

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 631 849**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **88 07151**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : B 01 D 15/08; C 07 K 3/18; B 01 J 20/32.

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30 mai 1988.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 48 du 1<sup>er</sup> décembre 1989.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RE-  
CHERCHE SCIENTIFIQUE. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Bernard Sebille ; Véronique Monique Fer-  
rari ; Bernard Chaufer ; Marie-Claude Millot.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Yvette Sueur.

⑤4 Support pour la séparation des protéines, procédé pour sa préparation et application en chromatographie.

⑤7 L'invention concerne la séparation des protéines.

Le support destiné à réduire l'adsorption des protéines  
comporte un solide poreux sur lequel est déposée une pellicule  
de polymère ou de copolymère, le polymère comportant des  
fonctions amide N-disubstitué ou étant un copolymère obtenu  
à partir d'un monomère ayant des fonctions amide disubstitué  
et d'un autre monomère copolymérisable.

Application à la séparation chromatographique des  
protéines.

FR 2 631 849 - A1

D

La présente invention concerne un nouveau support destiné à la séparation des protéines, constitué par un polymère déposé sur un oxyde minéral, un procédé pour sa préparation, ainsi que son application en chromatographie.

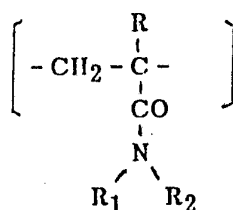
5 On sait qu'il est possible de déposer des polymères sur divers supports minéraux en vue de préparer, par exemple, des colonnes de séparation de diverses substances, et, plus particulièrement, le dépôt de polymères synthétiques sur de la silice, de l'alumine ou d'autres oxydes minéraux a été décrit  
10 dans diverses publications. Les polymères neutres utilisés sont le polyoxyéthylène glycol, la polyvinylpyrrolidone, les silicones, ainsi que le polyvinylimidazole décrit dans la demande de brevet FR-A-2.598.512.

On considère généralement que le polymère doit être fixé  
15 sur le support de manière stable, et qu'il est nécessaire de former des liaisons covalentes, par exemple entre les groupements SiOH de la silice servant de support et des fonctions époxyde présentes dans le polymère, comme dans le brevet EP-A-172.579. Le brevet US-A-4.415.631 décrit un support à base  
20 d'oxyde minéral traité par un silane réactif, sur lequel est fixé un polymère réticulé, par liaison covalente. Une telle structure implique toutefois un procédé de préparation précis et rigoureux.

La présente invention concerne un support destiné à la  
25 séparation des protéines, permettant de réduire leur adsorption, procurant une efficacité de séparation améliorée par rapport aux produits usuels de la technique, comportant un solide minéral sur lequel est déposée une pellicule de polymère ou copolymère, sans qu'il soit nécessaire de former des  
30 liaisons covalentes pour assurer une bonne fixation du polymère sur le support.

Le support suivant la présente invention se distingue en ce que le polymère, ou le copolymère, comporte des fonctions amide N-disubstitué, et peut être préparé par un procédé très  
35 simple et peu coûteux.

Les polymères ou copolymères utilisés dans la présente invention sont de préférence du type comportant les motifs de formule générale :



5 dans laquelle R est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents représentent un groupe alkyle linéaire ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou des groupements comportant des fonctions alcool, éther,  
10 amide ou amine choisis de telle sorte que le polymère soit soluble dans l'eau ou gonflé dans ce solvant, ou R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> peuvent se combiner pour former avec l'atomes d'azote auquel ils sont rattachés, un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons.

Dans la formule générale ci-dessus, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent  
15 de préférence un groupe méthyle, éthyle ou n-propyle, ou encore un groupe -CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>X, X étant un atome d'hydrogène ou d'halogène, un groupe hydroxy ou une chaîne hydroxyalkyle de 1 à 4 atomes de carbone.

Lorsqu'ils forment un groupe hétérocyclique avec l'atome  
20 d'azote auquel ils sont rattachés, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> peuvent former par exemple un groupe pyrrolidinyle, pipéridinyle ou pyrazolye; cet hétérocycle peut le cas échéant comporter un deuxième hétéroatome, et plus particulièrement un atome d'oxygène, pour constituer par exemple un groupe morpholinyle.

25 Le monomère copolymérisable peut être un dérivé à insaturation éthylénique de formule CH<sub>2</sub> = CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> dans laquelle R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle et R<sub>4</sub> un groupement hydrophile comportant une ou plusieurs fonctions ester, amide, époxy, alcool, imidazole ou encore un reste silanique de formule SiX<sub>3</sub> où X est un atome d'hydrogène ou  
30 d'halogène ou un groupe alcoxy de 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe acétoxy ou un groupe phénoxy.

R<sub>4</sub> peut être par exemple un groupe alcoxy inférieur de 1 à 3 atomes de carbone, tel que méthoxy, éthoxy ou n-propoxy, un  
35 groupe cyano, ou un groupe de formule -COOR<sub>5</sub> dans laquelle R<sub>5</sub> est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur de 1 à 4 atomes de carbone, portant le cas échéant une fonction

hydroxyle ou époxyde, tel qu'un groupe méthyle, éthyle, époxyéthyle, 2,3-époxypropyle, 2-hydroxyéthyle ou 3-hydroxypropyle.

Le monomère copolymérisable peut être plus particulièrement choisi parmi l'acrylamide, le N-alkyl acrylamide avec une chaîne de 1 à 10 atomes de carbone, les acrylates ou méthacrylates de trihydroxyalkyle ayant une chaîne de 1 à 10 atomes de carbone.

Le monomère copolymérisable peut être choisi de manière à orienter les propriétés du copolymère résultant, en fonction des effets recherchés, suivant une technique connue. On peut par exemple utiliser des monomères anioniques, cationiques, non ioniques, ou encore des monomères comportant des fonctions réactives particulières, comme la fonction époxyde.

Des exemples de monomères anioniques ayant un groupement carboxylique ou sulfonique sont: l'acide acrylique, méthacrylique, itaconique, maléique, éthylène sulfonique, 2-acrylamido 2-méthylpropylsulfonique, N-acryloyltaurine. Des exemples de monomères cationiques sont des vinylpyridine, vinylimidazole quaternisé ou non, acrylate ou méthacrylate d'alkyle amino, diméthylamino propylacrylamide et chlorure de méthacrylamido propyltriméthylammonium. Le support résultant peut alors être utilisé comme matériau échangeur d'ions pour la séparation des protéines.

Dans le cas où le monomère copolymérisable comporte des fonctions époxyde (par exemple un acrylate ou méthacrylate de glycidyle) il est possible d'obtenir un matériau possédant des propriétés spécifiques après réaction chimique de cette fonction.

Ainsi, par exemple, la réaction de l'époxyde avec une solution de sulfite ou d'hydrogène sulfite de sodium permet d'obtenir des fonctions sulfoniques, permettant l'application, par exemple, comme matériau échangeur de cations. La fonction époxyde peut aussi réagir avec le thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) pour conduire après réduction (par exemple par action du mercaptoéthanol, du dithioérythritol ou d'un autre agent réducteur) à des composés contenant des fonctions thiol. Le support ainsi obtenu, comportant des fonctions thiol, est alors utilisable pour la fixation covalente des protéines ou la

détection des thiols. Ces fonctions peuvent ensuite être transformées en disulfure réactif par action du disulfure de 2- (ou 4-) pyridyle.

5 La fonction époxyde peut encore réagir avec des amines ou des polyamines comprenant des amines primaires, secondaires ou tertiaires pour obtenir un matériau échangeur d'anions. Enfin, la fonction époxyde peut servir à la fixation covalente de protéines ou de polymères contenant des fonctions nucléophiles telles que  $\text{NH}_2$ , SH, phénol ou alcool, permettant l'application  
10 du support ainsi obtenu en chromatographie d'affinité.

Les polymères utilisés dans la présente invention, lorsqu'ils ne sont pas immédiatement disponibles dans le commerce, peuvent être préparés par les techniques classiques bien connues. En particulier, la fonction amide N-disubstitué  
15 peut être obtenue par réaction d'un dérivé activé d'acide acrylique et d'une amine appropriée, par exemple par réaction d'un halogénure d'acide acrylique, tel que le chlorure d'acryle, sur une amine, à température ambiante. Suivant une variante, on peut également faire agir un ester acrylique et  
20 une amine.

Le procédé de préparation du support suivant la présente invention consiste à imprégner le solide poreux par une solution de polymère ou de copolymère contenant les motifs amide N-disubstitué, et à rincer ensuite avec le solvant. Il est préférable que le polymère (ou le copolymère) soit soluble à concentration élevée dans le solvant pour assurer une bonne adsorption sur le solide poreux. Les solvants utilisés peuvent être  
25 l'eau, un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol, ou un solvant halogéné comme le dichlorométhane.

30 Le solide poreux est un oxyde minéral tel que la silice, l'alumine ou l'oxyde de titane ou de zirconium. Suivant l'invention, on utilise de préférence la silice. Cet oxyde peut avoir subi un traitement préalable à l'aide d'un silane réactif tels que ceux décrits dans le brevet US 4.415.631, c'est-à-dire comportant des groupements amine, hydroxyle, époxy, ester  
35 ou thiol. Le cas échéant, le polymère ou copolymère déposé sur le solide poreux peut être réticulé par les techniques connues,

par exemple par traitement dans une solution alcoolique d'éthylène diamine.

Il est ainsi possible d'utiliser le support conforme à l'invention pour la séparation chromatographique des protéines ou des polymères hydrophiles en faisant intervenir un mécanisme d'exclusion par la taille, d'échange d'ions ou hydrophobe, selon le cas.

Afin d'améliorer la durée de vie et la stabilité des propriétés des supports pendant leur utilisation, et pour augmenter leur aptitude à séparer les espèces, il est montré que l'irradiation par des rayonnements  $\gamma$  ou  $\beta$  (électrons) après imprégnation du solide poreux, améliore les propriétés de séparation des matériaux obtenus. Dans le cas d'un support neutre, on constate que la relation entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire est mieux vérifiée après irradiation dans le cas des faibles masses moléculaires comme le montre la figure 1.

D'autre part, dans le cas de supports échangeurs d'ions, le pouvoir de résolution exprimé par le faible recouvrement des espèces séparées est nettement plus marqué que dans le cas des matériaux non irradiés.

Les figures annexées, explicitées dans les exemples, représentent:

Fig. 1: la relation entre la masse moléculaire (logarithme) et le volume d'élution avec un support traité ou non traité par irradiation.

Fig. 2: la relation entre la masse moléculaire (logarithme) et le volume d'élution pour diverses protéines.

Fig. 3: un exemple de séparation de protéines par échange d'ions (élution en fonction du temps).

Fig. 4: la séparation des mêmes protéines que sur la fig. 3, en utilisant un support irradié.

Les exemples suivants illustrent l'invention plus en détail sans en limiter la portée.

#### Exemple 1

Dans cet exemple, on prépare de la silice modifiée par dépôt de poly-N'-diméthylacrylamide ou de colymère.

On part d'une silice sphérique dont la taille des particules est de 10  $\mu\text{m}$ .

Le rayon de pores moyen est de l'ordre de 30 nm.

1 - Silice modifiée :

5 On met la silice serrée en présence d'une solution de polydiméthylacrylamide (PDMA) à 40 g/l dans un chlorure de méthylène dans des proportions telles qu'il y ait un rapport de 1/10 (1 g pour 10 ml de solution). L'ensemble est soumis à une agitation mécanique pendant 3 heures à température ambiante.

10

2 - Silice réactive :

La silice, préalablement deshydratée 48 heures à 60°C est mise en présence d'une solution de copolymère N,N'-diméthylacrylamide - acrylate de glycidyle (DMA-GA) contenant 15 10% de motifs époxyde, et de masse Mv 90.000.

La solution d'adsorption est une solution méthanolique à 4% dans un rapport de 1/10 par rapport à la silice. Le temps de réaction est de 3 heures (température: 20°C) sous agitation mécanique.

20

Les silices ainsi préparées sont soigneusement rincées avec 200 ml de solvant.

En fin d'opération on détermine la quantité de polymère adsorbé à partir des mesures d'analyse élémentaire. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 ci-après.

25

TABLEAU 1

SILICE	P D M A			D M A - G A
	(mg/g)			(mg/g)
(30 nm, 10 $\mu\text{m}$ )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	MeOH	MeOH
Spherisorb	176			
Nucleosil	70	64	46	75
35 Nucleosil	95			
Nucleosil	67			
Lichrosphère	141			

### Exemple 2

Une solution de poly-N,N'-diméthyl acrylamide à 4% dans le chlorure de méthylène ( $M \sim 40.000$ ) est mise au contact de 5 g d'une silice de porosité 30 nm et de granulométrie 10  $\mu\text{m}$  (silice spherisorb) pour constituer une colonne chromatographique de dimension 15 cm x 4 mm.

En utilisant comme éluant du tampon phosphate de potassium 10 mM + 0,32 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à pH 7,4, on réalise une chromatographie d'exclusion par la taille permettant de séparer les protéines indiquées ci-dessous :

- 1 cytochrome C
- 2 lysozyme
- 3  $\alpha$ -lactalbumine
- 4 myoglobine
- 5  $\alpha$ -chymotrypsinogen
- 6  $\beta$ -lactoglobuline
- 7 ovalbumine
- 8 catalase
- 9 Sérum albumine humaine
- 10 conalbumine
- 11 phosphatase alcaline
- 12 thyroglobuline

Une relation linéaire est observée entre le logarithme de la masse moléculaire et le volume d'élution. Des interactions hydrophobes ou ioniques sont à l'origine des écarts observés pour les protéines 2-10-11 (fig. 2).

### Exemple 3

On utilise un support chromatographique constitué de silice Nucléosil ayant la même granulométrie et la même porosité que précédemment, imprégné comme dans l'exemple 1 mais avec un polymère de masse 10.000.

La silice modifiée est alors dégazée dans l'eau sous vide et soumise à une irradiation par le  $\text{Co}^{60}$  de manière à obtenir une dose totale de 30 MRad (300 KGy).

Le support chromatographique irradié est comparé au même support non irradié (fig.1). Les résultats obtenus montrent que

l'irradiation améliore l'élution des protéines (3-9-7) sur les supports.

#### Exemple 4

5 La silice réactive décrite dans l'exemple 1 est mise au contact d'une solution de sulfite de sodium 1,5 M, pH 10,0 pendant 5 heures à 20°C. Durant la réaction, la suspension est soumise à une agitation douce.

10 Le support sulfonate est ensuite filtré sous pression, soigneusement lavé avec 500 ml d'eau distillée, puis séché pendant 24 heures à 60°C.

Un exemple de séparation de protéines basiques ( $pI > 7$ ) par échange d'ions en utilisant ce support est donné dans la fig.3.

L'élution est effectuée dans les conditions suivantes :

15 Eluant A : 20mM phosphate de sodium pH 7,0

Eluant B : A + 0,5 NaCl

débit 1ml/min

Gradient linéaire de 0 à 100% B en 30 min.

Détection UV, 280 nm.

On sépare ainsi les 3 protéines suivantes :

- 20
1.  $\alpha$ -chymotrypsinogen A
  2. Cytochrome C
  3. Lysozyme.

#### Exemple 5

25 La silice réactive décrite dans l'exemple 1 est alors introduite dans un tube pour subir un dégazage en milieu aqueux sous vide, le tube est ensuite scellé et soumis à une irradiation  $\gamma$  par le cobalt 60 pendant le temps nécessaire pour recevoir une dose totale de 11 MRad.

30 La silice irradiée est rincée à l'eau distillée, puis soumise à une modification chimique au sulfite de sodium décrite dans l'exemple n° 4.

35 La phase ainsi obtenue permet d'obtenir une nette amélioration de la résolution d'un mélange,  $\alpha$ -chymotrypsinogen A (1), cytochrome C (2) et lysozyme (3), comme le montre la fig.4, élué dans les conditions décrites dans l'exemple 4.

## Exemple 6

1 g de silice époxyde décrite dans l'exemple 1 est mis en suspension dans 5 ml de phosphate 0,5 M, pH 6,3. Puis on ajoute 4 g de thiosulfate en solution dans 8 ml d'eau distillée. L'ensemble est soumis à une agitation régulière pendant 5 heures à température ambiante. La silice est alors filtrée et rincée abondamment à l'eau, avant d'être mise en suspension dans 5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M auquel on ajoute 380 mg de dithioérythrytol (DTE) en solution dans 5 ml d'EDTA  $10^{-3}$  M; la réduction au DTE a lieu à température ambiante pendant 35 à 40 minutes. Le support réactionnel SH est alors soigneusement lavé avec successivement 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  + 1M NaCl +  $10^{-3}$ M EDTA,  $10^{-3}$  M EDTA.

La silice ainsi obtenue contient des fonctions thiols SH que l'on peut activer au disulfure, la silice SH étant alors mise au contact d'une solution de 90ml de disulfure  $5 \cdot 10^{-3}$  + 25% MeOH.

Le support ainsi préparé permet la séparation de protéines contenant des groupes SH, telles que l'albumine (BSA) ainsi que tous composés porteurs de fonctions thiols.

## Exemple 7

On utilise le support réactif décrit dans l'exemple 1 en utilisant comme polymère réactif le copolymère N,N'-diméthylacrylamide - éther d'allyle et glycidyle dans un rapport de 90/10. 1 g de cette silice est mis en suspension dans une solution de sérum albumine humaine à  $6 \text{ g.l}^{-1}$  dans 1 M de phosphate de potassium à pH 8,0. L'ensemble est soumis à une agitation mécanique pendant 72 heures à  $4^\circ\text{C}$ ; la silice est alors filtrée et rincée abondamment à l'eau.

## Exemple 8

La silice réactive décrite dans l'exemple 1 est mise en suspension dans une solution méthanolique d'acide malique de concentration telle que la quantité totale de fonctions carboxyliques présentes soit inférieure ou égale à 20% des motifs époxy.

L'ensemble est soumis à une agitation mécanique pendant environ 12 heures à température ambiante. La silice est ensuite séchée pendant 3 heures à 65°C, puis 20 heures à 125°C.

Le support ainsi traité est ensuite soumis à une modification chimique au bisulfite de sodium identique à celle décrite dans l'exemple 4.

#### Exemple 9

La solution décrite dans l'exemple 1 est mise en suspension dans une solution méthanolique d'éthylène diamine telle qu'il existe un défaut de fonctions amine par rapport aux fonctions époxy de 3/10 (3 molécules de diamine pour 10 motifs époxy), ce rapport pouvant toutefois varier jusqu'à 6/10.

L'ensemble est soumis à une agitation mécanique pendant 3 heures à température ambiante. La silice est ensuite portée à 60°C pendant 20 heures environ.

Le support ainsi réticulé est ensuite modifié chimiquement au bisulfite de sodium suivant la technique décrite dans l'exemple 4.

20

25

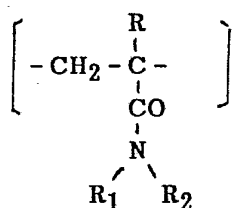
30

35

## R E V E N D I C A T I O N S

1. Support destiné à réduire l'adsorption des protéines comportant un solide poreux sur lequel est déposée une pellicule de polymère ou de copolymère, caractérisé en ce que le polymère comporte des fonctions amide N-disubstitué ou est un copolymère obtenu à partir d'un monomère ayant des fonctions amide disubstitué et d'un autre monomère copolymérisable.

2. Support selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polymère comporte l'unité récurrente :



dans laquelle R est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent un groupe alkyle linéaire ou ramifié de 1 à 4 atomes de carbone, ou des groupements comportant des fonctions alcool, éther, amide ou amine choisis de telle sorte que le polymère soit soluble dans l'eau ou gonflé dans ce solvant, ou R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> peuvent se combiner pour former avec l'atome d'azote auquel ils sont rattachés, un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons.

3. Support selon la revendication 2, caractérisé en ce que R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un groupe méthyle, éthyle ou n-propyle, ou un groupe -CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>X, X étant un atome d'hydrogène ou d'halogène, un groupe hydroxy ou une chaîne hydroxyalkyle de 1 à 4 atomes de carbone.

4. Support selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le monomère copolymérisable est un dérivé à insaturation éthylénique de formule CH<sub>2</sub> = CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> dans laquelle R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle et R<sub>4</sub> un groupement hydrophile comportant une ou plusieurs fonctions ester, amide, époxy, alcool, imidazole ou encore un reste silanique de formule SiX<sub>3</sub> où X est un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un groupe alcoxy de 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe acétoxy ou un groupe phénoxy.

5. Support selon la revendication 1, caractérisé en ce que le solide poreux est choisi parmi la silice, l'oxyde de titane et l'oxyde de zirconium.

5 6. Procédé de préparation d'un support selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à imprégner un solide poreux par une solution de polymère ou de copolymère comportant des motifs amide N-disubstitué, et à rinser avec le solvant.

10 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi l'eau, un alcool, ou un solvant halogéné.

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le polymère ou le copolymère est réticulé après imprégnation du solide poreux.

15 9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on soumet le support à une irradiation après imprégnation du solide poreux.

20 10. Support pour la séparation chromatographique des protéines ou des polymères hydrophiles, caractérisé en ce qu'il est constitué par un solide poreux sur lequel est déposée une pellicule de polymère ou copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

25

30

35

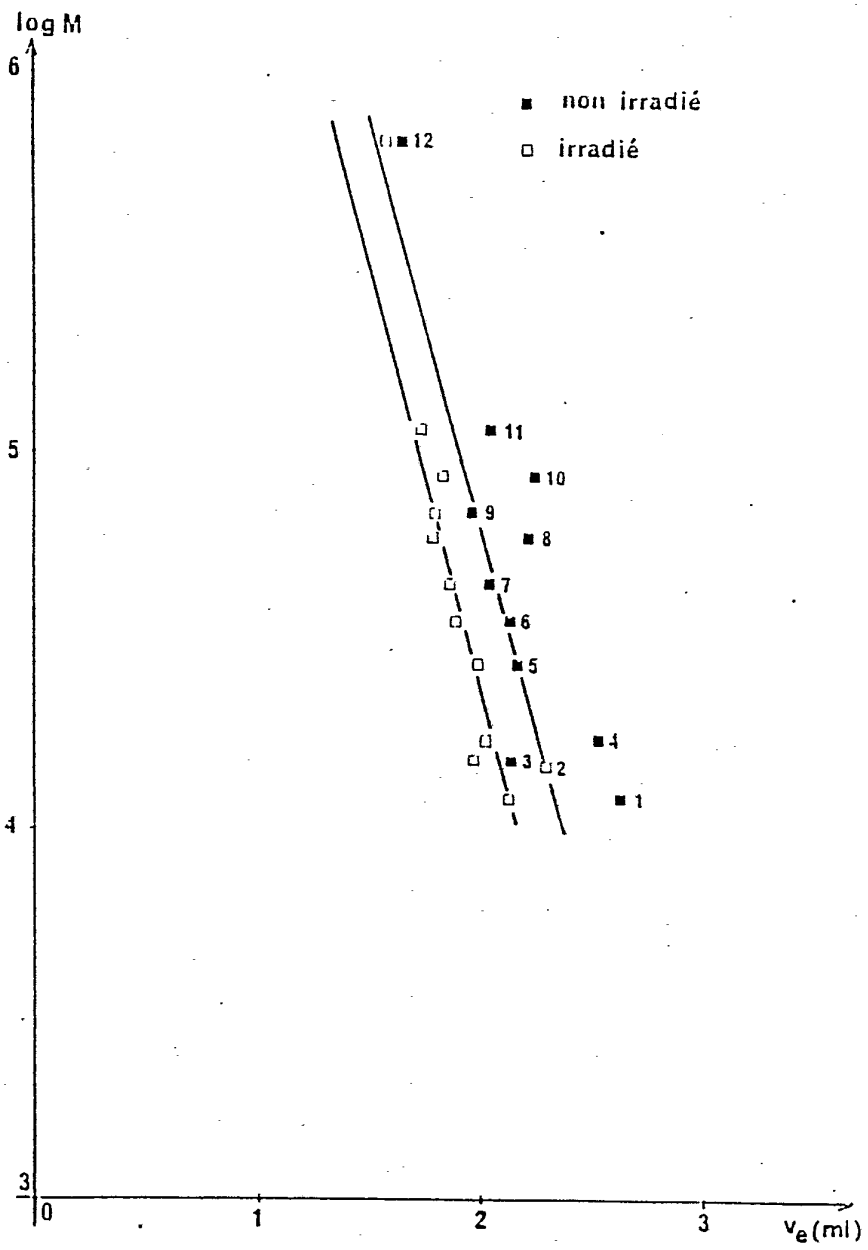


figure 1

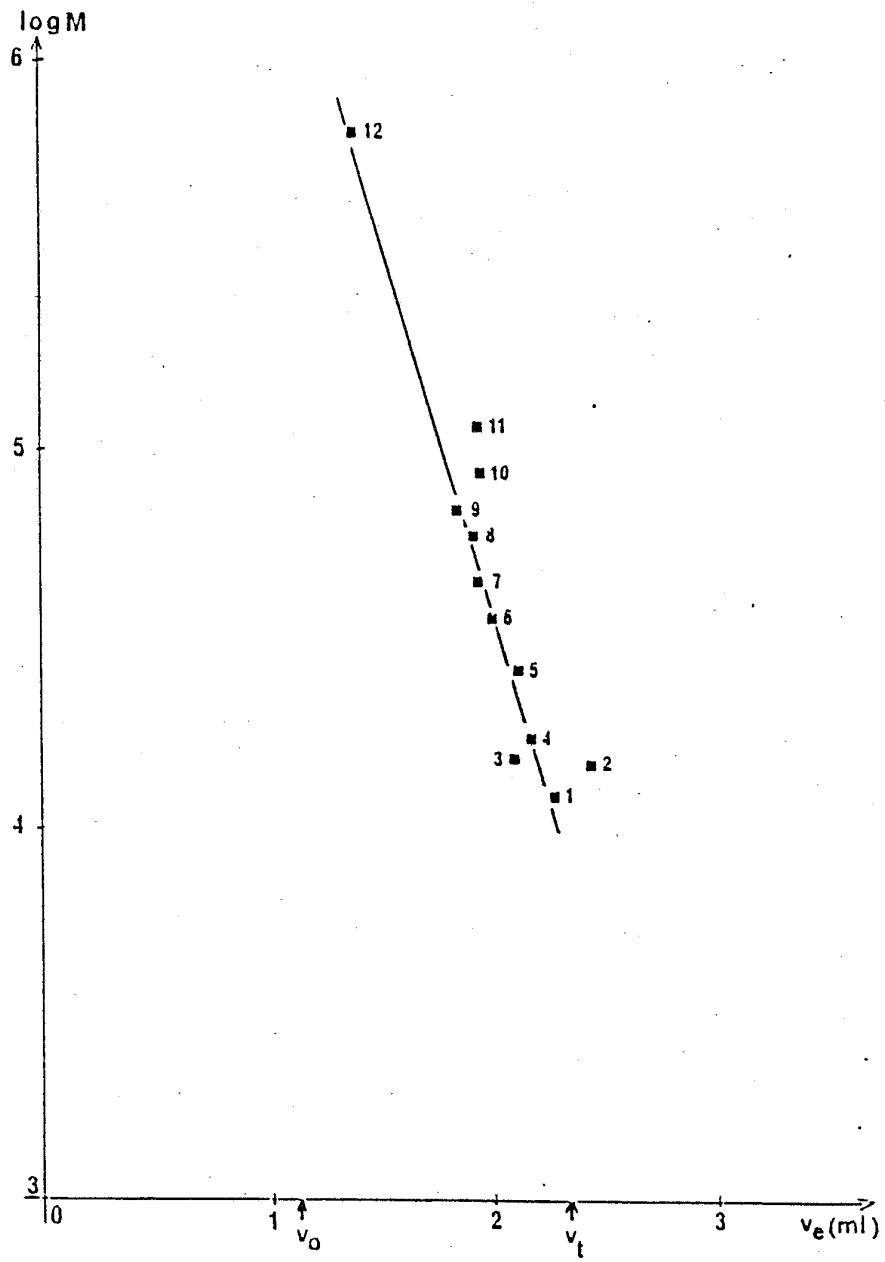


figure 2

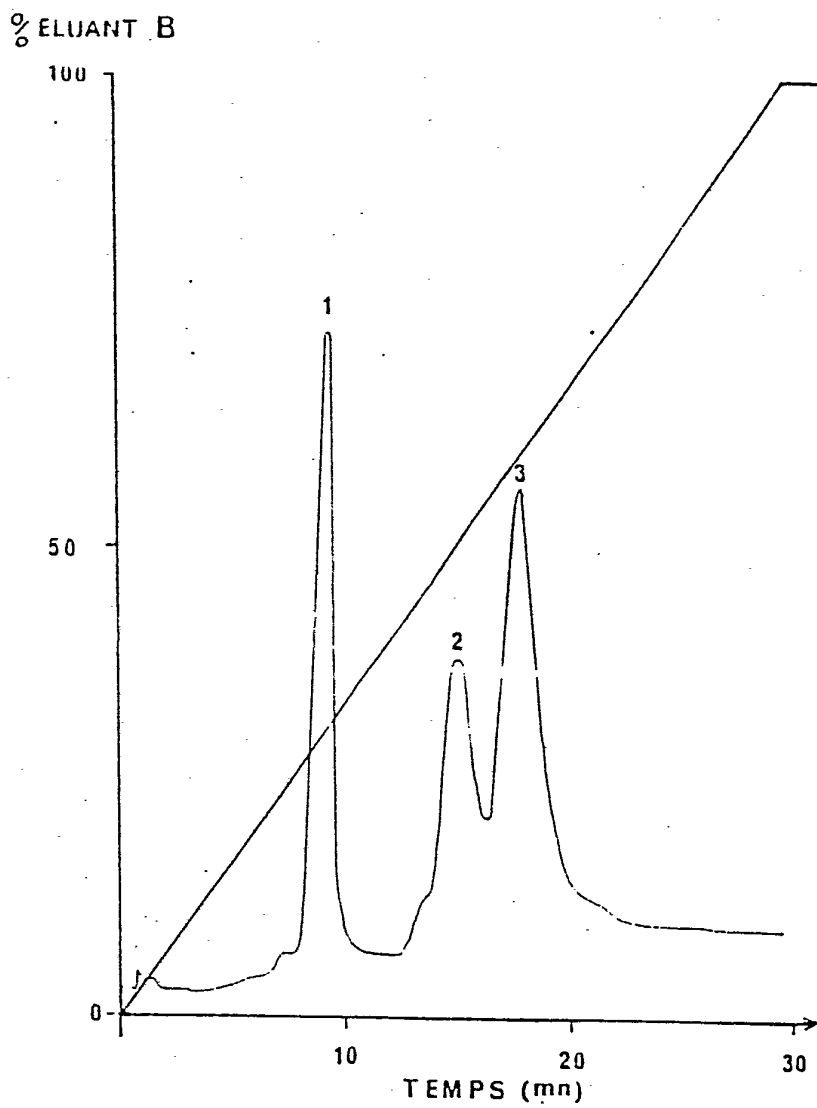


figure 3

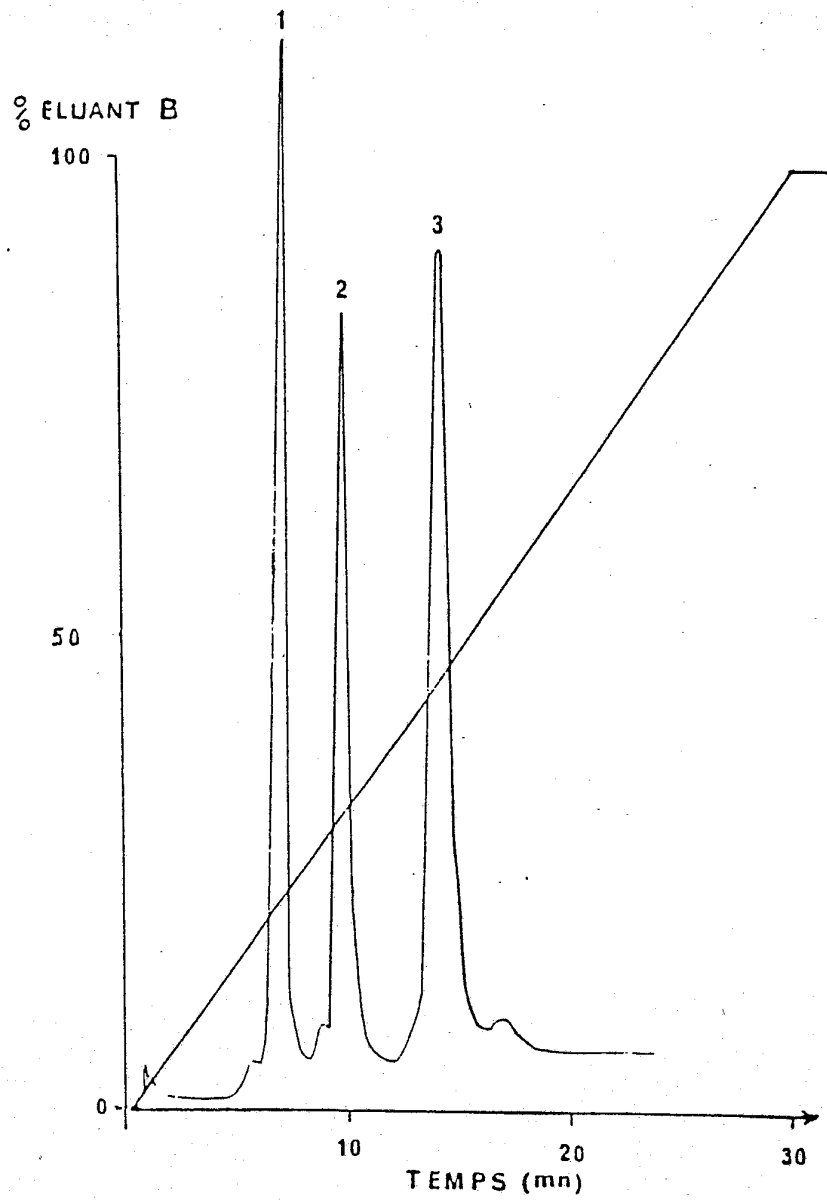


figure 4