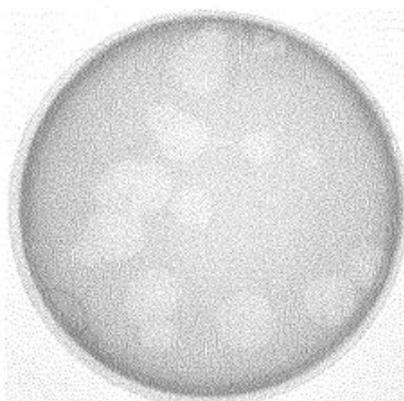
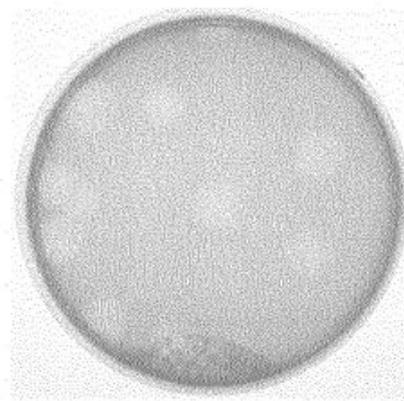


FIGURA 11

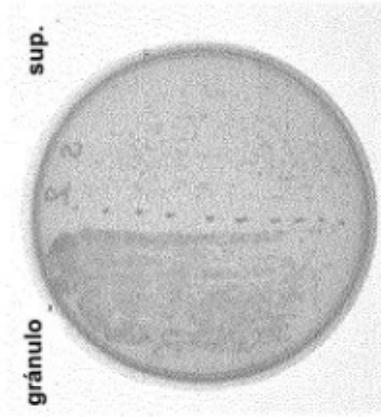


**CONTROL POSITIVO**

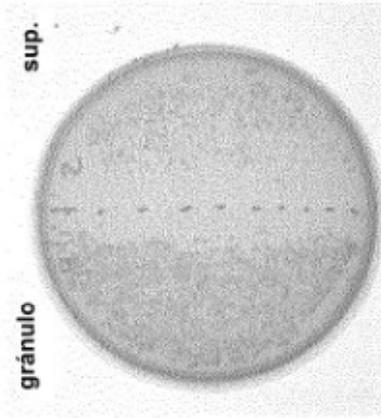


**BACTERIÓFAGO RECOGIDO  
CON POLÍMERO DE INJERTO**

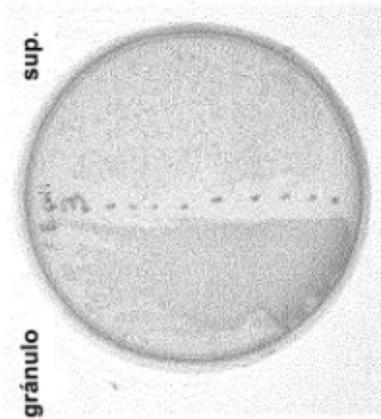
**FIGURA 12**



**(5) PAAEpo**



**(8) PAAGB**



**CONTROL POSITIVO**

FIGURA 13

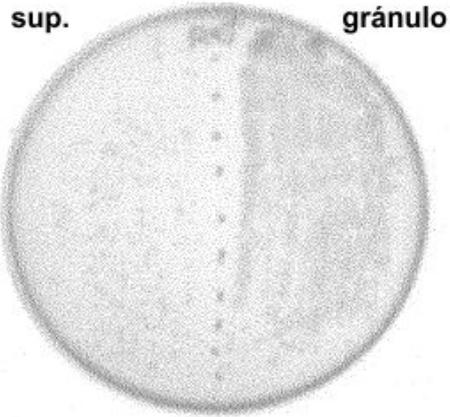


FIGURA 14

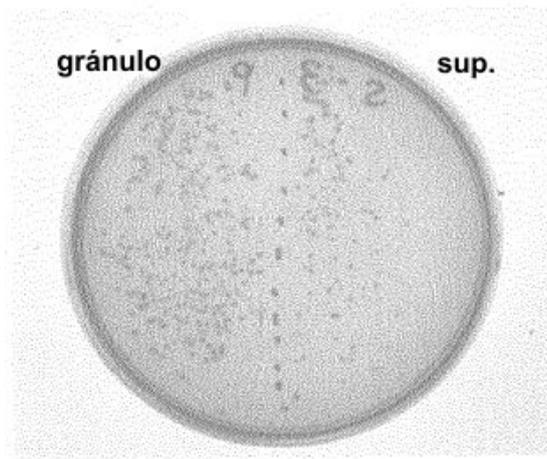


FIGURA 15

