



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0519950-6 B1

(22) Data do Depósito: 16/12/2005

(45) Data de Concessão: 01/03/2016
(RPI 2356)



(54) Título: MEIO CROMATOGRÁFICO, COLUNA PARA CROMATOGRAFIA E PROCESSO PARA SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DE UMA SOLUÇÃO

(51) Int.Cl.: B01J 20/22

(30) Prioridade Unionista: 25/01/2005 US 60/646,780

(73) Titular(es): AVANTOR PERFORMANCE MATERIALS, INC.

(72) Inventor(es): NANDU DEORKAR, ROBERT BUSS C., JOSEPH M. MLADOSICH, PAUL A. BOUIS

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MEIO CROMATOGRÁFICO, COLUNA PARA CROMATOGRAFIA E PROCESSO PARA SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DE UMA SOLUÇÃO"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se à preparação e ao uso de novos meios cromatográficos, de preferência, meios cromatográficos poliméricos de modo misto, para separação e purificação de diversas biomoléculas, tais como peptídeos, proteínas e anticorpos. Mais particularmente, a presente invenção descreve novos meios cromatográficos, de preferência, trocadores
10 de ânions mistos, trocadores de ânions-cátions mistos e trocadores hidrofóbicos. O meio cromatográfico é preparado por modificação de polímeros com polietilenimina e funcionalização dos mesmos. Inesperadamente, foi descoberto que esses meios poliméricos de modo misto oferecem uma capacidade de separação e capacidade de ligação de proteínas aumentadas.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

 A análise de misturas de proteínas por meios cromatográficos de troca de íons está bem-documentada, tal como por Pete Gagnon, "Purification Tools for Monoclonal Antibodies", Validated Biosystems, Inc., (1996). Mais recentemente, o desenvolvimento de fármacos e vacinas baseadas em
20 proteínas aumentou a necessidade de uma purificação em escala maior de misturas de proteínas. É altamente desejável que meios cromatográficos de troca de íons possam ser capazes de ser utilizados nesse setor.

 Um método para preparar esses materiais de meio cromatográfico, particularmente, trocadores de ânions, que contêm funcionalidade de
25 amina primária e secundária, é revestindo a superfície interna de materiais de sílica porosos com polietilenimina (PEI). Por exemplo, revestindo a superfície interna de partículas de sílica com polietilenimina, seguido de imobilização através de reticulação, foi descrito em Alpert and Regnier, J. Chromatogr. 185, 375-392 (1979), e o uso de materiais preparados desse modo para a
30 separação cromatográfica de oligonucleotídeos sintéticos foi descrito em Lawson et al., Anal. Biochem. 133, 85-93 (1983).

 De modo similar, a preparação de partículas de sílica porosa, revestidas com PEI, ou partículas de vidro poroso controlado, obtidas por

ligação covalente de polietileniminopropil-trimetoxissilano, foi descrita no documento U.S. 4.540.486 de JT Baker Chemical Co. A mesma patente descreve a formação de resinas cromatográficas com funcionalidade mista de base fraca/ácido fraco por reação da sílica revestida com PEI com anidridos carboxílicos cíclicos. Foi mostrado que esses materiais, quando usados em uma coluna cromatográfica, podem separar misturas de citocromo C, alfa1-ácido glicoproteína, ovalbumina e beta-lactaglobulina (meio de base fraca) ou ovalbumina, citocromo C, hemoglobina e lisozima (meio misto de base fraca/ácido fraco. A eficácia da sílica porosa derivada de PEI, ou sua versão carboxilada na purificação de imunoglobulina G também foi demonstrada no documento U.S. 4.606.825 de JT Baker Chemical Co.

A forma acilada da sílica revestida com PEI, descrita acima, pode ser convertida adicionalmente em um meio de funcionalidade mista de ácido fraco/ácido forte pela introdução de grupos sulfônicos, tal como descrito no documento U.S. 4.721.573 de JT Baker Chemical Co. Uma coluna carregada com esse meio sulfonado possibilita a separação de uma mistura de citocromo C, hemoglobina, lisozima e ovalbumina, bem como a separação dos componentes de proteína de um meio de cultura de células de híbrido-ma.

Partículas de sílica às quais PEI foi ligado de modo covalente também podem ser convertida em meios cromatográficos hidrofóbicos por reação com cloretos de monoacila de anidridos carboxílicos lineares, onde o grupo acila pode ser uma cadeia de hidrocarboneto linear, um grupo fenila ou um grupo fenila substituído. Um meio cromatográfico baseado em base fraca/fase inversa, preparado dessa maneira, usando componentes separados de cloreto de butirila, citocromo C, mioglobina, lisozima, ovalbumina e alfa-quimpotripsinogênio, tal como descrito no documento U.S. 4.551.245 de JT Baker Chemical Co.

Glóbulos de agarose, que levam grupos de troca de íons no final de um braço de álcool polivinílico, foram descritos no documento WO 98/58732 para Amersham. Porém, diferentemente da presente invenção, os braços separadores de PVA não acrescentam nenhuma capacidade de troca

de íons ao produto, nem proporcionam, em si, nenhuma das funcionalidades em um produto de modo misto.

Uma das principais desvantagens dos meios cromatográficos baseados em sílica é sua falta de estabilidade a um pH alto. Isso é particularmente o caso para aplicações que envolvem a purificação de fármacos, uma vez que o tratamento do equipamento com hidróxido de sódio de 1N é uma prática de esterilização comum.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê um meio cromatográfico que é capaz de minimizar ou evitar essa falta de estabilidade a um pH alto. A invenção também provê meios cromatográficos de modo misto. Foi descoberto que um meio possível para evitar esse problema de instabilidade é usar meios cromatográficos baseados em um suporte polimérico, derivado na superfície do polímero (isto é, não reticulado) com PEI, sendo que esse meio derivado de superfície pode ser funcionalizado adicionalmente por reação de um reagente de funcionalização com grupos terminais amina da polietilenimina na superfície da resina polimérica. De acordo com esta invenção, de preferência, podem ser postos à disposição meios de modo misto, tais como, por exemplo, meios com locais de troca de aminas primárias, secundárias e terciárias mistas, meios com locais de troca tanto de ânions fracos como de cátions fracos, meios com locais de troca de ânions fracos, cátions fracos e cátions fortes, meios com locais de troca de ânions fracos e hidrofóbicos (fase inversa) e meios com ânions fracos e ânions fortes. Além disso, inesperadamente foi descoberto que esses meios cromatográficos baseados em polietileniminas derivadas e derivados poliméricos e funcionalizados do mesmo proporcionam características de separação diferentes e exclusivas. Em um aspecto da presente invenção, são proporcionados meios cromatográficos poliméricos para biosseparações. Esta invenção difere de meios cromatográficos poliméricos correntes pelo método de preparação e características do meio, uma vez que esses meios cromatográficos correntes são simples trocadores de íons. Os meios da presente invenção também diferem de meios baseados em sílica correntes em termos de método de prepara-

ção, composição, uso e atuação. Surpreendentemente, os meios de modo misto poliméricos preparados de acordo com esta invenção têm capacidades de separação e ligação aumentadas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

5 A presente invenção está ilustrada por, mas não limitada, pelos desenhos anexos, nos quais:

 Figura 1 é um gráfico do perfil de extração, tal como registrado por um detector de UV, da separação de proteínas usando meios preparados de acordo com o exemplo 1 e meios de sílica de PEI de acordo com o
10 exemplo de procedimento 34;

 Figura 2 é um gráfico do perfil de extração, tal como registrado por um detector de UV, da separação de proteínas usando meios preparados de acordo com o exemplo 9 e meios de sílica de modo misto de acordo com o exemplo de procedimento 35;

15 Figura 3a e 3b são gráficos do perfil de extração, tal como registrado por um detector de UV, da separação de proteínas usando meios preparados de acordo com o exemplo 19 e meios de sílica de acordo com o exemplo de procedimento 37;

 Figura 4 é um gráfico do perfil de extração, tal como registrado por um detector de UV, da separação de proteínas usando meios preparados de acordo com o exemplo 20, de acordo com o procedimento do exemplo 38;
20

 Figura 5 é um gráfico do perfil de extração, tal como registrado por um detector de UV, da separação de proteínas usando meios preparados de acordo com o exemplo 22, de acordo com o procedimento do exemplo 39;
25

 Figura 6 é um gráfico do perfil de extração, tal como registrado por um detector de UV, da separação de proteínas usando meios preparados de acordo com o exemplo 23, de acordo com o procedimento do exemplo 40;
30

 Figura 7 é um gráfico da estabilidade de ácido de meios preparados de acordo com o Exemplo 7, tal como determinado de acordo com o

procedimento no exemplo 41; e

Figura 8 é um gráfico da estabilidade de base de meios preparados de acordo com o Exemplo 7, tal como determinado de acordo com o procedimento no exemplo 42.

5 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à preparação e ao uso de novos meios cromatográficos poliméricos e, de preferência, meios cromatográficos poliméricos de modo misto. De acordo com a presente invenção, o meio polimérico é preparado usando partículas poliméricas derivadas com polietilenimina e, de preferência, as partículas poliméricas derivadas com polietilenimina, funcionalizadas adicionalmente com reagentes apropriados.

Materiais poliméricos usados para a separação cromatográfica de proteínas têm, de preferência, determinadas propriedades, tais como

1) o tamanho dos poros é suficientemente grande para possibilitar uma difusão rápida de moléculas do tamanho de proteínas para dentro e fora das partículas de resina;

2) interação entre as proteínas e o polímero não funcionalizado devem ser fracas, para evitar "interações não específicas" e possibilitam a recuperação da proteína desejada em altos rendimentos;

3) as partículas de resina devem ser rígidas para evitar compressão e perda de velocidade de corrente sob a pressão encontrada em operações cromatográficas; e

4) a resina deve ser quimicamente estável sob todas as condições encontradas no processo de separação.

As partículas de resina poliméricas a serem derivadas na superfície com polietilenimina podem ser quaisquer partículas de resina poliméricas apropriadas, capazes de ser derivadas com polietilenimina e sendo que esses polímeros derivados com polietilenimina ou derivados adicionalmente funcionalizados dos mesmos são úteis como meio de separação cromatográfica. Exemplos de partículas de resina poliméricas, apropriadas para derivação com polietilenimina de acordo com esta invenção, incluem, mas não estão limitados a celulose, agarose, poliestirenos epoxidados ou halogena-

dos, poli(acrilatos ou polimetacrilatos epoxidados ou halogenados de polidivinilbenzenos epoxidados ou halogenados. Por exemplo, poli(met)acrilatos, resinas altamente reticuladas, baseadas em monômeros (met)acrílicos, que contêm múltiplas ligações duplas polimerizáveis, tal como dimetacrilato de etilenoglicol (U.S. 4.118.347 para Showa Denko, trimetacrilato de pentaeritritol (U.S. 4.256.842 para Toyo Soda), trimetilacrilato de trimetilol propano (U.S. 4.582.860 para Rohm e Haas) ou dimetacrilato de glicerol (U.S. 2.254.634 para Mitsubishi), preparado na presença de um agente formador de poros, mostraram-se capazes de fornecer materiais com as propriedades desejadas. Além disso, a adição de monômeros funcionais à mistura de polimerização dá um produto final com grupos funcionais aos quais podem ser ligadas outras moléculas através da formação de ligações covalentes. Exemplos desses monômeros são metacrilato de glicerol (grupos -OH) (U.S. 2.254.634 para Mitsubishi, 1993), metacrilato de dimetilaminoetil (aminas terciárias) ou metacrilato de glicidila (U.S. 4.118.347 para Showa Denko, U.S. 4.256.842 para Toyo Soda, U.S. 4.582.860 para Rohm e Haas). Exemplos de reagentes de funcionalização apropriados para reação com as partículas de resina poliméricas derivadas na superfície com PEI são, por exemplo, anidridos de ácido, tal como anidridos carboxílicos cíclicos, tais como anidridos glutáricos e succínicos, anidridos carboxílicos insaturados, tal como anidrido maléico, agente de sulfonação, tal como bissulfitos, tal como meta-bissulfito de sódio, cloretos ou anidridos de alquila, tal como cloreto de butirila e anidrido acético ou butírico, e cloretos de alquila que contêm funcionalidade de amônio quaternário, tal como cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio, e misturas desses reagentes de funcionalização.

Em uma modalidade desta invenção, um trocador de ânions com locais mistos de aminas primárias e secundárias e terciárias é preparado reagindo polietilenimina com um epóxi que contém um suporte polimérico ou grupos halo, tal como grupos cloro, bromo, iodo. Esse suporte polimérico pode ser qualquer resina de polímero sintético ou natural apropriado, tal como poli(met)acrilato, celulose, poliestireno-divinilbenzeno e agarose. Exemplos dessas resinas disponíveis comercialmente são AF-epóxi 650M de To-

soh Biosciences Toyopearl, Sepharose 6B ativado com epóxi. Esses materiais podem ser reagidos com um dos grupos amina terminais de polietilenimina com diversos pesos moleculares através da formação de grupos alfa-hidróxi amina quimicamente estáveis. Esses materiais podem ser reagidos com um grupo amina terminal de polietilenimina com diversos pesos moleculares, através da formação de grupos alfa-hidróxi amina estáveis. Algumas das propriedades de materiais preparados dessa maneira, de acordo com os exemplos 1 a 5 abaixo, estão resumidas na tabela 1.

Em uma segunda modalidade, meios de modo misto, com locais de troca de ânions fracos e cátions fracos são preparados reagindo os glóbulos poliméricos funcionalizados com PEI com anidridos de ácido carboxílico cíclico, tal como anidrido glutárico ou succínico nos exemplos 6 a 10 abaixo.

Em uma terceira modalidade, meios de modo misto com locais de ânions fracos, cátions fracos e cátions fortes foram preparados reagindo o polímero derivado com PEI com um anidrido de ácido carboxílico insaturado, seguido de sulfonação, tal como descrito nos exemplos 11 a 13.

Em uma quarta modalidade, meios de modo misto, com locais de ânions fracos e hidrofóbicos (fase inversa) foram preparados reagindo o polímero derivado com PEI com cloreto de alquila (exemplos 14 a 18) ou anidridos de ácidos monobásicos dos exemplos 19 a 24). Reações com cloreto de butirila foram realizadas por 2 h, à temperatura ambiente, usando tolueno ou dioxano como solvente. Trietilamina foi usada para remover o ácido clorídrico produzido como um produto secundário da reação.

Em uma quinta modalidade, meios de modo misto são obtidos por reação da resina revestida com PEI com anidrido butírico realizada em 1-metóxi-2-propanol por 3 h, a 60°C, tal como apresentado nos exemplos 20 - 22 abaixo.

Resinas de modo misto de base fraca/fase inversa, onde o componente hidrofóbico é um grupo metila ou uma combinação de grupos metila e butila podem ser preparadas usando anidrido acético ou adição sequencial de anidrido butírico e acético, tal como mostrado, respectivamente, no e-

xemplo 24 (anidrido acético) ou nos exemplos 20 e 23 (anidridos mistos). Como tal, é possível variar e escolher hidrofobicidade adequada usando um a uma combinação de reagentes.

Em uma sexta modalidade, meios de modo misto, com locais de
5 ânions fracos e ânions fortes (amônio quaternário) foram preparados reagindo o polímero derivado com cloretos de alquila, que contêm funcionalidade de amônio quaternário terminal. Mais particularmente, o polímero derivado com PEI é reagido com cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio em hidróxido de sódio aquoso a 70-80°C, tal como mostrado nos exemplos 25 a
10 30 abaixo.

De acordo com a presente invenção, inesperadamente foi descoberto que esses meios cromatográficos de modo misto poliméricos oferecem capacidade de separação aumentada, bem como alta capacidade e estabilidade. Por exemplo, os meios de troca de ânions mistos, poliméricos,
15 podem separar lisozimas, imunoglobulina G, albumina de soro bovino, beta-lactoglobulina A e beta-lactoglobulina B, enquanto meios baseados em sílica de PEI não podem separar todas essas proteínas, tal como mostrado na figura 1. Os meios de troca de cátions de modo misto podem separar BSA, IgG, citocromo-C e lisozima eficientemente, tal como mostrado na figura 2,
20 enquanto os meios de sílica de modo misto não podem separar todas essas proteínas.

EXEMPLOS

Exemplo 1

12 g de polímero de metacrilato levando epóxi, com tamanho de
25 partícula médio de 35 microns de diâmetro e 250 ml de dioxano são colocados em um balão de fundo redondo de 1 l, equipado com um funil, agitador, condensador de refluxo e entrada de pressão de nitrogênio positiva, e agitados por 30 min, para deixar a resina inchar. São adicionados 20 g de polietilenimina (PEI, peso molecular médio 600 Dáltons) e o funil é lavado com 150
30 ml adicionais de dioxano. A mistura agitada é submetida a refluxo durante a noite. Depois de deixar a mistura esfriar, a mistura é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada uma vez com dioxano, três vezes com metanol

e secada sob vácuo a 60°C. Análise elementar: 57,8% de C, 7,4% de H e 5,6% de N.

Exemplo 2

5 g de polímero de metacrilato levando epóxi e 150 ml de dioxano são colocados em um balão de fundo redondo de 500 ml, equipado com um agitador e condensador de refluxo. São adicionados 30 g de PEI (peso molecular médio 1200 Dáltons) e a mistura é submetida a refluxo durante a noite. Depois de deixar a mistura esfriar, a mesma é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada duas vezes com dioxano, três vezes com metanol e secada. Análise elementar: 55,7% de C, 7,8% de H e 5,5% de N.

Exemplo 3

5 g de polímero de metacrilato levando epóxi e 150 ml de uma mistura de 50/50 de dioxano e água são colocados em um balão de fundo redondo de 500 ml, equipado com um agitador e refluxo. São adicionados 30 g de PEI (peso molecular médio 1200 Dáltons) e a mistura é submetida a refluxo durante a noite (89°C). Depois de deixar a mistura esfriar, a mesma é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada duas vezes com dioxano, três vezes com metanol e secada. A análise elementar indica que o produto final contém: 57,5% de C, 7,4% de H e 2,5% de N.

Exemplo 4

5 g de polímero de metacrilato levando epóxi e 100 ml de uma solução de 30% de PEI com peso molecular médio de 10.000 dáltons em dioxano são colocados em um balão de fundo redondo de 250 ml, equipado com um agitador, entrada de nitrogênio e condensador de refluxo, e a mistura agitada é submetida a refluxo durante a noite. Depois de deixar a mistura esfriar, a mistura é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada três vezes com água de 60°C, três vezes com metanol e secada durante a noite em um forno de vácuo a 60°C. A análise elementar indica que o produto final contém: 56,5% de C, 7,8% de H e 6,4% de N.

Exemplo 5

5 g de resina metacrílica levando epóxi e 100 ml de uma solução de 30% de PEI com peso molecular médio de 10.000 dáltons em dioxano

são colocados em um balão de fundo redondo de 250 ml, equipado com um agitador e condensador de refluxo, e a mistura agitada é submetida a refluxo por 17 1/2 h. Depois de deixar a mistura esfriar, a mistura é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada três vezes com água de, três vezes com metanol e secada durante a noite em um forno de vácuo a 60°C. A análise elementar indica que o produto final contém: 56,9% de C, 7,5% de H e 3,2% de N.

Tal como indicam os resultados da tabela 1, a presença de água no sistema tem um efeito negativo sobre a incorporação de nitrogênio, enquanto teores de nitrogênio similares são obtidos quando PEI de diversos pesos molares são reagidos com a resina em dioxano seco (embora a uma relação de PEI para polímero mais baixa do que no exemplo 1).

Tabela 1. Efeito de solvente e peso molecular de PEI sobre a incorporação de nitrogênio

Solvente	PEI de 600 Dáltons	PEI de 1.200 Dáltons	PEI de 10.000 Dáltons
Dioxano	Exemplo 1 PEI/polímero = 1,66 5,6% de N	Exemplo 2 PEI/polímero = 6 5,5% de N	Exemplo 4 PEI/polímero = 6 6,4% de N
Água/dioxano (1:1)	N/A	Exemplo 3 PEI/polímero = 6 2,5% de N	N/A
Água	N/A	N/A	Exemplo 5 PEI/gel = 6 3,2% de N

Tal como indicam, ainda, os resultados na tabela 1, as reações realizadas em dioxano puro, contrariamente à mistura de dioxano/água ou água pura, dão um grau mais alto de funcionalização, tal como indicado pelo teor de nitrogênio do produto final. Quando dioxano puro é usado como o solvente (primeira fileira da tabela 1), não parece haver um nível significativamente mais alto de introdução de nitrogênio, quando o peso molecular do PEI é aumentado de 600 para 10.000 Dáltons.

Exemplo 6

30 g de polímero de PEI preparados tal como no exemplo 1 são

lavados com duas vezes seu volume de etanol de 100% e duas vezes seu volume de 1-metóxi-2-propanol, para remover qualquer umidade residual. O polímero é depois misturado em 450 ml de 1-metóxi-2-propanol, transferido para um balão equipado com agitador superior, condensador de refluxo e entrada de pressão de nitrogênio positiva, e aquecido para 60°C. Depois da adição de uma solução de 19,43 g de anidrido glutárico de 95% (1 eq, baseado no teor de nitrogênio da resina de PEI), a temperatura é mantida a 60 ± 2°C por 2 1/2 h. A mistura de reação é depois transferida a um balão de filtro, drenada e o sólido residual é lavado uma vez com 100 ml de 1-metóxi-2-propanol, duas vezes com 100 ml de metanol e duas vezes com 100 ml de solução de armazenamento (etanol:água 20:80 v/v, ou 100 mM de acetato de sódio, pH 4,5, com álcool benzílico de 2%). O produto foi armazenado na respectiva solução de armazenamento para caracterização e para separação cromatográfica de proteínas. A análise elementar indica que o produto final contém: %C=55,1, %N=4,6.

Exemplo 7

73,7 g de polímero revestido com PEI, preparado tal como no exemplo 1, 225 ml de 1-metóxi-2-propanol e 14,4 g de anidrido succínico são aquecidos para 60 ± 2°C e mantidos a essa temperatura por 2 1/2 h. A mistura de reação é depois transferida para um balão de filtro, drenada e o sólido residual é lavado uma vez com 100 ml de 1-metóxi-2-propanol, duas vezes com 100 ml de metanol e duas vezes com 100 ml de solução de tampador de armazenamento, tal como descrito no exemplo 5. A análise elementar indica que o produto final contém: 53,8% de C, 7,13% de H e 4,86% de N.

Exemplo 8

A reação foi realizada tal como no exemplo 7, exceto que a carga de anidrido succínico é de 17,34 g. A análise elementar indica que o produto final contém: 53,18% de C, 7,97% de H e 5,18% de N.

Exemplo 9

11 g de polímero revestido com PEI, preparado tal como no exemplo 1, são lavados com duas vezes seu volume de etanol de 100% e

duas vezes com seu volume de dioxano, para remover qualquer umidade residual. A resina é depois misturada em cerca de 200 ml de dioxano, transferida para um frasco triplo, equipado com um tubo de entrada de nitrogênio, e aquecida para 50-60°C. Depois de uma hora, são adicionados 7 g de anidrido glutárico e a temperatura é mantida a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 1/2 h. A mistura de reação é depois transferida para um balão de filtro, drenada e o sólido residual é lavado três vezes com dioxano, três vezes com metanol e secado sob vácuo. A análise elementar indica que o produto final contém: 56,64% de C, 7,54% de H e 4,36% de N.

10 Exemplo 10

A reação foi realizada tal como no exemplo 9, exceto que foram usados 10 g de polímero de PEI preparado de acordo com o exemplo 1 e 6,6 g de anidrido succínico. A análise elementar indica que o produto final contém: 54,46% de C, 7,96% de H e 4,6% de N.

15 Tabela 2. Preparação de meios com troca de ânions fraca e de cátions fraca

Exemplo	Solvente	ml de Solvente/g de resina	Anidrido	Miliequivalente anidrido/g resina	Temperatura °C	Tempo h	% de N
6	1-M-2-P	15	glutárico	9,00	60	2,5	4,56 - 4,75*
7	1-M-2-P	3,1	succínico	46,45	60	2,5	4,86
8	1-M-2-P	3,1	succínico	54,84	60	2,5	5,18
9	dioxano	15,9	glutárico	3,06	60	2,5	4,36
10	dioxano	17,5	succínico	3,77	60	2,5	4,6

1-M-2-P = 1-metóxi-2-propanol.

Exemplo 11

86,5 g de polímero de PEI, preparado de acordo com o exemplo 1, e 865 ml de metóxi-2-propanol são colocados em um balão de fundo redondo de 2 litros, equipado com um agitador e condensador de refluxo, e agitados por 30 min. São adicionados 23,7 g de anidrido maléico e a mistura é agitada por 2,5 h a 60°C. Depois de deixar a mistura esfriar, a mistura é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada uma vez com metóxi-2-propanol, três vezes com água, três vezes com metanol. A análise elementar indica que o produto final contém: 55,6% de C, 4,9% de N, 7,1% de H e 0%

de S.

Exemplo 12

86,5 g de uma resina maleada, tal como no Exemplo 11, são aquecidos em 900 ml de hidróxido de sódio de 0,01 N, na presença de um
5 meta-bissulfito de sódio por 6 h a $80 \pm 2^\circ\text{C}$. Depois de deixar a mistura esfriar, a mistura é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada uma vez com metóxi-2-propanol, três vezes com água, três vezes com metanol e armazenada em tamponador de armazenamento para uso posterior. A análise
10 elementar indica que o produto final contém: 49,8% de C, 4,6% de N, 6,8% de H e 2,1% de S.

Exemplo 13

A reação foi realizada tal como no exemplo 12, exceto que a reação é executada por 20 h a $80 \pm 2^\circ\text{C}$. A análise elementar indica que o produto final contém: 50,2% de C, 4,5% de N, 6,8% de H e 2,1% de S.

15 A comparação do teor de enxofre de amostras obtidas após 8 h de reação (3,8% de S, exemplo 12) e 20 h de reação (3,40% de S, exemplo 13) indica que a reação está completa depois de 8 h.

Exemplo 14

30 g de PEI funcionalizado, preparado de acordo com o exemplo
20 1, são lavados duas vezes com 120 ml de etanol de 100% e duas vezes com 120 ml de tolueno, para remover umidade residual. O material foi depois misturado em 300 ml de tolueno, 9,29 de cloreto butirílico (1 eq, baseado no teor de nitrogênio da resina) e 9,24 g de trietilamina foram adicionados, e a reação foi deixada continuar por 2 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A resina foi depois transferida
25 para um balão de filtro e lavado com 300 ml de tolueno, 300 ml de metanol, duas vezes com 300 ml de água DI, três vezes com 300 ml de metanol e duas vezes com 300 ml de tamponador de armazenamento de pH 5 (10 mM de acetato de sódio, pH 4,5). A análise elementar indica que o produto final contém: 53,7% de C, 7,5% de H e 5,6% de N.

Exemplo 15

A reação foi realizada tal como no exemplo 14, exceto que o solvente são 450 ml de dioxano. A análise elementar indica que o produto

final contém: 54,7% de C, 8,0% de H e 5,5% de N.

Exemplo 16

A reação foi realizada tal como no exemplo 14, exceto que foram usados 13,3 g de cloreto butirílico e 13,2 de trietilamina. A análise elemental indica que o produto final contém: 53,6% de C, 7,9% de H e 4,5% de N.

Exemplo 17

A reação foi realizada tal como no exemplo 14, exceto que foram usados 19 g de cloreto butirílico e 18 g de trietilamina. A análise elemental indica que o produto final contém: 55,4% de C, 7,8% de H e 4,2% de N.

Exemplo 18

A reação foi realizada tal como no exemplo 14, exceto que foram usados 25,3 g de cloreto butirílico e 24 g de trietilamina. A análise elemental indica que o produto final contém: 55,0% de C, 7,9% de H e 4,5% de N.

Alguns dos resultados obtidos usando tolueno como solvente estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3. Reação de resina revestida com PEI com cloreto butirílico em tolueno (2 h @ RT)

Exemplo	Eq. reagentes de funcionalização/eq. N	C/N	%N
14	1	9,59	5,6
16	1,4	11,86	4,5
17	2	13,12	4,2
18	2,7	12,26	4,5

Tal como indicam os resultados da tabela 3, quantidades crescentes de reagente resultam em um nível de funcionalização aumentado (tal como indicado pela redução correspondente do teor de nitrogênio do produto).

Exemplo 19

60 g de polímero funcionalizado com PEI, preparado tal como no exemplo 1 e inchado em 200 ml de 1-metóxi-2-propanol, 600 ml de 1-metóxi-

2-propanol, 56,3 de anidrido butírico (excesso 1,5 molar) e 36 g de trietilamina são reagidos por 3 h a $60 \pm 2^\circ\text{C}$. A mistura de reação é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada uma vez com 500 ml de 1-metóxi-2-propanol, uma vez com 500 ml de metanol, duas vezes com 500 ml de água DI e duas vezes com 500 ml de tamponador de armazenamento. A análise elementar indica que o produto final contém: 54,6% de C, 7,9% de H e 4,8% de N.

Exemplo 20

60 g de polímero funcionalizado com PEI, preparado tal como no exemplo 1 e inchado em 200 ml de 1-metóxi-2-propanol, 600 ml de 1-metóxi-2-propanol, 6,2 de anidrido butírico e 4,0 g de trietilamina são reagidos por 3 h a $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Nesse ponto, foram adicionados 24,2 g de anidrido acético foi adicionado e a reação foi deixada continuar à mesma temperatura por 3 h adicionais. A mistura de reação é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada uma vez com 500 ml de 1-metóxi-2-propanol, uma vez com 500 ml de metanol, duas vezes com 500 ml de água DI e duas vezes com 500 ml de tamponador de armazenamento. A análise elementar indica que o produto final contém: 53,7% de C, 7,7% de H e 4,7% de N.

Exemplo 21

A reação foi realizada tal como no exemplo 19, exceto que foram usados 6,26 g de anidrido butírico e 4,0 g de trietilamina. A análise elementar indica que o produto final contém: 53,7% de C, 7,9% de H e 4,8% de N.

Exemplo 22

A reação foi realizada tal como no exemplo 19, exceto que foram usados 1,52 g de anidrido butírico e 1,0 g de trietilamina. A análise elementar indica que o produto final contém: 54,6% de C, 8,3% de H e 5,0% de N.

Alguns dos resultados estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4. Reação de resina revestida com PEI com anidrido butírico em 1-metóxi-2-propanol (2 h @ RT)

Exemplo	Eq. reagentes de funcionalização/eq. N	C/N	%N
20	1,5	11,4	4,7
21	0,16	11,2	4,8
22	0,04	10,9	5,0

A comparação dos resultados nas tabelas 3 e 4 mostra que níveis de substituições similares aos obtidos com cloreto butírico podem ser obtidos com anidrido butírico usando quantidades estequiométricas consideravelmente mais baixas de reagente.

Exemplo 23

A reação foi realizada tal como no exemplo 20, exceto que foram usados 1,52 g de anidrido butírico e 1,0 g de trietilamina e 10,7 g de anidrido acético. A análise elementar indica que o produto final contém: 55,4% de C, 7,9% de H e 4,9% de N.

Exemplo 24

60 g de polímero funcionalizado com PEI, preparado tal como no exemplo 1 e inchado em 20 ml de 1-metóxi-2-propanol, 500 ml de 1-metóxi-2-propanol e 14,07 g de anidrido acético são reagidos por 6 h a $60 \pm 2^\circ\text{C}$. A mistura de reação é transferida para um balão de filtro, drenada, lavada uma vez com 500 ml de 1-metóxi-2-propanol, duas vezes com 500 ml de NaOH de 0,1 N, duas vezes com 500 ml de água DI e duas vezes com 500 ml de tamponador de armazenamento. A análise elementar indica que o produto final contém: 53,8% de C, 7,5% de H e 5,3% de N.

Exemplo 25

80 g de polímero funcionalizado com PEI, preparado tal como no exemplo 1, é reagido por 8 h a 80°C com 59 g de uma solução de 60% de cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio em 500 ml de hidróxido de sódio de 0,5 N. A mistura de reação é transferida para um balão de filtro e lavada duas vezes com hidróxido de sódio de 0,1 N, duas vezes com água DI e uma vez com tamponador de armazenamento. Após lavagem e seca-

gem, a resina tem a seguinte análise elementar: 54,2% de C, 8,4% de H e 5,9% de N.

Exemplo 26

5 A reação foi realizada tal como no exemplo 25, exceto que a solução de hidróxido de sódio é de 0,05 N. Após lavagem e secagem, a resina tem a seguinte análise elementar: 51,9% de C, 7,6% de H e 5,3% de N.

Exemplo 27

10 A reação foi realizada tal como no exemplo 25, exceto que a reação foi continuada por 16 h. Após lavagem e secagem, a resina tem a seguinte análise elementar: 53,4% de C, 8,4% de H e 5,7% de N.

Exemplo 28

A reação foi realizada tal como no exemplo 26, exceto que a reação é continuada por 16 h. Após lavagem e secagem, a resina tem a seguinte análise elementar: 52,8% de C, 8,1% de H e 5,7% de N.

15 Exemplo 29

A reação foi realizada tal como no exemplo 25, exceto que a relação da solução de 60% de cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio para resina é de 1,2, em vez de 0,73. Após lavagem e secagem, a resina tem a seguinte análise elementar: 53,72% de C, 7,32% de H e 6,04%
20 de N.

Exemplo 30

A reação foi realizada tal como no exemplo 25, exceto que a relação da solução de 60% de cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio para resina é de 1,2, em vez de 0,73. Após lavagem e secagem, a
25 resina tem a seguinte análise elementar: 53,72% de C, 7,32% de H e 6,04% de N.

Tabela 5. Reação de resina revestida com PEI com cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio

Exemplo	Reagente de funcionalização g/resina g	Conc. de NaOH	Tempo de reação	%N
25	0,74	0,5 N	8 h	5,9
26	0,74	0,05 N	8 h	5,3
27	0,74	0,5 N	16 h	5,7
28	0,74	0,05 N	16 h	5,7
29	0,4	0,5 N	8 h	6,04
30	1,2	0,5 N	8 h	6,04

Exemplo 31

- 160 g de polímero funcionalizado com PEI, preparado de acordo com o exemplo 1, é reagido por 5 horas @ 40°C com 111,8 g de formaldeído, 400 ml de acetonitrila e 25,9 g de cianoboridreto de sódio. Depois da reação, o polímero foi lavado com 480 ml de acetonitrila, 480 ml de água DI e 3 vezes com 480 ml de metanol e armazenado em tamponador de armazenamento para uso adicional. (Análise elementar: %C = 55,2, %N = 5,8).

10 Exemplo 32

- 25 mg do polímero preparado de acordo com o exemplo 31 e 200 ml de acetonitrila foram carregados em uma autoclave (reator de pressão montado em banco Parr, série 4500, com controlador de temperatura Parr 4840). Enquanto o polímero era agitado a 120 R.P.M., gás de cloreto de metila foi carregado e pressurizado para 0,413 MPa (60 PSI). A reação foi continuada por 5 h a 80°C. Depois da reação, o produto foi lavado com 60 ml de acetonitrila, 120 ml de hidróxido de sódio de 0,1 N, 120 ml de água DI, 240 ml de tamponador de armazenamento e armazenado em tamponador de armazenamento.

20 Exemplo 33

- 71 g de polímero modificado com PEI, preparado de acordo com o exemplo 1, foram misturados com 500 ml de hidróxido de sódio de 0,5N e reagidos com 49 g de cloreto de 3-(dimetilamino)propila, enquanto eram agitados a 50-100 R.P.M. a 80°C por 8 horas. Depois da reação, o produto foi

lavado duas vezes com 500 ml de hidróxido de sódio, duas vezes com 500 ml de água DI, duas vezes com 500 ml de tamponador de armazenamento e armazenado no tamponador para uso adicional. Análise elementar: %C: 55,4, %N: 6,2

5 Exemplo 34

Separação cromatográfica de proteínas

Um meio cromatográfico preparado tal como no exemplo 1 e meio de sílica de PEI de JT Baker (número do produto 7264, lote N16084) foi carregado em uma coluna cromatográfica de 4,6 x 100 mm. 200 microlitros de uma solução de 1 mg/ml de lisozima, 2 mg/ml de imunoglobulina G de coelho, 2 mg/ml de albumina de soro bovino e 2 mg/ml de cada um de beta-lactoglobulina A e B em um tamponador de acetato de sódio de 20 mM a pH 6,2 são injetados na coluna e extraídos usando uma razão de fluxo de 1 ml/min e um gradiente de 30 min de 100% de tamponador de acetato de sódio de 20 mM a pH 6,2 para 100% de tamponador de acetato de sódio de 1,0 M a pH 6,2. A extração das proteínas é registrada por um detector de UV a 280 nm (figura 1).

Exemplo 35

Separação cromatográfica de proteínas

Um meio cromatográfico preparado tal como no exemplo 9, carregado em uma coluna cromatográfica de 4,6 x 100 mm. 200 microlitros de uma solução de 4 mg/ml de BSA, 2 mg/ml de IgG de coelho, 2 mg/ml de citocromo-c e 2 mg/ml de solução de lisozima em 20 mM de tamponador de acetato de sódio a pH 6,2 é injetado na coluna e extraído usando uma razão de fluxo de 1 ml/min e um gradiente de 40 min de 100% de um tamponador de acetato de sódio de 20 mM a pH 6,2 do mesmo agente de extração, mas contendo 1 mol por litro de acetato de sódio, pH 6,2. A extração das proteínas pelos meios desse exemplo e para meios de modo misto comparativos, baseados em sílica (JT Baker número do produto 7269) é registrada por um detector de UV a 280 nm (figura 2).

Exemplo 36

Comparação de capacidade

A capacidade de meios cromatográficos preparados de acordo com o exemplo 9 e produtos baseados em sílica foi medida e comparada. Uma coluna (4,6 mm x 50 mm) foi carregada com o meio. Solução de IgG (1 mg/ml) em acetato de sódio de 20 mM a pH 5,6, 6,2 e 6,9 foi aplicada à
 5 coluna a uma velocidade linear variável (cm/h). A ruptura foi determinada por monitoração com UV a 280 nm. A capacidade de ruptura do meio na coluna foi determinada a 10% de ruptura (tabela 7)

Tabela 7: Capacidade de ruptura de meios de modo misto e meios de sílica

Amostras	Velocidade linear cm/h	pH	Capacidade de ruptura, mg/ml
Exemplo 9	361	6,2	11,9
Exemplo 9	722	6,2	10,7
Meio de sílica de modo misto 7269	361	6,2	5,3
Meio de sílica de modo misto 7269	722	6,2	5,9
Exemplo 9	361	5,6	47
Exemplo 9	722	5,6	32
Meio de sílica de modo misto 7269	361	5,6	15,5
Meio de sílica de modo misto 7269	722	5,6	13,1
Exemplo 9	361	6,9	7,1
Meio de sílica de modo misto 7269	361	6,9	3,5

Exemplo 37

10 Meio cromatográfico preparado de acordo com o exemplo 19 e meio de sílica (JT Baker, nº de produto 7285) foram carregados em uma coluna de 7,75 mm x 100 mm. Foram injetados 200 µl de uma solução de 2 mg/ml de solução de citocromo C, ribonuclease, lisozima e ovalbumina em 25 mM de fosfato de sódio pH 7,0 + 1,7 de sulfato de amônio. A proteína foi
 15 extraída da coluna por gradiente linear de 60 minutos de 100% de 25 mM de fosfato de sódio + 1,7 M de sulfato de amônio para 100% de fosfato de sódio

pH 7,0. O perfil de extração foi monitorado por UV @ 280 nm (figura 3A e 3B).

Exemplo 38

Meio cromatográfico preparado de acordo com o exemplo 20 foi carregado em uma coluna de 7,75 mm x 100 mm. Foram injetados 200 µl de uma solução de 2 mg/ml de solução de citocromo C, ribonuclease, lisozima e ovalbumina em 25 mM de fosfato de sódio pH 7,0 + 1,7 de sulfato de amônio. A proteína foi extraída da coluna por gradiente linear de 60 minutos de 100% de 25 mM de fosfato de sódio + 1,7 M de sulfato de amônio para 100% de 25 mM de fosfato de sódio pH 7,0. O perfil de extração foi monitorado por UV @ 280 nm (figura 4).

Exemplo 39

Meio cromatográfico preparado de acordo com o exemplo 22 foi carregado em uma coluna de 7,75 mm x 100 mm. Foram injetados 200 µl de uma solução de 2 mg/ml de solução de citocromo C, ribonuclease, lisozima e ovalbumina em 25 mM de fosfato de sódio pH 7,0 + 1,7 de sulfato de amônio. A proteína foi extraída da coluna por gradiente linear de 60 minutos de 100% de 25 mM de fosfato de sódio + 1,7 M de sulfato de amônio para 100% de fosfato de sódio pH 7,0. O perfil de extração foi monitorado por UV @ 280 nm (figura 5).

Exemplo 40

Meio cromatográfico preparado de acordo com o exemplo 23 foi carregado em uma coluna de 7,75 mm x 100 mm. Foram injetados 200 µl de uma solução de 2 mg/ml de solução de citocromo C, ribonuclease, lisozima e ovalbumina em 25 mM de fosfato de sódio pH 7,0 + 1,7 de sulfato de amônio. A proteína foi extraída da coluna por gradiente linear de 60 minutos de 100% de 25 mM de fosfato de sódio + 1,7 M de sulfato de amônio para 100% de fosfato de sódio pH 7,0. O perfil de extração foi monitorado por UV @ 280 nm (figura 6).

Exemplo 41

O meio polimérico preparado de acordo com o exemplo 7 foi carregado em uma coluna de 1,0 cm x 10 cm. Primeiramente, a coluna foi equi-

librada passando 10 volume/coluna de tamponador A (MES de 0,05 M, pH 5,6). Depois da equilibração, foram injetados 0,5 ml de solução de proteína contendo globulina de coelho (0,5 mg/ml) e lisozima (0,25 mg/ml). As proteínas foram extraídas do coluna executando por 40 minutos um gradiente linear de 100% de tamponador A para 100% de tamponador B (cloreto de sódio de 1M no tamponador A). Depois da primeira execução de separação das proteínas, a coluna foi lavada circulando 500 ml de ácido fosfórico de 10 mM a 1 ml/min por 48 horas. Depois da lavagem, a separação das proteínas foi realizada novamente, para determinar a estabilidade do ácido da coluna (figura 7). Esses dados indicam a excelente estabilidade do meio polimérico de modo misto sob condições ácidas, uma vez que não há mudança no tempo de retenção de IgG e lisozima, antes e depois da lavagem da coluna com ácido fosfórico por até 48 horas.

Exemplo 42

O meio polimérico preparado de acordo com o exemplo 7 foi carregado em uma coluna de 1,0 cm x 10 cm. Primeiramente, a coluna foi equilibrada passando 10 volume/coluna de tamponador A (MES de 0,05 M, pH 5,6). Depois da equilibração, foram injetados 0,5 ml de solução de proteína contendo globulina de coelho (0,5 mg/ml) e lisozima (0,25 mg/ml). As proteínas foram extraídas do coluna executando por 40 minutos um gradiente linear de 100% de tamponador A para 100% de tamponador B (cloreto de sódio de 1M no tamponador A). Depois da primeira execução de separação das proteínas, a coluna foi lavada circulando 500 ml de hidróxido de sódio de 0,1 M a 1 ml/min por 24 e 48 horas. Depois da lavagem, a separação das proteínas foi realizada novamente, para determinar a estabilidade da base da coluna (figura 8). Esses dados indicam a excelente estabilidade do meio polimérico de modo misto sob condições básicas, uma vez que não há mudança no tempo de retenção de IgG e lisozima, antes e depois da lavagem da coluna com hidróxido de sódio por até 48 horas.

Exemplo 43

A capacidade dos meios cromatográficos preparados de acordo com o exemplo 1, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 32 foi medida e comparada. Uma

coluna (4,6 mm x 50 mm) foi carregada com o meio. Uma solução de BSA (1 mg/ml) em CAPS de 20 mM (3-[cicloexilamino]-1-propano ácido sulfônico) pH 11 foi aplicada à coluna a uma razão de fluxo de 1 ml/min. A ruptura foi determinada por monitoração com UV a 280 nm. A capacidade de ruptura do meio na coluna foi determinada a 10% de ruptura. Depois de carregar BSA nas colunas, as colunas foram lavadas com tamponador de CAPS e, depois, BSA adsorvido foi extraído usando cloreto de sódio de 1M para calcular a capacidade de saturação (tabela 8).

Tabela 8 Comparação de capacidade

Amostras	Velocidade linear cm/h	pH	Capacidade de ruptura mg/ml	Capacidade de saturação mg/ml
Exemplo 1	361	11	0,8	1
Exemplo 25	361	11	22	34
Exemplo 26	361	11	16	22
Exemplo 27	361	11	21	35
Exemplo 28	361	11	20	28
Exemplo 29	361	11	0,4	0,4
Exemplo 30	361	11	25	33
Exemplo 32	361	11	25	39

A invenção foi descrita no presente relatório com referência a modalidades específicas da mesma. Deve ser entendido que mudanças, modificações e variações podem ser feitas sem afastar-se do espírito e escopo do conceito inventivo descrito no presente relatório. Conseqüentemente, destina-se a abranger todas essas mudanças, modificações e variações que coincidem com o espírito e escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Meio cromatográfico, caracterizado pelo fato de que compreende partículas de resina polimérica epoxidada ou halogenada derivatizada através da reação com polietilenoimina na superfície do polímero, em que as
5 partículas poliméricas compreendem polímeros selecionados a partir do grupo consistindo em poliestirenos epoxidados ou halogenados, poliacrilatos ou polimetacrilatos epoxidados ou halogenados, e polidivinilbenzenos epoxidados ou halogenados, e em que as partículas de resina polimérica derivatizadas com polietilenoimina na superfície do polímero são funcionalizadas através da reação de um reagente de funcionalização com grupos amino terminais da polietilenoimina na superfície da resina polimérica.
10

2. Meio cromatográfico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente de funcionalização é selecionado a partir do grupo consistindo em anidridos ácidos, agentes de sulfonação, cloretos
15 de alquila e cloretos de alquila contendo funcionalidade de amônio quaternário e misturas dos mesmos.

3. Meio cromatográfico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o reagente de funcionalização é selecionado a partir do grupo consistindo em anidridos carboxílicos cíclicos, anidridos carboxílicos insaturados, bissulfitos, cloretos de alquila, anidridos de alquila, cloretos
20 de alquila contendo funcionalidade de amônio quaternário e misturas dos mesmos.

4. Meio cromatográfico de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o reagente de funcionalização é selecionado a partir do grupo consistindo em: anidrido glutárico, anidridos succínicos, anidrido
25 maléico, meta-bissulfito de sódio, cloreto de butila, anidrido acético, anidrido butírico, cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio, e misturas dos mesmos.

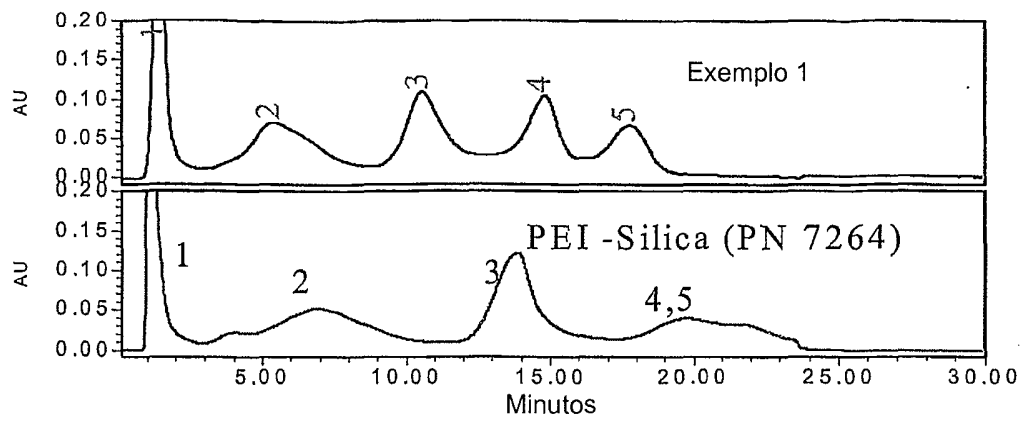
5. Meio cromatográfico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser de modo misto.
30

6. Meio cromatográfico de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o meio de modo misto é selecionado a partir do

grupo consistindo em meios com sítios de troca de aminas primárias, secundárias e terciárias mistas, meios com sítios de troca tanto de ânions fracos como de cátions fracos, meios com sítios de troca de ânions fracos, cátions fracos e cátions fortes, meios com sítios de troca de ânions fracos e hidrofóbicos (fase reversa) e meios com sítios de troca de ânions fracos e ânions fortes.

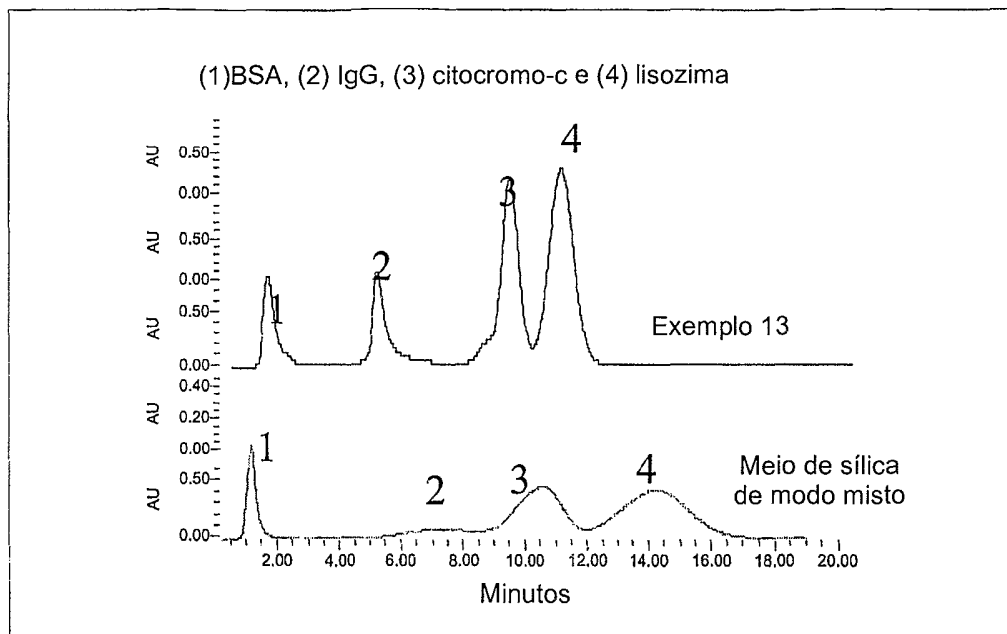
7. Coluna para cromatografia, caracterizada pelo fato de ser carregada com meio cromatográfico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Processo para separação de componentes de uma solução, caracterizado pelo fato de que compreende passar a solução através de uma coluna de cromatografia, como definida na reivindicação 7, e eluir os componentes da solução, em que a solução é uma solução contendo proteínas.



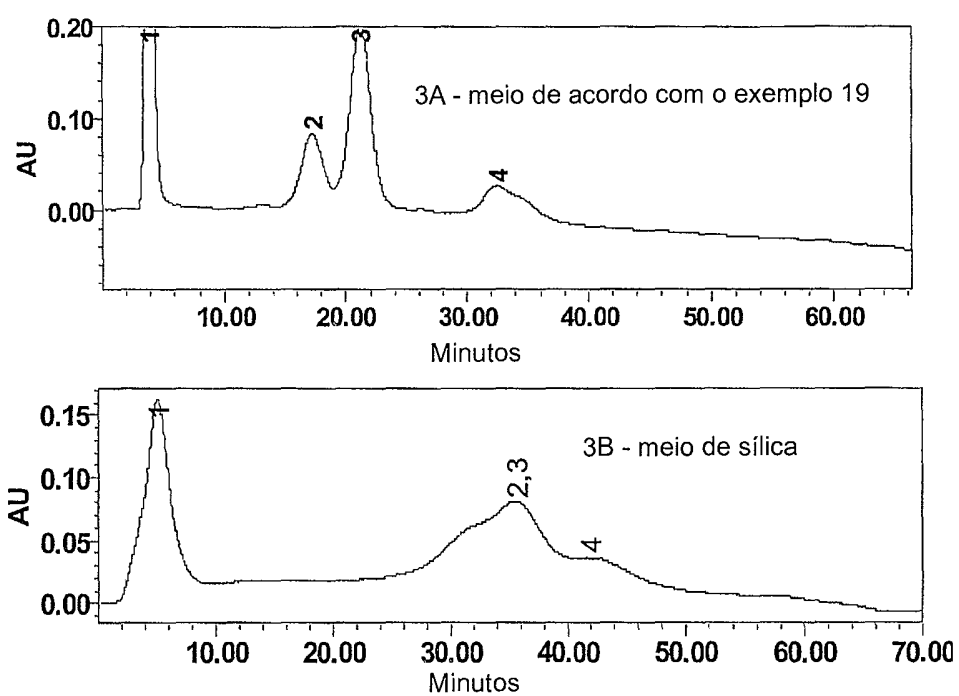
1-lisozima, 2-IgG, 3-BSA, 4-B-lactoglobulina B e 5-B-lactoglobulina A

Fig. 1



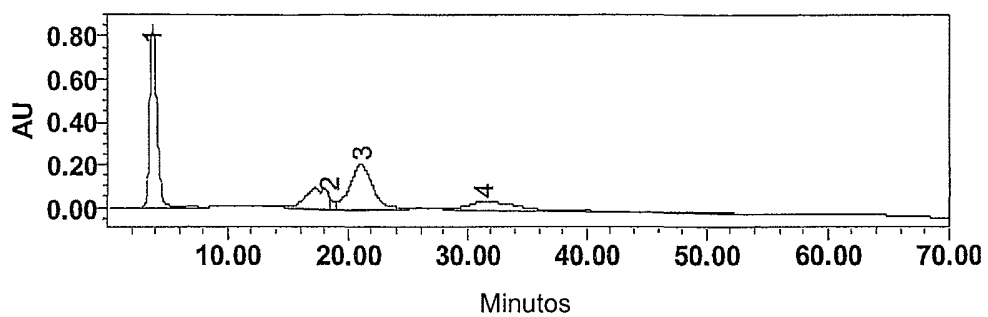
[(1)BSA, (2) IgG, (3) citocromo-c e (4) lisozima (coluna 0,46x100 mm, 1ml/min)
A;20 mm acetato de sódio pH 6,2, b: 1M acetato de sódio, pH 6,2 (15 min gradiente linear)]

Fig. 2



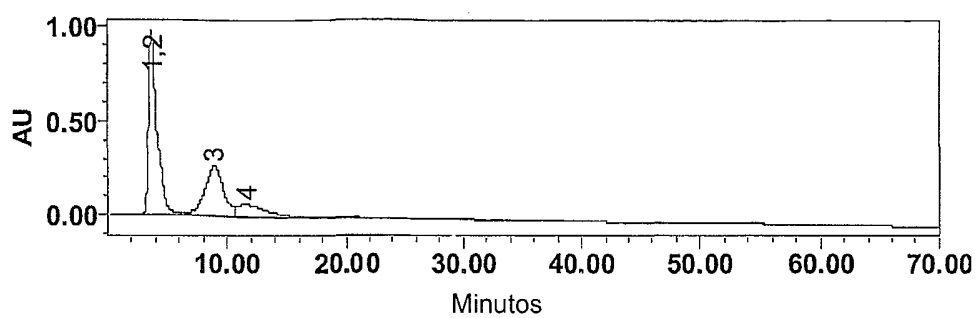
[(1)citocromo-C, (2)ribonuclease, (3)lisozimeand, (4)ovalbumina (coluna 7,75x100,
 1ml/min A: 25 mm fosfato de sódio, pH 7,0+1,7 M sulfeto de amônio,
 B: 25 mm de fosfato de sódio, pH 7,0
 (gradiente linear 60 min de 100% de A para 100% de B)]

Figs. 3A and 3B



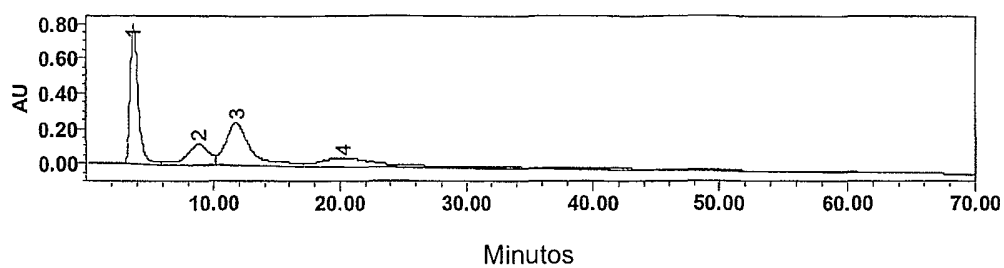
[(1)citocromo-C, (2)ribonuclease, (3)lisozimeand, (4)ovalbumina (coluna 7,75x100,
1ml/min A: 25 mm fosfato de sódio, pH 7,0+1,7 M sulfato de amônio,
B: 25 mm de fosfato de sódio, pH 7,0 (gradiente linear 60 min de 100% de A para 100% de B)]

Fig. 4



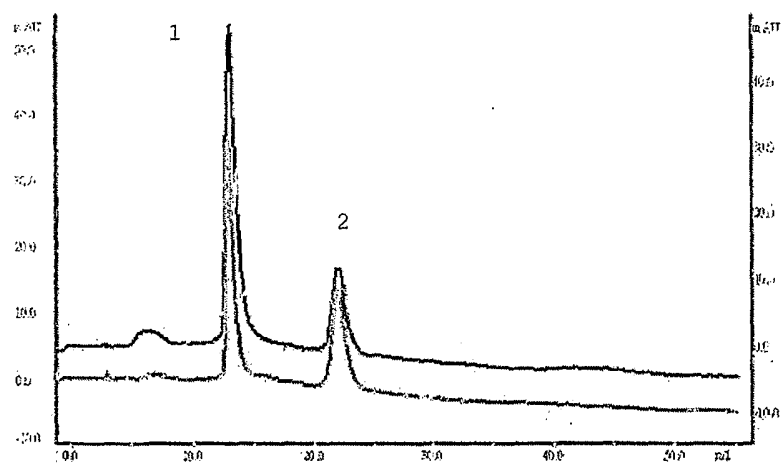
[(1)citocromo-C, (2)ribonuclease, (3)lisozimeand, (4)ovalbumina
(coluna 7,75x100, 1ml/min A: 25 mm fosfato de sódio, pH 7,0+1,7 M
sulfto de amônio, B: 25 mm de fosfato de sódio, pH 7,0
(gradiente linear 60 min de 100% de A para 100% de B)]

Fig. 5



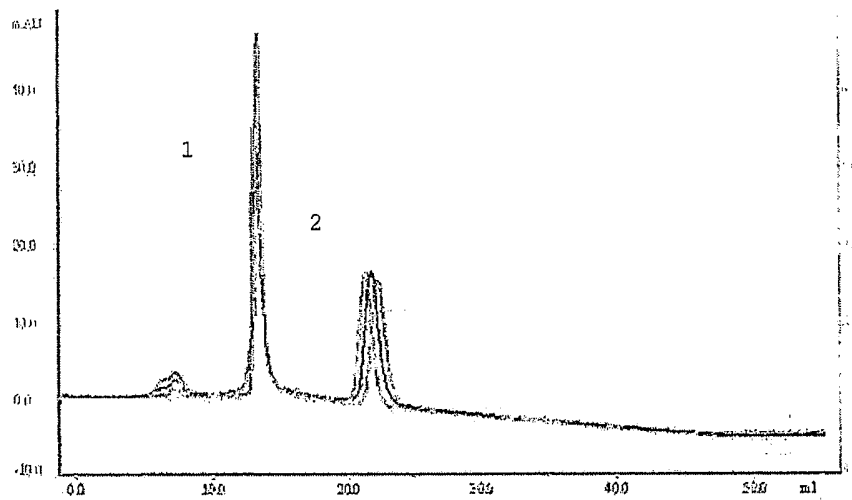
[(1)citocromo-C, (2)ribonuclease, (3)lisozimeand, (4)ovalbumina
(coluna 7,75x100, 1ml/min A: 25 mm fosfato de sódio, pH 7,0+1,7 M
sulfto de amônio, B: 25 mm de fosfato de sódio, pH 7,0
(gradiente linear 60 min de 100% de A para 100% de B)]

Fig. 6



Amostra: 0,25 mg IgG e 0,12 mg lisozima, vermelho: coluna inicial; azul: 48 horas
 [(1)BSA, (2)IgG de coelho (coluna 1cmx10cm, 1ml/min)
 A:0,05M MES, pH 5,6; B: A + 1M cloreto de sódio
 (gradiente linear 40 min de 100% de A para 100% de B)]

Fig. 7



Amostra: 0,25 mg IgG e 0,12 mg lisozima, vermelho:
 coluna inicial; azul: 24 horas; verde: 48 horas [(1)BSA, (2)IgG de coelho
 (coluna 1cmx10cm, 1ml/min) A:0,05M MES, pH 5,6; B: A + 1M
 cloreto de sódio (gradiente linear 40 min de 100% de A para 100% de B)]

Fig. 8

RESUMO

Patente de Invenção: **"MEIO CROMATOGRÁFICO, COLUNA PARA CROMATOGRAFIA E PROCESSO PARA SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DE UMA SOLUÇÃO"**.

- 5 A presente invenção refere-se à preparação e ao uso de novos meios cromatográficos poliméricos e, de preferência, meios cromatográficos poliméricos de modo misto. De acordo com a presente invenção, o meio polimérico é preparado usando partículas poliméricas derivadas com polietilénimina e, de preferência, essas partículas poliméricas derivadas com polietilénimina são adicionalmente funcionalizadas com reagentes apropriados. O
- 10 meio cromatográfico polimérico é especialmente útil para biosseparações.