



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 427**

(51) Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01949600 .9**

(86) Fecha de presentación : **29.06.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1295113**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

(54) Título: **Medio líquido no termosensible para el análisis de especies en el seno de un canal.**

(30) Prioridad: **30.06.2000 FR 00 08526**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **Institut Curie
26, rue d'Ulm
75248 Paris Cédex 05, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)**

(72) Inventor/es: **Viovy, Jean-Louis y
Barbier, Valessa**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Medio líquido no termosensible para el análisis de especies en el seno de un canal.

5 La presente invención se refiere al campo de las técnicas de análisis, de separación y de purificación de especies, según las cuales es necesario hacer migrar estas especies en el seno de un fluido denominado “medio de separación”.

Se refiere más particularmente a la proposición de un medio de separación apropiado para la separación de especies en canales o capilares de los cuales por lo menos unas de las dimensiones es submilimétrica, y típicamente está
10 comprendida entre 20 μm y 200 μm (denominadas a continuación microcanales). Se trata en particular de métodos de separación o de análisis de macromoléculas biológicas mediante electroforesis capilar, cromatografía, o mediante cualquier método usado en microcanales (electroforesis y cromatografía capilares, sistemas microfluídicos, “laboratorios sobre chips”). La invención es particularmente útil en el caso de la electroforesis.

15 A continuación se designará, mediante la expresión “sistema microfluídico”, cualquier sistema en el que fluidos y/o especies contenidas en un fluido se mueven en el seno de un canal o de un conjunto de canales de los cuales por lo menos una de las dimensiones es submilimétrica, y se designará, mediante la expresión “electroforesis capilar (EC)”, los sistemas microfluídicos en los que el transporte de las especies se efectúa bajo la acción de un campo eléctrico.

20 La EC y los sistemas microfluídicos permiten separaciones más rápidas y más resolutivas que los métodos más antiguos de electroforesis sobre gel, no necesitan medio anticonvectivo, y sus propiedades se usaron ampliamente para efectuar separaciones de iones en medio líquido. Hoy en día, la gran mayoría de las separaciones de macromoléculas biológicas efectuadas en EC recurren a disoluciones de polímeros hidrosolubles lineales enredados que presentan la ventaja de poder ser sustituidos tanto como sea necesario.

25 Se propusieron numerosos polímeros no reticulados como medios para la separación de especies en el seno de un canal, en particular en el contexto de la electroforesis capilar. La elección del mejor polímero para una aplicación dada depende de varios parámetros. Para la separación de analitos en función de sus tamaños, por ejemplo, se necesita que el medio presente a los analitos obstáculos topológicos suficientemente resistentes (Viovy y col., Electrophoresis, 1993, 14, 322). Esto implica que el medio de separación este altamente enredado, y por lo tanto bastante viscoso. Se
30 necesita igualmente que los polímeros presentes en el medio de separación no presenten interacciones atractivas con los analitos. En efecto, este tipo de interacciones da lugar a una ralentización de algunos analitos, y a una dispersión suplementaria (H. Zhou y col. HPCE 2000, Saarbrücken, 20-24/2/2000). Así, es bien conocido que para la secuenciación del ADN, o para la separación de proteínas, se obtienen resultados más pobres cuando la matriz presenta un carácter más hidrófobo.

Se propuso igualmente en la bibliografía usar como medio de separación copolímeros. En Menchen, documento WO 94/07133, se propuso usar como medio de separación en electroforesis capilar, medios que comprenden copolímeros de tipo copolímero de bloques llamados “regulares” porque presentan segmentos hidrófilos de una longitud
40 seleccionada, y esencialmente uniforme, y una pluralidad de segmentos hidrófobos regularmente espaciados, con una concentración superior a la concentración de solapamiento entre polímeros. Estos medios presentan la ventaja de ser reofluidificantes, es decir, que se pueden introducir en un capilar bajo alta presión, presentando al mismo tiempo en ausencia de presión exterior obstáculos topológicos sólidos. Desafortunadamente, los medios usables según este principio son difíciles de sintetizar, lo que les hace muy costosos y limita el tipo de estructuras que se pueden prever.
45 Igualmente, estos polímeros son relativamente hidrófobos, y sus rendimientos para la secuenciación del ADN, por ejemplo, son modestos.

Auki y col. (Macromolecules, 2000, 33, 444) describen medios no termosensibles a base de polímero compuesto de varios segmentos poliméricos de tipo poli (N-isopropilacrilamida) injertados con poli(ácido acrílico) (PAA_c-g-PDMAAm75) y de tipo poli(AA_c-co-DMAAm) estático.
50

Sin embargo, el uso de estos medios para la separación de especies no está descrito en este documento.

Se propuso igualmente usar como medio de separación medios termosensibles, cuya viscosidad varía enormemente durante un incremento de la temperatura. Este tipo de medio tiene como ventaja permitir la inyección de dicho
55 medio en el capilar a una primera temperatura en un estado de baja viscosidad, y la separación a una segunda temperatura en un estado de más alta viscosidad, presentando buenos rendimientos de separación, tal como se efectúa corrientemente en electroforesis de gel, en particular con agarosa. En las solicitudes WO 94/10561 y WO 95/30782 se proponen especialmente medios que permiten una inyección más fácil mediante elevación de la temperatura. En efecto, se describen esencialmente en estas Solicitudes de Patentes microgeles capaces de disminuir de volumen a altas temperaturas (conduciendo así a una disolución diluida de partículas discontinuas de baja viscosidad) y de hincharse a
60 baja temperatura hasta ocupar totalmente el canal de separación (confiriendo así al medio un carácter gelificado y buenas propiedades de separación). La Solicitud WO 98/10274 propone, por su parte, un medio de separación molecular que comprende por lo menos un tipo de copolímeros de bloques que está en disolución a una primera temperatura y en un estado de tipo gel a una segunda temperatura. Los medios descritos comprenden polímeros tribloques de bajo peso molecular (típicamente inferior a 20.000), de la familia de polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (POE-POP-POE) y más específicamente aún el (POE₉₉-POP₆₉-POE₉₉, en el que los subíndices representan los números de monómeros de cada bloque) (nombre comercial “Pluronic F 127”). A baja temperatura, los dos segmentos de POE
65

en los extremos de los sistemas de tribloques son hidrosolubles, y dado el bajo peso molecular del copolímero, las disoluciones son relativamente poco viscosas hasta una concentración elevada. Elevando la temperatura a alrededor de 15-25°C, el segmento central de POP se hace más hidrófobo, y sus polímeros se asocian para constituir un estado de tipo gel. Sin embargo, este mecanismo presenta para la electroforesis varios inconvenientes. Por una parte, da lugar a un estado de gel que tiene buenas propiedades de separación electroforética solamente a concentraciones de polímero elevadas, mayores que 15 g/100 ml, incluso 20 g/100 ml, lo que lleva a una alta fricción y a tiempos de migración largos. Por otra parte, la dependencia de las propiedades en función de la velocidad de cambio de temperatura hace aleatoria la reproducibilidad de los resultados. Finalmente, para muchas aplicaciones y en muchos aparatos, es poco cómodo, incluso imposible, cambiar la temperatura entre la fase de llenado del canal y la fase de separación.

En Madabhushi, documentos US 5.552.028, WO 95/16910, WO 95/16911, se propone igualmente usar medios de separación que comprenden un medio tamisante y un componente de interacción con la superficie constituido por un polímero con propiedades de adsorción a las paredes, de peso molecular comprendido entre 5.000 y 1.000.000, de tipo polímero de acrilamida disustituida. Estas matrices, y más particularmente la polidimetilacrilamida (PDMA), permiten reducir la electroósmosis y conducen, para algunas aplicaciones tal como la secuenciación, a buenas propiedades de separación. Sin embargo, son relativamente hidrófobas, lo que limita sus rendimientos para algunas aplicaciones tal como la secuenciación del ADN, y es aún más nefasto para otras aplicaciones tal como la separación de proteínas. Por otra parte, conducen a separaciones lentas.

Por consiguiente, a pesar de un gran número de estudios y de sistemas propuestos, no se dispone hoy en día para todas las aplicaciones evocadas aquí arriba, de un medio que sea óptimo al mismo tiempo en los aspectos de coste, de rendimientos de separación, de reducción de las interacciones con las paredes y de comodidad de uso.

La presente invención tiene precisamente por objeto proponer el uso de una familia de polímeros particularmente ventajosa como medio de separación líquido no termosensible para la separación, el análisis o la purificación de especies en canales.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un medio líquido no termosensible para el análisis, la purificación o la separación de especies en el seno de un canal según la reivindicación 1.

Según la invención, se entiende por “polímero” un producto constituido por un conjunto de macromoléculas, y caracterizado mediante algunas propiedades tales como el peso molecular, polimolecularidad, composición química y microestructura. La polimolecularidad caracteriza la distribución de peso molecular de las macromoléculas, en el sentido del peso medio, conocido por el experto en la técnica. Por “microestructura”, se entiende la forma en la que los monómeros que forman parte de su composición química están dispuestos en el seno de las macromoléculas.

Según la invención, se entiende por “líquida”, y por oposición a un “gel”, cualquier medio condensado capaz de fluir, ya sea Newtoniano o viscoelástico.

De hecho, están excluidos del campo de la invención, los geles que derivan de la copolimerización de monómeros en presencia de agente(s) de reticulación bifuncional(es) o multifuncional(es). En efecto, estos geles son, debido a su estado reticulado, sólidos o elásticos y, por lo tanto, no son líquidos. En particular, no se prestan a una introducción en un capilar.

El medio líquido según la invención es no termosensible, es decir que no presenta, entre su temperatura de solidificación más 10°C, y su temperatura de ebullición menos 10°C, cambio brusco de su viscosidad. Se entiende mediante la expresión “cambio brusco”, una variación del orden de un factor de 2 o más, en un intervalo de temperatura de 20°C o menos.

Según la invención, mediante la expresión “método de separación”, se pretende cubrir cualquier método que tiene por objeto separar, purificar, identificar o analizar, el conjunto o algunas de las especies contenidas en una muestra. En este caso, el líquido se denomina “medio de separación”, y a través de él pasa las especies a separar o por lo menos algunas de ellas durante el proceso de separación.

Mediante el término “especie”, se pretende designar de manera general partículas, orgánulos o células, moléculas o macromoléculas, y en particular macromoléculas biológicas tales como los ácidos nucleicos (ADN, ARN, oligonucleótidos), análogos de ácidos nucleicos obtenidos mediante síntesis o modificación química, proteínas, polipéptidos, glicopéptidos y polisacáridos. En los métodos analíticos, dichas especies se denominan comúnmente “analitos”.

La invención es particularmente ventajosa en el caso de métodos de separación electrocinéticas.

Mediante la expresión “separación electrocinética”, se pretende cubrir cualquier método que tiene como objetivo separar el conjunto o algunas de las especies contenidas en una mezcla, haciéndolas migrar en el seno de un medio bajo la acción de un campo eléctrico, tanto si el campo ejerce su acción motriz sobre los analitos de manera directa o indirecta, por ejemplo mediante un desplazamiento del medio en sí, tal como en la electrocromatografía, o mediante un desplazamiento de especies asociadas tales como micelas, en el caso de electrocromatografía micelar, o mediante cualquier combinación de acciones directas o indirectas. Se consideraran igualmente como un método de separación electrocinética según la invención cualquier método de separación en el que dicha acción del campo eléctrico se

combina con otra acción motriz de origen no eléctrico. En consecuencia, los métodos de electroforesis capilar o de electroforesis sobre “chips” se denominan como “electrocinéticos”.

De manera ventajosa, en particular en el caso de separaciones electrocinéticas, el líquido estará constituido por un electrolito.

Según la invención, mediante el término “electrolito” se entiende un líquido capaz de conducir los iones. En el caso más corriente, este medio es un medio acuoso tamponado, tal como los tampones a base de fosfato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), borato, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), histidina, lisina, etc. Se conocen por los expertos en la técnica numerosos ejemplos de tampones usables en electroforesis, y algunos de ellos se describen por ejemplo en Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: a laboratory manual”, Cold Spring Harbor Lab., Nueva York, 1989. Sin embargo, se puede usar cualquier tipo de electrolito en el ámbito de la invención, especialmente los disolventes hidroorgánicos, tales como, por ejemplo, mezclas de agua-acetonitrilo, agua-formamida o agua-urea, o los disolventes orgánicos polares tales como, también a título de ejemplo, N-metilformamida. Los electrolitos denominados “tampones de secuenciación”, constituidos por un tampón acuoso con pH alcalino que contiene una proporción notable de urea y/o de formamida parecen ser particularmente útiles en el ámbito de la invención.

El término “canal” representa cualquier volumen delimitado por una o varias paredes sólidas, que presentan por lo menos dos orificios y que se destinan a contener o a ser atravesado por un fluido.

La invención es particularmente ventajosa en los sistemas que comprenden por lo menos un canal del que por lo menos una dimensión es submilimétrica, tales como los sistemas de separación electrocinética en capilar, los sistemas microfluídicos, y más generalmente los sistemas para la separación de especies que usan microcanales.

Según una variante preferida, la invención tiene por objeto el uso como medio de separación líquido, una disolución que contiene polímeros que presentan de media por lo menos cuatro puntos de unión, preferentemente un número de puntos de unión comprendido entre 4 y 100, y más preferentemente un número de puntos de unión comprendido entre 4 y 40.

Mediante la expresión “punto de unión” se entiende un punto que une dos segmentos poliméricos de naturaleza química significativamente diferente, tal como en el caso de un copolímero de bloques, o bien un punto de reticulación entre un número de segmentos poliméricos, de naturaleza química idéntica o diferente, superior a dos, tal como en los polímeros en forma de peine. Como ejemplo, un polímero en forma de peine que comprende tres ramificaciones laterales tiene tres puntos de unión y siete segmentos poliméricos distintos. Igualmente, un copolímero de bloques secuenciado de tipo A-B-A-B comprende tres puntos de unión y cuatro segmentos poliméricos distintos.

Según la invención, se entiende mediante la expresión “segmento polimérico” o “segmento” un conjunto de monómeros enlazados entre sí de manera covalente y lineal, y que pertenece a un tipo dado de composición química, es decir que presenta globalmente propiedades fisicoquímicas específicas, en particular en lo que se refiere a la solvatación, la interacción con una pared sólida, una afinidad específica frente a algunas moléculas, o una combinación de estas propiedades.

Un ejemplo de segmento polimérico según la invención se da mediante la secuencia, en el seno de un copolímero, de monómeros todos idénticos (segmento homopolimérico), o un copolímero que no presenta correlación de composición significativa en distancias de más de algunos monómeros (segmento de tipo copolímero al azar). El polímero según la invención está compuesto de varios segmentos poliméricos “distintos”. Son distintos en el sentido de la invención, dos segmentos poliméricos que se diferencian en su naturaleza química y/o su topología, es decir la distribución espacial de los segmentos uno con relación a otro, por ejemplo cadena principal por oposición a ramificación lateral.

Según una primera variante preferida, los polímeros según la invención son de tipo copolímero de bloques irregular.

Para los fines de la invención, la expresión “copolímero de bloques” representa un copolímero que consiste en varios segmentos poliméricos enlazados juntos covalentemente, y que pertenecen a por lo menos dos tipos diferentes de composición química. De este modo, dos segmentos poliméricos adyacentes en el seno de un copolímero de bloques lineal tienen necesariamente una naturaleza química significativamente diferente. El copolímero de bloques se define por el hecho de que cada uno de los segmentos comprende un número suficiente de monómeros que tienen, dentro del medio de separación, propiedades fisicoquímicas, y en particular en términos de solvatación, que son comparables a aquellas de un homopolímero de la misma composición y del mismo tamaño. Esto contrasta con un copolímero al azar, en el que los diversos tipos de monómero se siguen entre sí en un orden esencialmente aleatorio, y dan a la cadena propiedades localmente globales que son diferentes de aquellas de los homopolímeros de cada una de las especies en consideración. El tamaño de los segmentos homopoliméricos requeridos para obtener esta naturaleza de bloques puede variar en función de los tipos de monómeros y del electrolito, pero es típicamente unas pocas decenas de átomos a lo largo de la cadena principal de dicho segmento. Se debe observar que es posible obtener un copolímero de bloques dentro del significado de la invención, en el que todos o algunos de los segmentos constan ellos mismos de un copolímero de tipo aleatorio, en tanto que sea posible distinguir dentro de dicho copolímero de bloques los segmentos poliméricos de tamaño y de diferencia en composición química que sean suficientes para dar lugar, de un segmento a otro, a una variación significativa en las propiedades fisicoquímicas, y en particular en la solvatación. En

particular, a fin de ser considerado como un “segmento polimérico” dentro del significado de la invención, una porción del polímero debe comprender a lo largo de su cadena principal por lo menos 10 átomos.

Según un modo preferido de esta variante, el polímero según la invención es del tipo de copolímero de bloques secuencial y regular.

Para los fines de la invención, la expresión “copolímero de bloques secuencial” significa un copolímero de bloques compuesto de segmentos poliméricos que pertenecen a por lo menos dos tipos químicos diferentes, enlazados juntos de manera lineal.

Según una segunda variante preferida, el polímero según la invención es del tipo polímero de peine irregular.

Para los fines de la invención, la expresión “polímero de peine” representa un polímero que tiene una cadena principal lineal de cierta naturaleza química, y segmentos poliméricos conocidos como “ramificaciones laterales”, de naturaleza química idéntica o diferente, que también son lineales pero significativamente más cortos que la cadena principal, y están unidos covalentemente a dicha cadena principal vía uno de sus extremos. En un polímero de peine, los segmentos poliméricos que constituyen la cadena principal, y aquellos que constituyen las ramificaciones laterales, difieren en su naturaleza topológica. Si los segmentos poliméricos que constituyen las ramificaciones laterales del polímero de peine y aquellos que constituyen su cadena principal también difieren en su naturaleza química, el polímero tiene simultáneamente la característica de un “polímero de peine” y la de un “copolímero de bloques”. Tales polímeros, que son conocidos como “copolímeros de peine”, constituyen un subconjunto de polímeros de peine y, por supuesto, se pueden usar en el contexto de la invención.

No es necesario decir que se puede prever el uso combinado de copolímero(s) de bloques y polímero(s) de peine en un medio según la invención.

El número de segmentos poliméricos de un tipo químico o topológico dado, presente en los polímeros según la invención, se entiende que es un valor medio, entendiéndose que es siempre una cuestión de una población de un gran número de moléculas que tienen en dichos números una cierta polimolecularidad.

En la presente descripción, y excepto que se mencione de otro modo, todas las masas moleculares, así como todos los promedios para todas las cadenas o todos los segmentos poliméricos, tal como la masa molecular media, o el número medio de átomos a lo largo de la cadena principal, el número de puntos de unión, o también el número medio de injertos en el caso de un polímero de peine, se entiende que son promedios másicos dentro del significado habitual de la física de polímeros.

Todos los polímeros en consideración según la invención, a saber los copolímeros de bloques o los polímeros de peine, tienen la característica ventajosa de ser de tipo irregular, es decir, que todos los segmentos de por lo menos un tipo de naturaleza química o topológica que forman parte de su composición tienen una polimolecularidad de por lo menos 1,5, y preferentemente superior a 1,8.

La polimolecularidad de un tipo de segmento polimérico que forma parte de la composición de un polímero según la invención se entiende que es el valor medio de la masa molecular de dichos segmentos, tomado a lo largo de todos los segmentos de este tipo que forman parte de la composición de dicho polímero (promedio másico dentro del significado habitual de la fisicoquímica de polímeros).

Una variante preferida de un polímero de peine irregular consiste en presentar una polimolecularidad de las ramificaciones laterales de por lo menos 1,5, y preferentemente superior a 1,8.

Otra variante preferida de un polímero de peine irregular consiste en presentar una polimolecularidad de los segmentos de la cadena principal, incluidos entre dos ramificaciones laterales, de por lo menos 1,5, y preferentemente superior a 1,8.

En otra realización preferida, los segmentos de cada uno de los tipos de naturaleza química o topológica, que forman parte de la composición de los polímeros según la invención, tienen una polimolecularidad de por lo menos 1,5, y preferentemente superior a 1,8.

Según un modo de realización preferido, la polimolecularidad de los polímeros según la invención es superior a 1,5, y preferentemente superior a 1,8.

La longitud y número de los diferentes segmentos poliméricos presentes en los polímeros de peine o en los copolímeros usados en los medios según la invención, así como su naturaleza química, pueden variar significativamente en el contexto de la invención, y las propiedades de dichos medios pueden variar de este modo ampliamente dependiendo de la aplicación deseada, como se mostrará más específicamente en la descripción de los ejemplos de implementación.

Los polímeros según la invención tienen una masa molecular (promedio másico) superior a 50.000, preferentemente superior a 300.000, más preferentemente superior a 1.000.000, y aún mejor superior a 3.000.000.

Según un modo de realización preferido, dichos polímeros según la invención muestran, dentro del medio de separación, una afinidad significativa por las paredes de dicho canal.

Un modo particularmente preferido consiste en presentar, dentro del polímero según la invención, por lo menos un tipo de segmento polimérico que muestra, dentro del medio de separación, una afinidad específica por la pared, y por lo menos un tipo de segmento polimérico que muestra en dicho medio una menor afinidad, o ninguna, por la pared.

La presencia de segmentos poliméricos de este tipo permite al medio según la invención reducir la adsorción de especies sobre las paredes del canal y/o la electroósmosis.

Específicamente, un problema para todos los métodos que implican especies dentro de canales es la adsorción de dichas especies sobre las paredes de dichos canales. Este problema está particularmente exacerbado en el caso de canales pequeños y macromoléculas biológicas, siendo estas últimas a menudo anfífilas. Este fenómeno de adsorción sobre las paredes, de especies contenidas en la muestra o del fluido, tiene como consecuencia el retraso de ciertos analitos y la creación de una dispersión adicional, y por lo tanto una pérdida de resolución, en el caso de métodos analíticos. Esta adsorción también puede dar lugar a una contaminación de las paredes del canal, lo que puede afectar a los fluidos que se desean introducir después en dicho canal.

Otra limitación, que se refiere más particularmente a métodos de separación electrocinéticos, es la electroósmosis, un movimiento como un todo del medio de separación debido a la presencia de cargas en las paredes del capilar o del canal. Puesto que este movimiento es a menudo variable a lo largo del tiempo y no uniforme, es perjudicial para la reproducibilidad de las medidas y para la resolución. Está provocado por las cargas que pueden estar presentes sobre la superficie del capilar debido a su estructura química, pero también se puede crear o aumentar mediante la adsorción, sobre la pared, de especies cargadas inicialmente contenidas en las muestras a separar, y en particular proteínas.

Los polímeros según la invención del tipo que contiene segmentos poliméricos de por lo menos un tipo que muestra, dentro del medio de separación, afinidad específica por la pared, tienen, a causa de la presencia de una pluralidad de segmentos de este tipo, y a causa del peso molecular medio relativamente elevado de estos segmentos, una elevada energía de adsorción, y de este modo reducen la electroósmosis de una manera duradera. Por otra parte, puesto que los polímeros según la invención también comprenden en su estructura segmentos poliméricos que muestran en dicho medio poca o ninguna afinidad por la pared, evitan una naturaleza excesivamente hidrófoba que es perjudicial para la resolución, y pueden repeler de forma más eficaz los analitos de las paredes.

Típicamente, los tipos de segmentos poliméricos que no muestran afinidad por la pared consisten en polímeros que muestran buena solubilidad en el medio de separación. Sin embargo, puede haber polímeros que son solubles en dicho medio, pero que no obstante muestran allí una afinidad particular por una pared. Cuando el medio de separación es una disolución acuosa, los segmentos sin afinidad por la pared son típicamente segmentos muy hidrófilos. Por otro lado, los segmentos con afinidad son relativamente no hidrófilos, o incluso hidrófobos. No es necesario decir que se pueden usar otros tipos más específicos de afinidad, dependiendo de la naturaleza de la pared y la del medio de separación.

Los copolímeros óptimos para realizar la invención son especialmente aquellos en los que todos los segmentos que tienen una afinidad específica por la pared representan entre el 2% y el 80% en peso, y preferentemente entre 5% y 30% de la masa molar media total de dichos copolímeros, o entre 3% y 85%, y preferentemente entre 5% y 50%, de la composición total de los copolímeros, en términos de número de moles de monómeros.

Otra realización preferida, que es particularmente ventajosa cuando los analitos son macromoléculas biológicas, consiste en el uso de polímeros según la invención que también muestran afinidad específica por uno o más analitos.

Esta afinidad se puede obtener incorporando, en la estructura de dichos polímeros, segmentos poliméricos capaces de mostrar una afinidad específica por ciertos analitos. Tales segmentos poliméricos pueden consistir, por ejemplo, y de manera no exhaustiva, en una secuencia predeterminada de diferentes monómeros, tal como un polinucleótido o un polipéptido. Esta afinidad también se puede obtener combinando con el polímero según la invención una proteína natural o desnaturalizada, una fracción proteínica o un complejo proteínico, o también una función ácida o básica, y/o una función de tipo ácido de Lewis o base de Lewis.

Como ilustraciones de las diversas estructuras que se pueden adoptar mediante el copolímero según la invención, se hace mención más particularmente de aquellas en las que todo o parte de dicho copolímero está:

- en forma de copolímeros de bloques secuenciales irregulares. En este caso, una variante preferida consiste en alternar, a lo largo del polímero, segmentos con una afinidad específica por la pared, y segmentos con una afinidad reducida, o con ninguna afinidad, por la pared. También se puede prever alternar, a lo largo del polímero, segmentos que muestren una afinidad específica por ciertos analitos, y segmentos que muestren una afinidad reducida, o ninguna, por dichos analitos;
- en forma de copolímeros de peine irregulares. En este caso, una variante preferida se caracteriza porque dichos polímeros están en forma de polímeros de peine cuya cadena principal consiste en varios segmentos poliméricos que muestran afinidad específica por la pared, y cuyas ramificaciones laterales consisten en segmentos poliméricos que muestran una afinidad reducida, o ninguna, por la pared, o polímeros de peine

cuyas ramificaciones laterales consisten en segmentos poliméricos que muestran afinidad específica por la pared, y cuya cadena principal consiste en segmentos poliméricos que muestran una afinidad reducida, o ninguna, por la pared. Estos polímeros también pueden estar en forma de polímeros de peine, algunas de cuyas ramificaciones laterales consisten en segmentos poliméricos que muestran afinidad específica por ciertos analitos, y cuya cadena principal consiste en segmentos poliméricos que muestran una afinidad reducida, o ninguna, por estos analitos.

No es necesario decir que los sistemas en los que se combinan juntos varios tipos de variantes preferidas, ya sea combinando segmentos poliméricos de más de dos tipos diferentes, o en forma de una mezcla de diferentes copolímeros, también caen dentro del alcance de la invención. De este modo, es posible, por ejemplo, combinar, dentro de un copolímero según la invención, segmentos poliméricos que muestren afinidad por la pared, segmentos poliméricos o grupos que muestren afinidad específica por ciertos analitos, y segmentos poliméricos que no muestren afinidad específica ni por la pared ni por los analitos. También es posible, nuevamente a título de ejemplo, combinar, en un medio según la invención, copolímeros de bloques que comprenden segmentos poliméricos que muestren afinidad por la pared, y segmentos poliméricos que no muestren afinidad específica ni por las paredes ni por los analitos, y polímeros que comprenden segmentos poliméricos o grupos que muestren afinidad específica por ciertos analitos, y segmentos poliméricos que no muestren afinidad específica ni por las paredes ni por los analitos.

Según un modo preferido de la invención, todos los segmentos poliméricos de un tipo dado de naturaleza química o topológica tienen, de media, a lo largo de su cadena principal, un número de átomos superior a 75, y más preferentemente superior a 210, o tienen una masa molecular superior a 1500, y preferentemente superior a 4.500.

Según un modo de realización incluso más preferido, los diversos tipos de segmentos tienen, a lo largo de su cadena principal, un número medio de átomos superior a 75, y más preferentemente superior a 210, o tienen una masa molecular superior a 1500, y preferentemente superior a 4500.

Según un modo de realización preferido, el medio de separación consiste en un líquido en el que se disuelve por lo menos un polímero según la invención hasta una proporción de 0,1% a 20%, y preferentemente de 1% a 6% en peso.

Es particularmente interesante para implementar la invención usar copolímeros de bloques u homopolímeros de peine en los que por lo menos uno de los tipos de segmentos consiste en un polímero escogido de poliéteres, poliésteres, por ejemplo poli(ácido glicólico), homopolímeros y copolímeros al azar solubles del tipo polioxialquilénicos, por ejemplo polioxipropileno, polioxibutileno o polioxietileno, polisacáridos, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poliuretanos, poliamidas, polisulfonamidas, polisulfóxidos, polioxazolina, poli(sulfonato de estireno), y acrilamida sustituida o no sustituida, metacrilamida y polímeros y copolímeros de alilo.

Como representativos de los tipos de segmentos poliméricos que muestran, en un medio de separación acuoso, poca o ninguna afinidad por las paredes, se hacen mención más particularmente de poli(acrilamida y poli(ácido acrílico), poli(acrililaminopropanol), polímeros y copolímeros acrílicos y alifáticos solubles en agua, dextrano, polietilenglicol, polisacáridos y diversos derivados de celulosa tales como hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o metilcelulosa, poli(alcohol vinílico), poliuretanos, poliamidas, polisulfonamidas, polisulfóxidos, polioxazolina, poli(sulfonato de estireno), y también polímeros que tienen grupos hidroxilo, y todos los copolímeros al azar de los derivados mencionados anteriormente.

No es necesario decir que se pueden usar, según la invención, otros segmentos poliméricos que son solubles en el medio de separación, en función de la naturaleza de dicho fluido y de la de las paredes del canal, de la aplicación particular y de la facilidad de introducirlos en un polímero de bloques de la estructura deseada.

Como representativos de los segmentos poliméricos, que pueden ser o no solubles en disolventes acuosos, y que pueden mostrar allí una afinidad particular por las paredes, se hace mención de dimetilacrilamida, acrilamidas N-sustituidas con funciones alquílicas, acrilamidas N,N-disustituidas con funciones alquílicas, alilglicidiléter, copolímeros de los derivados acrílicos anteriores entre sí o con otros derivados acrílicos, alcanos, fluoroderivados, silanos, fluorosilanos, poli(alcohol vinílico), polímeros y copolímeros que implican derivados de oxazolina, y también en general polímeros que tienen una combinación de enlaces carbono-carbono, funciones éter-óxido y funciones epóxido, y también todos los copolímeros al azar de estos compuestos.

Se pueden escoger muchos tipos de segmentos poliméricos para construir los segmentos poliméricos que constituyen un polímero según la invención, como función del electrolito previsto, a partir de todos los tipos de polímeros conocidos por los expertos en la técnica, en particular a partir de aquellos solubles en medio acuoso. De este modo, se puede hacer referencia al libro "Polymer Handbook" Brandrup & Immergut, John Wiley, Nueva York.

Los polímeros según la invención pueden ser naturales o sintéticos. Según una variante preferida para la variedad y control que permite con relación a la microestructura, los polímeros según la invención son polímeros sintéticos.

Son más particularmente adecuados para la invención:

- los copolímeros del tipo copolímero de peine, cuya cadena principal es del tipo de dextrano, acrilamida, ácido acrílico, acrililaminoetanol o (N,N)-dimetilacrilamida, y sobre la cual se injertan segmentos laterales

de tipo acrilamida, acrilamida sustituida o (N,N)-dimetilacrilamida (DMA), o del tipo de copolímero de DMA/alilglicidiléter (AGE), o como alternativa de homopolímero o copolímero de oxazolina o de derivados de oxazolina;

- 5 - los copolímeros no termosensibles del tipo de copolímero de bloques secuencial irregular que tienen a lo largo de su cadena principal, una alternancia de segmentos de tipo polioxietilénico y de segmentos de tipo polioxipropilénico,

10 o una alternancia de segmentos de tipo polioxietilénico y de segmentos de tipo polioxibutilénico, o más generalmente una alternancia de segmentos de polietileno y de segmentos de tipo poliéter que son apreciablemente más hidrófobos que el polioxietileno;

- 15 - los copolímeros del tipo de copolímero de bloques secuencial irregular que tienen, a lo largo de su cadena principal, una alternancia de segmentos de tipo acrilamida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol o dimetilacrilamida, por un lado, y segmentos de tipo (N,N)-dimetilacrilamida (DMA), o de tipo copolímero de DMA y de alilglicidiléter (AGE), o también de homopolímero

o copolímero de oxazolina o de derivados de oxazolina;

- 20 - los polímeros del tipo polímero de peine irregular, cuya cadena principal es de tipo de polímero de agarosa, de acrilamida, de acrilamida sustituida, de ácido acrílico, de acrilolaminoetanol, de dimetilacrilamida (DMA), o de alilglicidiléter (AGE), o de tipo copolímero al azar de DMA/AGE, de tipo oxazolina y derivado de oxazolina, de dextrano, de metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, de celulosa modificada, de polisacárido o de óxido de éter, y sobre la cual se injertan segmentos laterales de tipo de polímero de agarosa, de acrilamida, de acrilamida sustituida, de ácido acrílico, de acrilolaminoetanol, de dimetilacrilamida (DMA), o de alilglicidiléter (AGE), o de tipo de copolímero al azar de DMA/AGE, de tipo de oxazolina y derivado de oxazolina, de dextrano, de metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, de celulosa modificada, de polisacárido o de óxido de éter;

- 30 - los copolímeros del tipo copolímero de peine irregular, cuya cadena principal es del tipo de polímero de acrilamida, de acrilamida sustituida, de ácido acrílico, de acrilolaminoetanol, de dimetilacrilamida (DMA), o de alilglicidiléter (AGE), de tipo copolímero al azar de DMA/AGE, del tipo oxazolina y derivado de oxazolina, de dextrano, de agarosa, de metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, de celulosa modificada, de polisacárido o de óxido de éter, y tiene segmentos laterales hidrófobos de cadena corta, tales como cadenas alquílicas, derivados aromáticos, fluoroalquilos, silanos o fluorosilanos.

Se debe observar también que, en la mayoría de las aplicaciones, es preferible usar un polímero según la invención que sea esencialmente neutro. Sin embargo, puede ser útil para ciertas aplicaciones, y en particular para evitar la adsorción de especies que contienen tanto cargas como porciones hidrófobas, seleccionar un polímero según la invención que esté deliberadamente cargado, preferentemente de carga opuesta a la de dichas especies.

Con relación a la preparación de los copolímeros usados según la invención, se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica convencional de polimerización o policondensación. La elección del método de preparación se realiza generalmente teniendo en cuenta la estructura deseada para el copolímero, es decir estructura de peine o lineal, y la naturaleza química de los diversos bloques de los que está formado.

Como representativos de estas variantes de preparación, se puede citar más particularmente procedimientos según los cuales dichos copolímeros se obtienen mediante:

- 50 - policondensación, polimerización o copolimerización iónica

o mediante radicales libres de monómeros idénticos o diferentes, de macromonómeros idénticos o diferentes, o de una mezcla de monómeros y macromonómeros idénticos o diferentes, o

- 55 - injertando varios segmentos poliméricos sobre una cadena principal polimérica lineal o ramificada de naturaleza química idéntica o diferente.

Preferentemente, todos o algunos de los copolímeros usados según la invención se obtienen mediante

- 60 - a: copolimerización de monómeros y macromonómeros que comprenden una función reactiva en por lo menos uno de sus extremos, o

- b: copolimerización de macromonómeros que comprenden por lo menos una función reactiva en su estructura.

65 Para los fines de la invención, la expresión “función reactiva” significa un grupo que permite que la molécula que tiene este grupo se incorpore en la macromolécula durante la reacción de copolimerización sin interrumpir dicha copolimerización.

Con la ayuda de las reglas y modos preferidos enunciados anteriormente, la persona experta en la técnica es capaz de preparar los copolímeros según la invención, adaptando la estructura, la naturaleza y el modo de preparación de dichos polímeros en función de las propiedades de separación deseadas para una aplicación u otra.

5 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento para separar, analizar y/o identificar especies contenidas en una muestra, caracterizado por realizar las siguientes etapas:

- a/ rellenar el canal de un dispositivo de separación con un medio de separación según la invención,
- 10 b/ introducir dicha muestra que contiene dicha especie en un extremo de dicho canal,
- c/ aplicar un campo externo destinado a mover ciertas especies contenidas en la muestra, especialmente un campo eléctrico, y
- 15 d/ recuperar o detectar el paso de dicha especie en un punto a lo largo del canal que es diferente del punto de introducción de la muestra.

En una variante preferida, no es necesario cambiar la temperatura entre la etapa de llenado del capilar y la etapa del análisis.

20 Dependiendo de las aplicaciones particulares, el medio de separación puede contener, además de los polímeros según la invención, otros elementos, y en particular componentes que interactúan con las especies o con las paredes. Muchos elementos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

25 En el presente caso, es posible combinar, en el medio de separación, polímeros del tipo copolímero de bloques irregular, y otros polímeros capaces de interactuar con los analitos bien mediante interacción estérica o bien mediante afinidad, a fin de mejorar los rendimientos en comparación con los obtenidos con el polímero según la invención usado solo. En este caso, los polímeros que se prefieren más particularmente según la invención son aquellos que tienen una fracción másica de segmentos poliméricos que muestran una afinidad específica por la pared que es mayor que cuando estos polímeros se usan solos. Esta fracción puede estar comprendida entre 20% y 80%.

30 La presente invención tiene igualmente por objeto el uso de un medio de separación según la invención para separar, purificar, filtrar o analizar especies escogidas de especies moleculares o macromoleculares, y en particular macromoléculas biológicas, por ejemplo ácidos nucleicos (ADN, ARN, oligonucleótidos), análogos de ácidos nucleicos obtenidos mediante síntesis o modificación química, proteínas, polipéptidos, glicopéptidos y polisacáridos, moléculas orgánicas, macromoléculas sintéticas o partículas tales como partículas minerales, látex, células u orgánulos.

40 En el caso de los métodos de análisis mediante electroforesis, la invención es particularmente útil para la secuenciación de ADN, para la que permite obtener anchuras de banda mínimas. También es particularmente favorable para separar proteínas, proteoglicanos, o células, para los cuales los problemas de adsorción sobre la pared son un inconveniente particular y particularmente difícil de resolver.

45 Ventajosamente, el medio reivindicado se puede usar en un canal del cual por lo menos una dimensión es de tamaño submilimétrica.

50 Con respecto a los aparatos, el medio reivindicado es particularmente ventajoso para sistemas microfluídicos, puesto que permite, por medio de una elección óptima de los diversos tipos de bloques en los polímeros, combinar bloques que muestren una buena afinidad por la superficie del canal, a fin de obtener un tratamiento duradero, y bloques que muestren buena repulsión por las especies a separar, independientemente de dichas especies y de la naturaleza química de dicho canal.

55 Los medios según la invención y los métodos de separación que usan estos medios son particularmente ventajosos para aplicaciones de separación electroforética y de diagnóstico, para tipaje génico, y detección sistemática de gran rendimiento, para control de calidad, o para detectar la presencia de organismos genéticamente modificados en un producto.

60 En realidad, se encuentra que los polímeros de los que está compuesto el medio de separación bajo consideración en el contexto de la presente invención son ventajosos en varios aspectos.

65 En primer lugar, su capacidad para presentar una naturaleza de “polímero de bloques” les permiten combinar propiedades que pertenecen a polímeros de diferente naturaleza química, y que no siempre se pueden unir en un homopolímero o en un copolímero al azar. De este modo, hacen posible adaptar de forma más flexible la naturaleza química del medio de separación, en primer lugar como una función de la especie a separar, y en segundo lugar como función de la naturaleza química de los canales en los que se realiza la separación. De este modo, son particularmente ventajosos tanto en aplicaciones que usan canales que consisten en polímeros o elastómeros tales como PDMS (polidimetilsiloxano), PMMA (poli(metacrilato de metilo)), policarbonato, polietileno, polipropileno, poli(tereftalato de etileno) o poliimida, o que consisten en materiales minerales tales como vidrio, materiales cerámicos, silicio,

acero inoxidable o titanio, y en aplicaciones más tradicionales que usan canales cuyas paredes están hechas de sílice pirolizada.

Comparados con los copolímeros de bloques de la técnica anterior, los polímeros según la invención también muestran un rendimiento superior en términos de resolución, lo que está asociado muy probablemente con su naturaleza irregular, es decir, la polimolecularidad de los segmentos poliméricos que forman parte de los polímeros según la invención. Esta característica es particularmente sorprendente, puesto que el conjunto de copolímeros de bloques usado en la técnica anterior implica deliberadamente copolímeros que contienen segmentos espaciados regularmente, y/o que tienen una longitud seleccionada y esencialmente uniforme (es decir, una baja polimolecularidad). Esta polimolecularidad de los segmentos, en los polímeros según la invención, también muestra ventajas en términos de coste y flexibilidad en la formulación, puesto que los polímeros que comprenden tales segmentos polimoleculares no sólo son más eficaces, sino también son más fáciles de preparar. En particular, se pueden preparar con masas moleculares elevadas.

En las aplicaciones para las que se desea una reducción de la electroósmosis o interacción de especies con la pared, los polímeros según la invención tienen, a causa de la presencia en su estructura de un gran número de segmentos poliméricos que muestran una afinidad significativa por la pared, una elevada energía de adsorción, y de este modo pueden reducir la electroósmosis y la adsorción de especies de manera duradera.

Finalmente, también es muy probable que la combinación de una cadena principal lineal y de una pluralidad de puntos de unión dé a los medios de separación según la invención algunas de las propiedades de geles a escala local, lo que es beneficioso en términos de eficacia de separación, mientras que al mismo tiempo conservan a gran escala, y en particular con relación a las propiedades de flujo, propiedades que son comparables con aquellas de los polímeros lineales.

Las figuras y ejemplos dados a continuación se presentan como ilustraciones no limitantes de la presente invención.

Figuras

Figura 1: Ejemplo de configuración esquemática 1a: de un copolímero de bloques secuencial irregular; 1b: de un polímero de peine irregular; 1c: de un copolímero de peine irregular. Las líneas en negrita corresponden a un tipo de naturaleza química, y las líneas finas a otro tipo de naturaleza química.

Figura 2: Electroforegrama de control que representa la separación de un selector de tamaños de 50-500 pb de Pharmacia Biotech, obtenido a 50°C en una máquina ABI 310 (Perkin Elmer), usando un capilar no tratado y, como medio de separación, un tampón de 100 mM de Na TAPS, 2 mM de EDTA, 7 M de urea, en el que se disuelve 5% de un homopolímero comercial del tipo poli(acrilamida) (masa molecular 700000-1000000); los tamaños de ADN que corresponden a los diversos picos están indicados en el diagrama como número de bases.

Figura 3: Electroforegrama de control que representa una separación en condiciones idénticas a las de la figura 2, con un medio de separación comercial "POP6" de PE Biosystems. Los tamaños de ADN que corresponden a los diversos picos se indican en el diagrama como número de bases.

Figura 4: Electroforegrama que representa una separación en condiciones idénticas a las de la figura 2, con un medio de separación de 100 mM de Na TAPS, 2 mM de EDTA, 7 M de urea, en el que se disuelve 5% de un copolímero de peine de P(AM-PDMA)-2 descrito en el Ejemplo 2. Los tamaños de ADN que corresponden a los diversos picos se indican en el diagrama como número de bases.

Figura 5: Comparación de la resolución calculada entre picos que difieren de una base a 500 bases, obtenido a 50°C en una máquina ABI 310 (Perkin-Elmer), usando como medio de separación:

- a: un medio de separación comercial "Pop6" de PE Biosystems,
- b: un tampón de 50 mM de Na TAPS, 2 mM de EDTA, 7 M de urea, en el que se disuelve 5% de acrilamida lineal (masa molecular 700000-1000000),
- c: el mismo tampón, en el que se disuelve 5% de copolímero de bloques irregular según la invención p(AM-PDMA)-2, descrito en el Ejemplo 2.

Figura 6: Viscosidad de disoluciones a 3% de acrilamida lineal (LPA) y de los copolímeros según la invención poli(AM-PDMA)-1, preparado según el Ejemplo 2, poli(AM-PDMA)-2, preparado según el Ejemplo 4, y poli(AM-PDMA)-3, preparado según el Ejemplo 5.

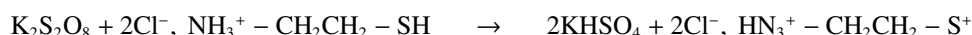
Figura 7: Resoluciones obtenidas durante la separación electroforética de ADN, en disoluciones de acrilamida lineal (LPA), de polímero comercial (POP5), y de los copolímeros según la invención poli(AM-PDMA)-1, preparado según el Ejemplo 2, poli(AM-PDMA)-2, preparado según el Ejemplo 4, y poli(AM-PDMA)-3, preparado según el Ejemplo 5, A 3 y 5%.

Ejemplo 1

Preparación de un macromonomero de PDMA funcionalizado, con una masa molecular en la región de 10000, para la preparación de copolímeros según la invención

1) Polimerización de PDMA

La polimerización mediante radicales libres de N,N-dimetilacrilamida (DMA) se realiza en agua pura. El iniciador es una par redox del que el agente oxidante es persulfato potásico $K_2S_2O_8$ (KPS), y el agente reductor es aminoetanotiol AET.HCl. La reacción de iniciación es:



AET.HCl también actúa como un agente de transferencia, lo que permite controlar la longitud de la cadena.

Procedimiento

Se colocan 0,18 moles de DMA y 200 ml de agua en un matraz de tres bocas de 500 ml, en el que se monta un condensador, y que está equipado con un dispositivo de entrada de nitrógeno. La mezcla se agita entonces y se calienta hasta 29°C con un baño de agua. Se comienza el rociado con nitrógeno. Después de 45 minutos, se añaden 0,61 g de AET.HCl (0,0054 moles) predisoluto en 20 ml de agua, seguido de la adición de 0,0018 moles de persulfato potásico (KPS) disuelto en una cantidad mínima de agua. La mezcla se agita durante 3 horas. Después, la disolución se concentra y se liofiliza.

Para aislar el polímero, se realiza una precipitación según el siguiente procedimiento:

El sólido obtenido se redisolvió en 100 ml de metanol. El hidrócloruro presente se neutralizó añadiendo 0,0054 moles de KOH (es decir, 0,30 g disueltos en alrededor de 25 ml de metanol), incorporado gota a gota en la disolución. La sal formada, KCl, precipita y se extrae mediante filtración. El filtrado así recuperado se concentra y después se vierte gota a gota en 4 litros de éter. El polímero precipitado se recupera mediante filtración a través de un embudo de sinterización nº 4. El sólido se seca entonces a vacío con una bomba de aletas. El rendimiento másico es alrededor de 50%.

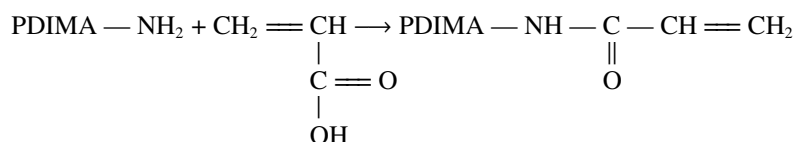
El protocolo anterior conduce a un aminopolímero conocido como “PDMA”, y corresponde a relaciones de iniciador/monómero $R_o = 0,03$ y $A_o = 0,01$, en los que:

$$R_o = [R-SH]/[NIPAM] \text{ y } A_o = [KPS]/[NIPAM]$$

2) Modificación del amino-PDMA

Las macromoléculas de PNIPAM sintetizadas contienen funciones amina en los extremos de las cadenas, originándose estas cadenas a partir del iniciador aminoetanotiol AET.HCl.

Mediante la reacción de la función amina con ácido acrílico, se une un doble enlace vinílico al extremo de la cadena según el siguiente esquema de reacción:



Procedimiento

Se colocaron 50 ml de cloruro de metileno, 1,5 g de ácido acrílico (0,021 moles), 9 g de PDMA y 4,3 g de diciclohexilcarbodiimida (DCCI) (0,021 moles), en un vaso de precipitados de 100 ml.

El medio de reacción se agitó durante una hora. Puesto que el ácido acrílico está en un gran exceso con relación al PDMA (la cantidad de ácido acrílico es alrededor de veinte veces la del PDMA), todas las funciones amino se han modificado. La mezcla se filtra entonces a través de un embudo de sinterización n° 4, para eliminar la dicitclohexilurea precipitada, el subproducto resultante de la conversión de la DCCI. La purificación se realiza mediante precipitación en éter.

De este modo, se obtiene un macromonomero PDMA-1, que tiene una función alílica en el extremo de la cadena, con un rendimiento máximo de alrededor de 70%.

La masa molecular media y la polimolecularidad de los macromonómeros así preparados, medida mediante SEC (cromatografía de exclusión estérica), son del orden de 15000 y 2, respectivamente.

Ejemplo 2

Preparación de un copolímero de P(AM-PDMA)-1 con una cadena principal de acrilamida e injertos de PDMA, de masa molecular 1500 kdaltons

La copolimerización del amino-PDMA (0,4 g) y de acrilamida (2,8 g) se realiza durante 4 horas en 50 ml de agua a temperatura ambiente, mientras se desgasifica vigorosamente con argón. El iniciador usado es el par redox de persulfato de amonio ((NH₄)₂S₂O₈) [0,075% en moles de la cantidad de monómeros]-metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) (0,0225% en moles de la cantidad de monómeros). El copolímero resultante se purifica mediante precipitación en acetona, y se seca a vacío. Su masa molecular es de 1500 kdaltons, y su polimolecularidad Mw/Mn es alrededor de 2. El grado de incorporación de macromonómero, medido mediante RMN de protón, es del orden de 6%, lo que corresponde a un número medio de ramificaciones laterales sobre la cadena principal del orden de 6.

A causa del método de polimerización mediante radicales libres usado, los macromonómeros que constituyen las cadenas laterales se incorporan en la cadena polimérica en posiciones al azar, determinadas mediante probabilidad por las colisiones entre moléculas (distribución al azar). Este método de polimerización conduce a una distribución de las masas moleculares de los segmentos poliméricos de la cadena principal entre dos ramificaciones laterales de forma aproximadamente exponencial, y de este modo conduce a polimolecularidades de dichos segmentos poliméricos de la cadena principal que son muy superiores a 1,8.

Ejemplo 3

Propiedades de separación obtenidas para ADN monocatenario (seleccionador de tamaños de 50-500 pb, Pharmacia Biotech) a 50°C en una máquina ABI 310 (Perkin-Elmer), en un tampón de 100 mM de Na TAPS, 2 mM de EDTA, 7 M de urea, en diversos medios de separación. Se observa visualmente (Fig. 4), y más cuantitativamente por medio de las medidas de resolución (Fig. 5), que el medio de separación según la invención P(AM-PDMA)-2 mejora la resolución con relación a la misma cadena principal polimérica que no tiene ramificaciones laterales (PAM, Figs. 2 y 5), pero también con relación a un producto comercial a base de PDMA lineal (POP6, Figs. 3 y 5). También se redujo el tiempo de separación, lo que es una ventaja adicional de los medios según la invención. De este modo, parece, sorprendente pero beneficiosamente, que este polímero según la invención, que comprende una gran fracción de acrilamida, y una fracción más pequeña de PDMA, tiene, a causa de la disposición particular de dichas fracciones, y de la presencia de puntos de unión que caracterizan la invención, propiedades que son superiores a aquellas de cada uno de dichos componentes en forma homopolimérica.

Ejemplo 4

Preparación de un copolímero P(AM-PDMA)-2 que contiene una cadena principal acrilamídica e injertos de PDMA, de masa molecular de alrededor de 3000 kdaltons

La preparación es idéntica a la descrita en el ejemplo 2, excepto para la concentración de (NH₄)₂S₂O₈) [0,1% en moles en lugar de 0,075% en moles de la cantidad de monómeros] y de (Na₂S₂O₅) (0,015% en moles en lugar de 0,0225% en moles de la cantidad de monómeros). La viscosidad, presentada en la figura 6, hace posible evaluar la masa molecular, de alrededor de 3000 kdaltons, partiendo de la del P(AM-PDMA)-1, usando una dependencia cúbica de la viscosidad en función de la masa molecular para polímeros enredados.

Ejemplo 5

Preparación de un copolímero P(AM-PDMA)-3 que tiene injertos de PDMA, de masa molecular de alrededor de 30000

En una primera etapa, el macromonómero de masa molecular 30000 se prepara como se describe en el ejemplo 1, con la excepción de que la relación Ro, que se ajusta a 0,015 en lugar de 0,03. Este macromonómero se polimeriza entonces con acrilamida, según el protocolo descrito en el ejemplo 4.

Ejemplo 6

Medida de la viscosidad de disoluciones al 3% obtenidas con los polímeros descritos en los ejemplos 2, 4 y 5, y también con un homopolímero de acrilamida lineal. En este ejemplo, cada uno de los polímeros se introdujo a una tasa de 3 g/100 ml en agua purificada (MilliQ). La viscosidad de cada una de las disoluciones correspondientes se midió en un reómetro de plato cónico Brookfield DV3 operado con un programa de ordenador Rheocalc (Sodexim, Muizon, F). La velocidad de cizallamiento seleccionada es 10 (1/s) para un gradiente de temperatura de 1°C por minuto. En la figura 6 se observa que los copolímeros según la invención no tienen naturaleza termosensible (su viscosidad muestra una disminución pequeña y uniforme con la temperatura), y una viscosidad moderada. También se observa que la estructura y propiedades de los polímeros se pueden variar controlando las condiciones de polimerización.

Ejemplo 7

Separaciones electroforéticas de fragmentos de ADN monocatenario, en medios de separación según la invención, basadas en copolímeros descritos en los ejemplos 2, 4 y 5, y, con fines comparativos, en poliacrilamida lineal (LPA) y en el medio de separación comercial "POP5" (Applied Biosystems). Las condiciones de separación son idénticas a aquellas del ejemplo 4, con la excepción de la muestra, un "seleccionador de tamaños" de 100 a 1500 bases (Bio-Ventures, USA). En la figura 7 se observa que, en el intervalo que es más ventajoso para la secuenciación (tamaño de fragmentos de 600 a 1000), los medios basados en copolímeros según la invención, en particular aquellos que corresponden a una concentración másica en el medio de separación de 3%, conducen a una resolución que es notablemente superior a la obtenida con los polímeros de la técnica anterior. Considerando que una resolución del orden de 0,3 a 0,5 es suficiente para secuenciar ADN hasta una base, los medios según la invención deberían permitir la lectura de longitudes mayores que 800 bases.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Medio líquido para analizar, purificar o separar especies en el seno de un canal, y que comprende por lo menos un polímero compuesto de varios segmentos poliméricos, siendo este medio no termosensible, y siendo dicho polímero de tipo copolímero de bloques irregular o polímero de peine irregular, que presenta por lo menos de media tres puntos de unión establecidos entre segmentos poliméricos de naturaleza química o topológica diferente, que presenta una masa molecular media superior a 50.000, y **caracterizado** porque la totalidad de los segmentos de por lo menos un tipo de naturaleza química o topológica que entra en su composición presenta una polimolecularidad de por lo menos 1,5.

2. Medio según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los segmentos de cada uno de los tipos de naturaleza química o topológica que entran en la composición del polímero presentan una polimolecularidad de por lo menos 1,5.

3. Medio según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque dicha polimolecularidad es superior a 1,8.

4. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dicho polímero tiene una masa molecular media superior a 300.000.

5. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque dicho polímero tiene una afinidad específica por las paredes de dicho canal.

6. Medio según la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicho polímero tiene por lo menos un tipo de segmentos poliméricos que presentan en el seno del medio de separación una afinidad específica por la pared, y por lo menos un tipo de segmento polimérico que tiene en dicho medio una menor afinidad o ninguna por la pared.

7. Medio según la reivindicación 5 ó 6, **caracterizado** porque la totalidad de los segmentos que tienen una afinidad específica por la pared representa entre 2 y 80% de masa de la masa molar total media de dicho polímero.

8. Medio según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero tiene una afinidad específica por uno o más analitos.

9. Medio según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el polímero es portador de nucleótidos o polipéptidos de secuencia determinada.

10. Medio según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el polímero se asocia con una proteína, una fracción de proteína, un complejo proteico, y/o una función ácida o básica.

11. Medio según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la totalidad de los segmentos poliméricos de por lo menos un tipo de naturaleza química o topológica presentan de media un número de átomos superior a 75, preferentemente superior a 210, o tienen una masa molecular superior a 1.500, y preferentemente superior a 4.500.

12. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los diferentes tipos de segmentos poliméricos que componen dicho polímero presentan de media un número medio de átomos superior a 75, preferentemente superior a 210, o tienen una masa molecular superior a 1.500, y preferentemente superior a 4.500.

13. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero presenta de media un número de puntos de unión comprendido entre 4 y 100.

14. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero es un copolímero de bloques que tiene como media por lo menos cuatro segmentos poliméricos.

15. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero es un polímero de peine que tiene de media por lo menos dos cadenas laterales.

16. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero comprende por lo menos un tipo de segmento seleccionado de entre poliéteres, poliésteres, tal como poli(ácido glicólico), homopolímeros y copolímeros al azar solubles del tipo polioxialquilénicos, tal como polioxipropileno, polioxibutileno, polioxietileno, polisacáridos, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poliuretanos, poliamidas, polisulfonamidas, polisulfóxidos, polioxazolina, poli(sulfonato de estireno), polímeros y copolímeros de acrilamidas, metacrilamidas y alilos, sustituidos o no sustituidos.

17. Medio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dicho polímero comprende por lo menos un polímero seleccionado de entre:

- los copolímeros del tipo copolímero de peine, cuya cadena principal es del tipo de dextrano, acrilamida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol o (N,N)-dimetilacrilamida, y sobre la cual se injertan segmentos laterales

de tipo acrilamida, acrilamida sustituida o (N,N)-dimetilacrilamida (DMA), o del tipo de copolímero de DMA y alilglicidiléter (AGE), o de homopolímero o copolímero de oxazolina o de derivados de oxazolina;

- los copolímeros no termosensibles del tipo de copolímero secuencial irregular que tienen a lo largo de su cadena principal, una alternancia de segmentos de tipo polioxietilénico y de segmentos de tipo polioxipropilénico, o una alternancia de segmentos de tipo polioxietilénico y de segmentos de tipo polioxibutilénico, o una alternancia de segmentos de polietileno y de segmentos de tipo poliéter más hidrófobos que el polioxietileno;
- los copolímeros del tipo de copolímero de bloques secuencial irregular que tienen, a lo largo de su cadena principal, una alternancia de segmentos de tipo acrilamida, ácido acrílico, acrilolaminoetanol o dimetilacrilamida, por un lado, y segmentos de tipo (N,N)-dimetilacrilamida (DMA), o de tipo copolímero de DMA y de alilglicidiléter (AGE), o de homopolímero o copolímero de oxazolina o de derivados de oxazolina;
- los polímeros del tipo polímero de peine irregular, cuya cadena principal es de tipo de polímero de agarosa, de acrilamida, de acrilamida sustituida, de ácido acrílico, de acrilolaminoetanol, de dimetilacrilamida (DMA), de alilglicidiléter (AGE), o de copolímero al azar de DMA y de AGE, de oxazolina y derivado de oxazolina, de dextrano, de metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, de celulosa modificada, de polisacáridos, de óxido de éter, y sobre la cual se injertan segmentos laterales de tipo de polímero de agarosa, de acrilamida, de acrilamida sustituida, de ácido acrílico, de acrilolaminoetanol, de dimetilacrilamida (DMA), o de alilglicidiléter (AGE), de copolímero al azar de DMA y de AGE, de oxazolina y derivado de oxazolina, de dextrano, de metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, de celulosa modificada, de polisacárido o de óxido de éter;
- los copolímeros del tipo copolímero de peine irregular, cuya cadena principal es del tipo de polímero de acrilamida, de acrilamida sustituida, de ácido acrílico, de acrilolaminoetanol, de dimetilacrilamida (DMA), de alilglicidiléter (AGE), de tipo copolímero al azar de DMA y de AGE, de oxazolina y derivado de oxazolina, de dextrano, de agarosa, de metilcelulosa, de hidroxietilcelulosa, de celulosas modificadas, de polisacárido, de óxido de éter, y tiene segmentos laterales hidrófobos de cadena corta, tales como cadenas alquílicas, derivados aromáticos, fluoroalquilos, silanos o fluorosilanos.

18. Utilización de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 17, para separar, purificar, filtrar o analizar especies seleccionadas de entre especies moleculares o macromoleculares, macromoléculas biológicas de tipo ácido nucleico, sus análogos de síntesis, proteínas, polipéptidos, glicopéptidos y polisacáridos, moléculas orgánicas, macromoléculas sintéticas o partículas tales como partículas inorgánicas, látex, células u orgánulos.

19. Utilización según la reivindicación 18 o utilización de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 17, en un canal del que por lo menos una dimensión es submilimétrica.

20. Utilización según la reivindicación 18 ó 19, o utilización de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 17, para las separaciones electrocinéticas.

21. Utilización según la reivindicación 18 a 20, o utilización de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 17, para el diagnóstico, para tipaje genético, y detección sistemática de gran rendimiento, para control de calidad, o para detectar la presencia de organismos genéticamente modificados en un producto.

22. Procedimiento para separar, analizar y/o identificar especies contenidas en una muestra, **caracterizado** porque comprende:

- a) rellenar el canal de un dispositivo de separación con un medio de separación según una de las reivindicaciones 1 a 17,
- b) introducir dicha muestra que contiene dichas especies en un extremo de dicho canal,
- c) aplicar un campo externo destinado a mover ciertas especies contenidas en la muestra, y
- d) recuperar dichas especies o detectar el paso de dicha especie en un punto a lo largo del canal que es diferente del punto de introducción de la muestra.

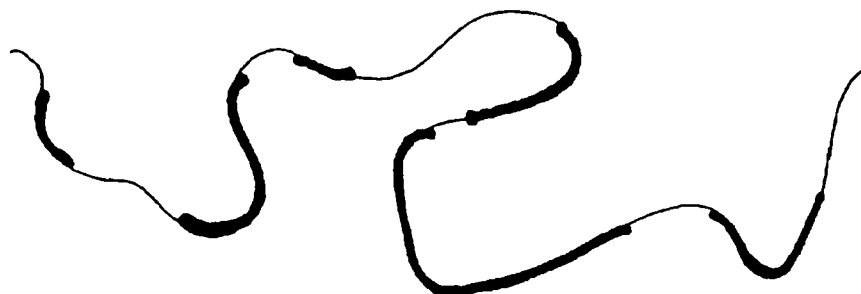


FIG. 1a

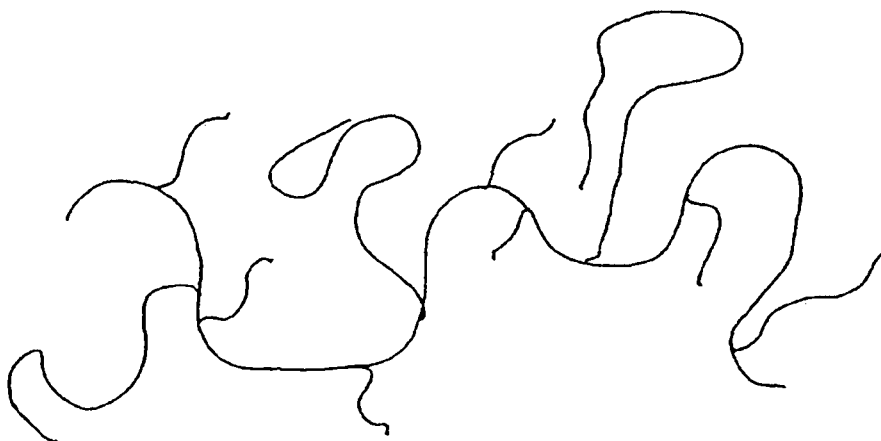


FIG. 1b

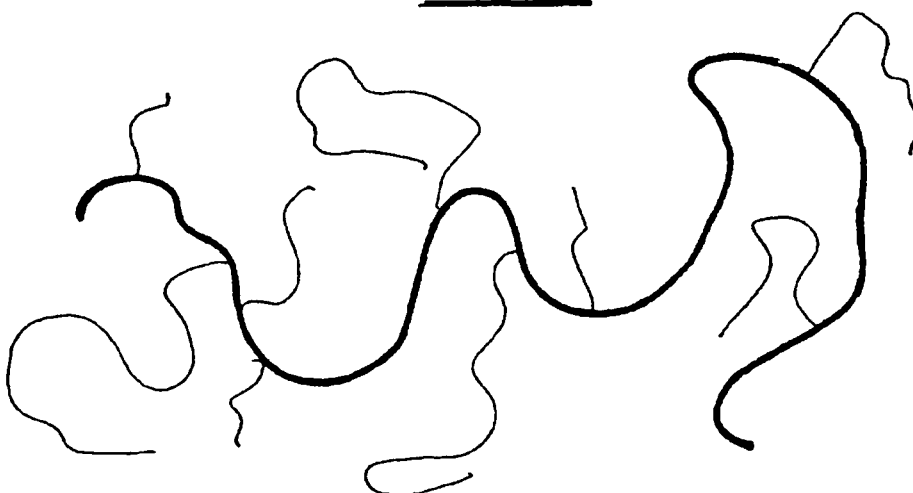


FIG. 1c

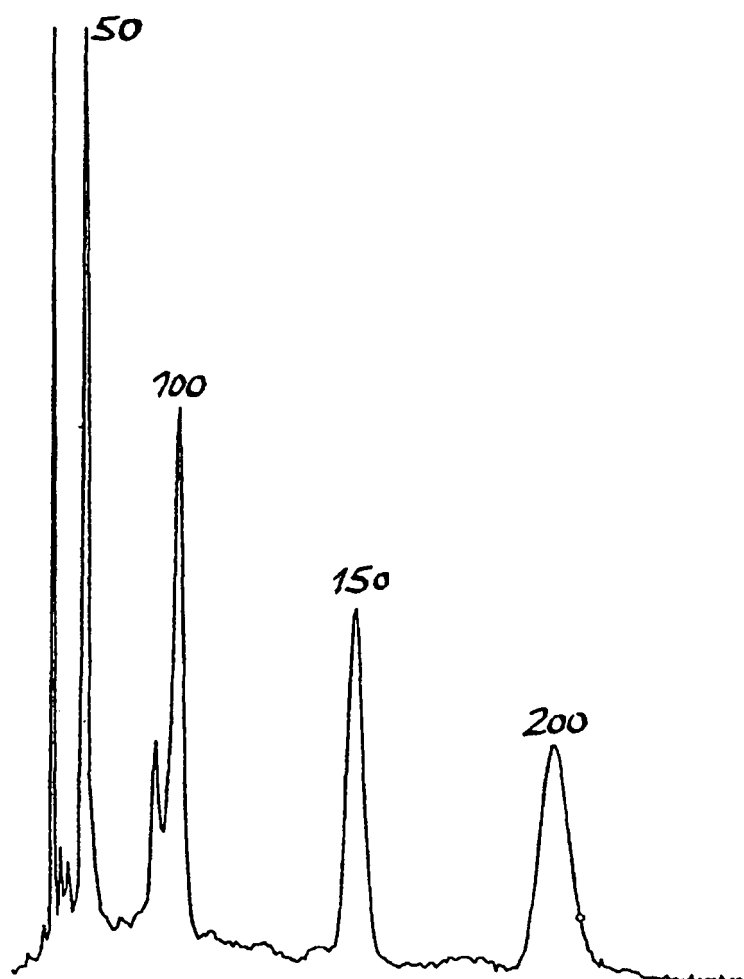


FIG.2

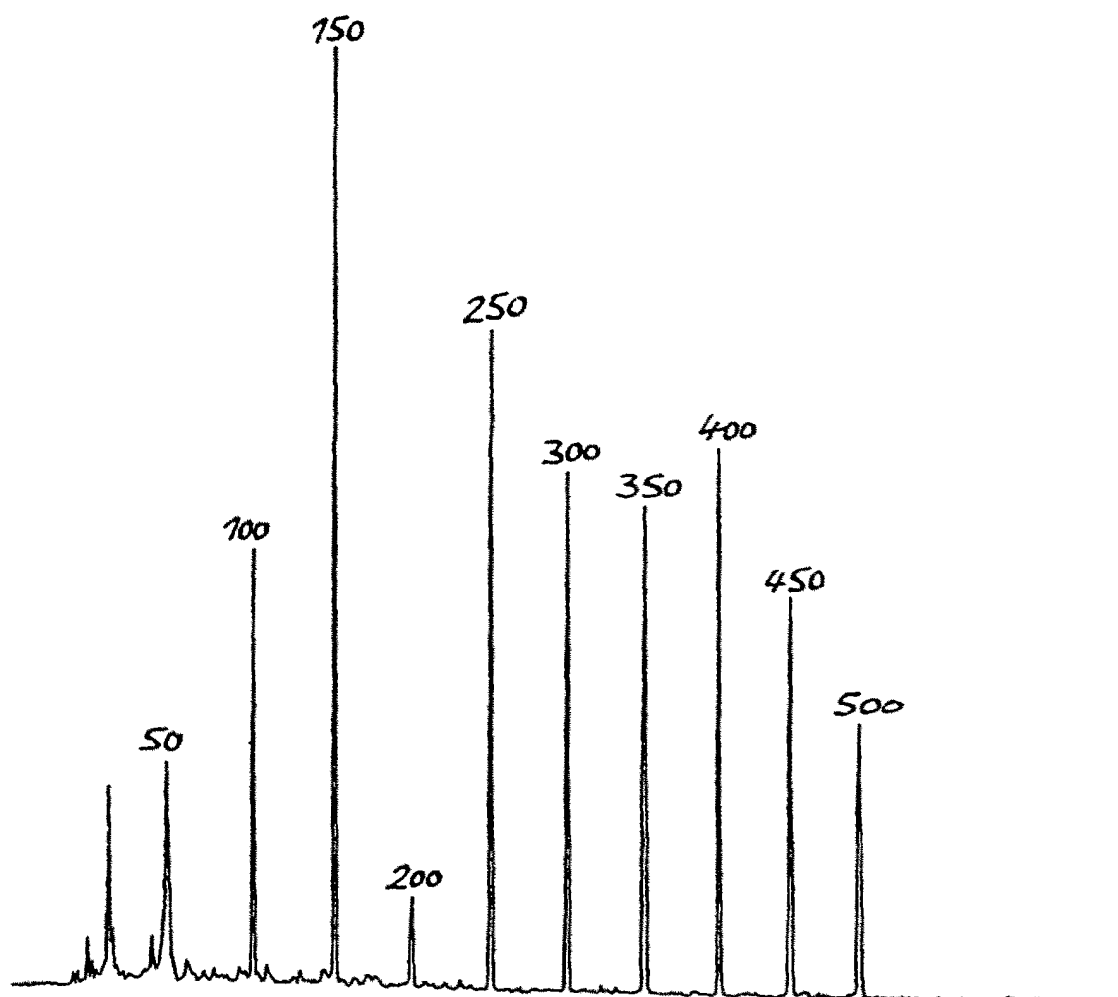


FIG.3

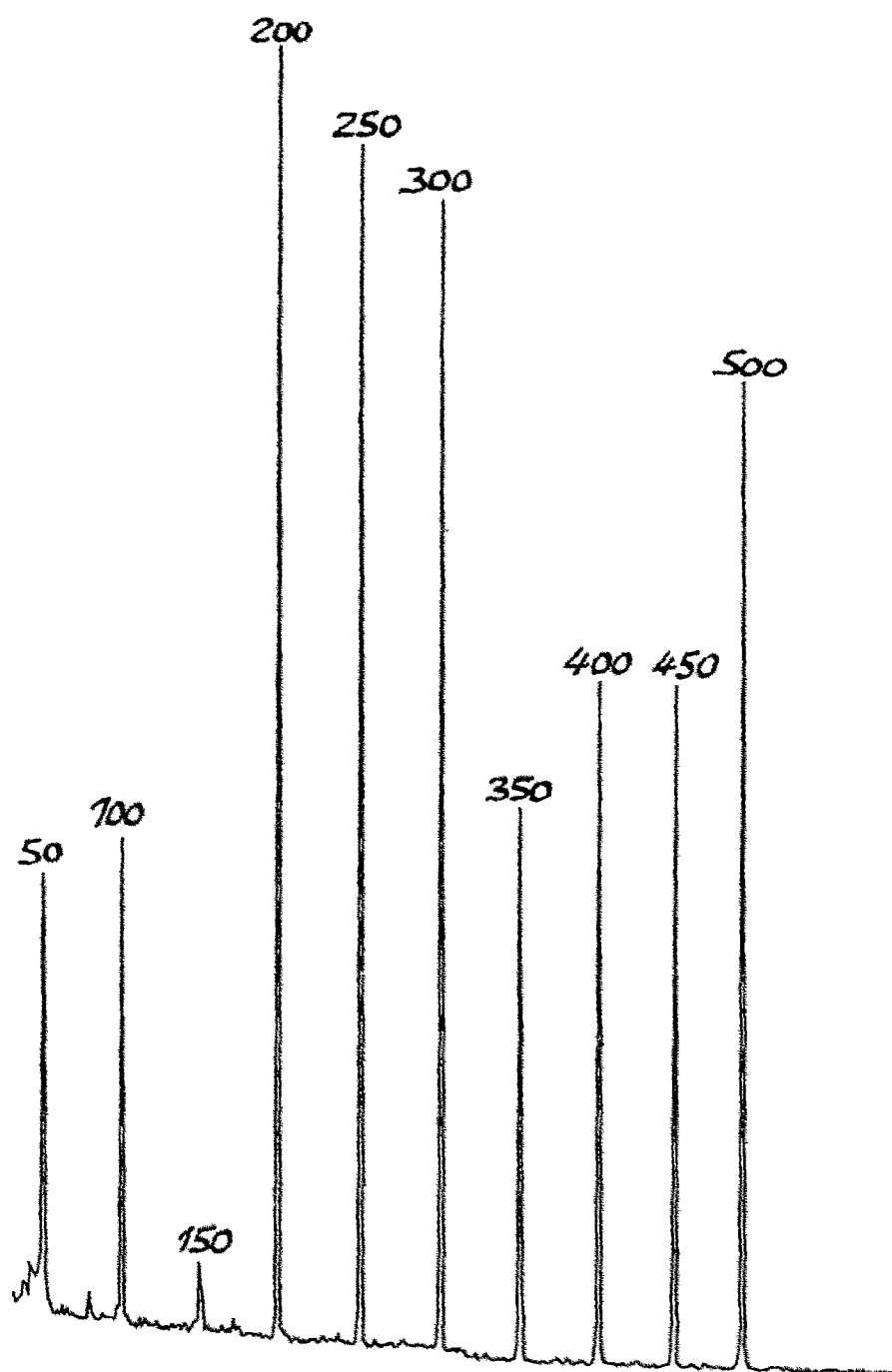


FIG.4

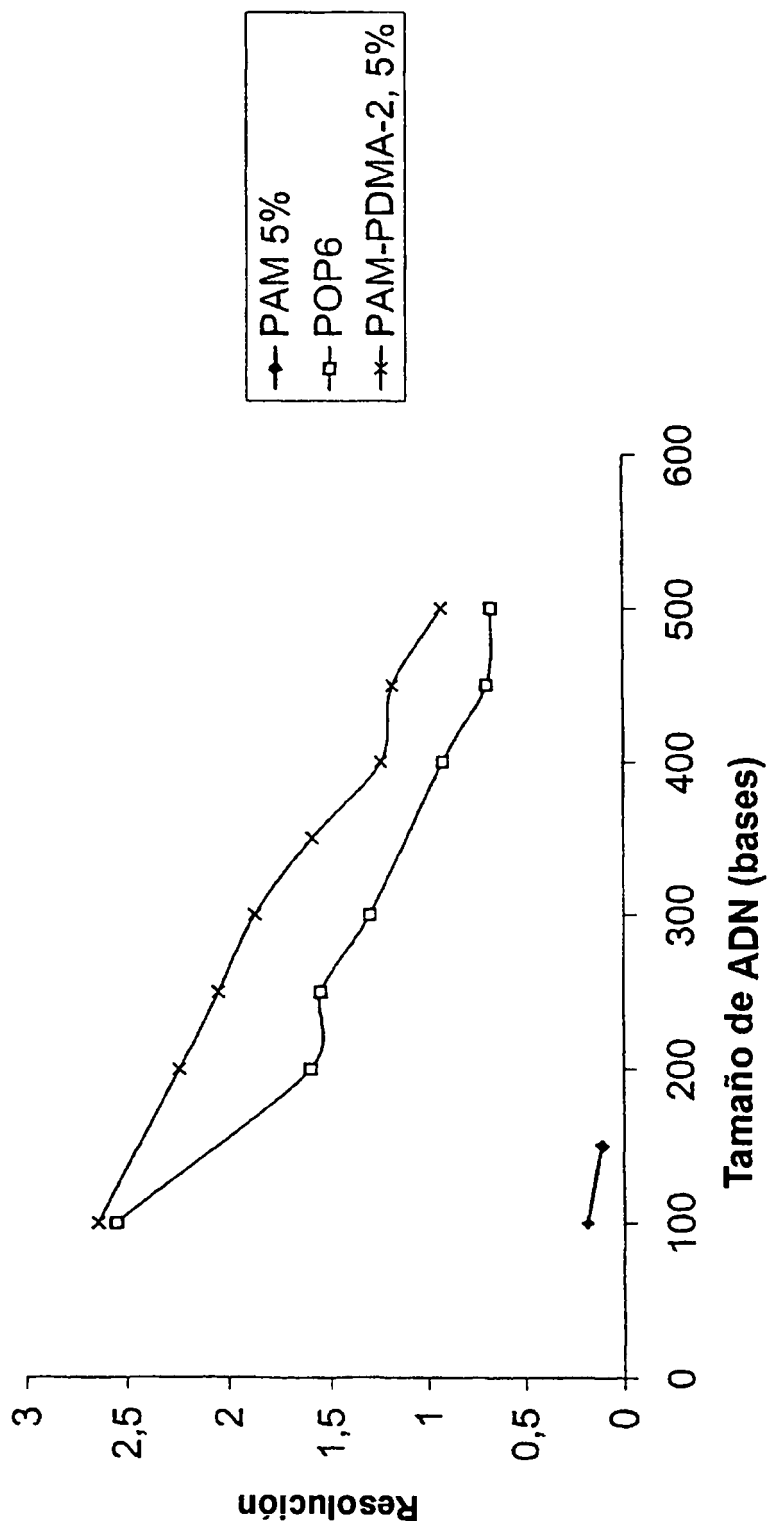
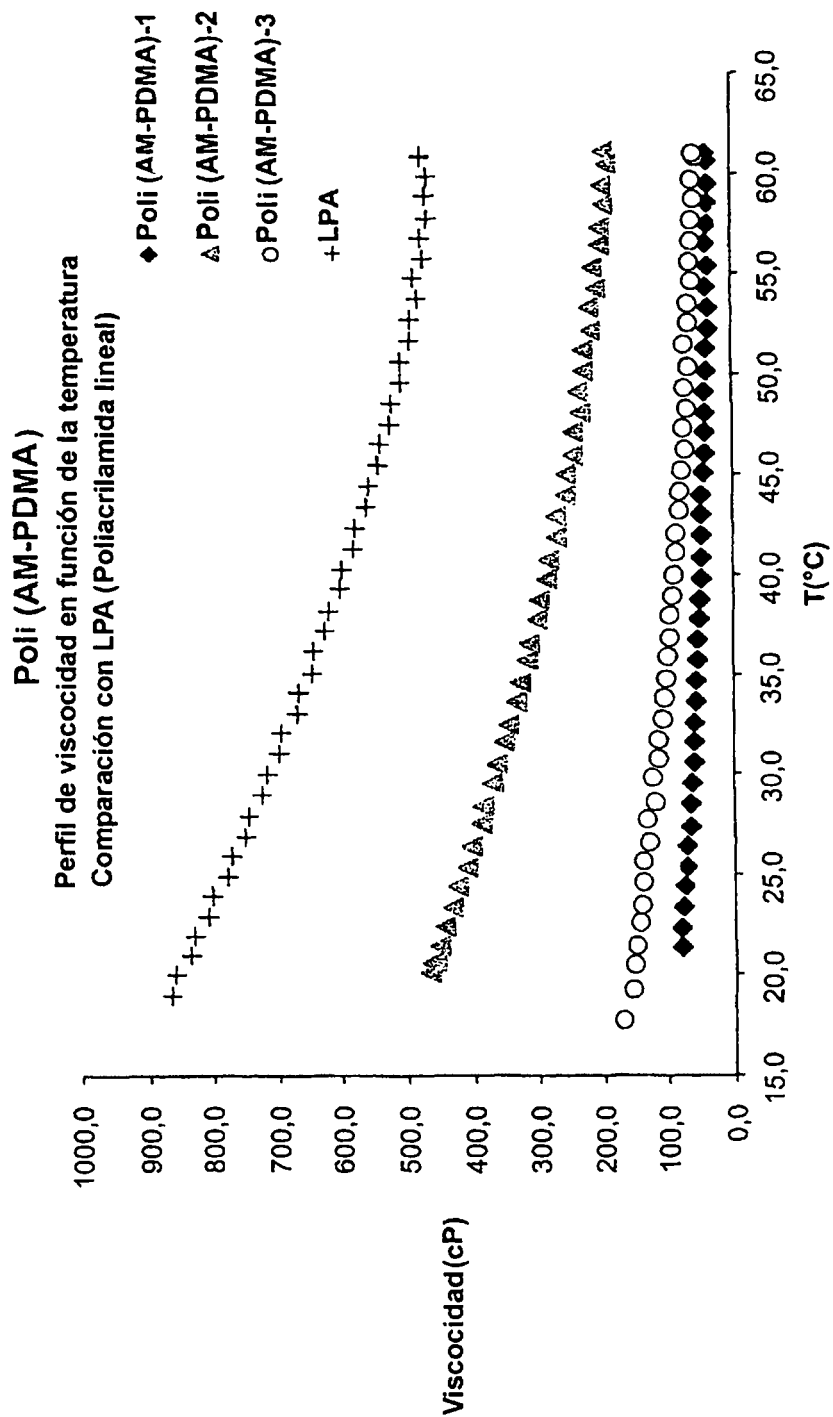


FIG.5

**FIG.6**

Comparación de las resoluciones obtenidas con diferentes polímeros
a tiempos de separación relativamente

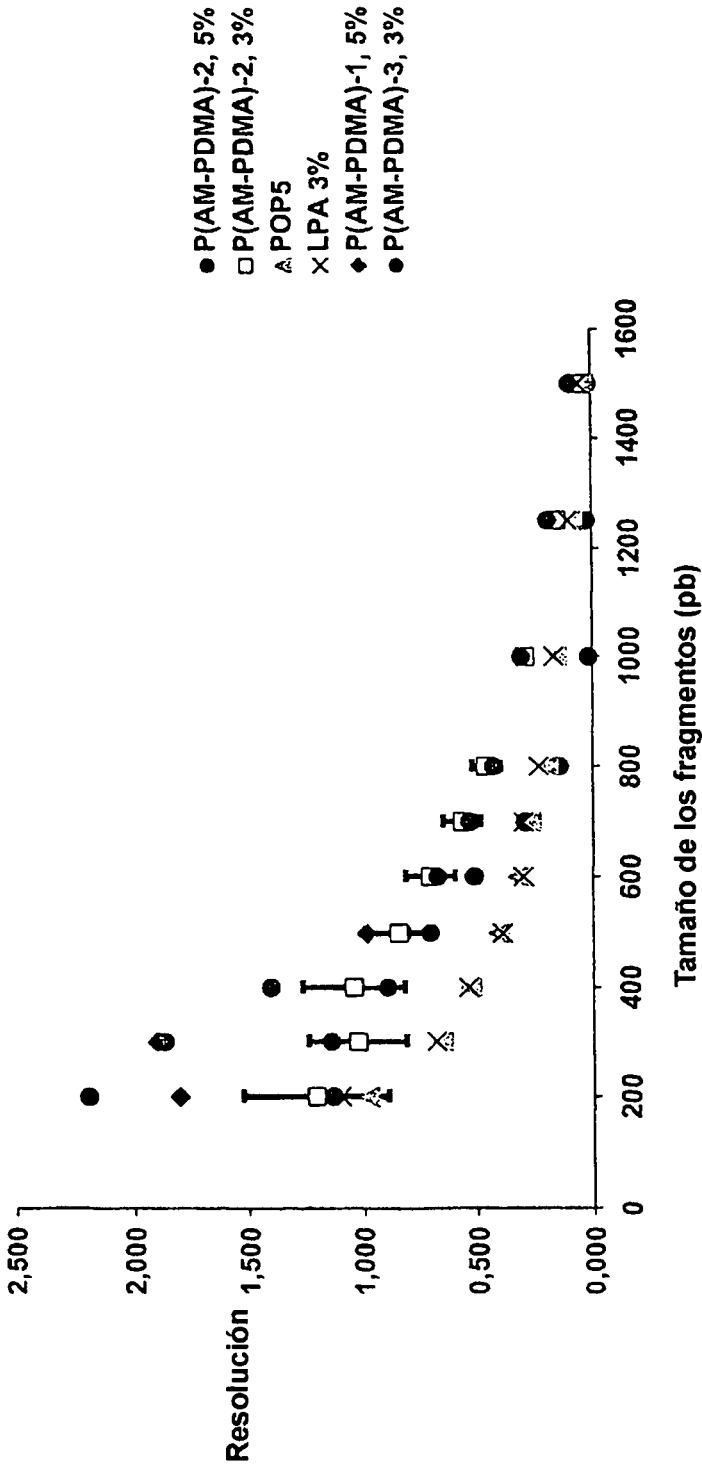


FIG. 7