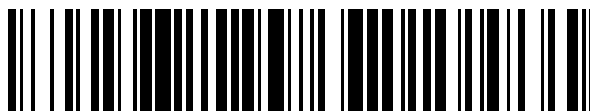


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 659**

51 Int. Cl.:

A01N 31/02 (2006.01)

A01N 31/04 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07867697 .0**

96 Fecha de presentación: **10.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2114146**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **Disoluciones para el almacenamiento de medios cromatográficos y equipo cromatográfico y uso de las mismas**

30 Prioridad:
01.02.2007 US 887671 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.07.2012

73 Titular/es:
**Avantor Performance Materials, Inc.
222 Red School Lane
Phillipsburg NJ 08865, US**

72 Inventor/es:
**DEORKAR, Nandu y
MAGEE, Steve**

74 Agente/Representante:
Sugrañes Moliné, Pedro

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).

ES 2 384 659 T3

DESCRIPCIÓN

Disoluciones para el almacenamiento de medios cromatográficos y equipo cromatográfico y uso de las mismas

Campo de la invención

Esta invención se refiere a una composición que es estable y adecuada para el almacenamiento de medios cromatográficos y equipo cromatográfico durante periodos de tiempo prolongados, por ejemplo, durante hasta aproximadamente dos años o más. La invención también se refiere a métodos de preparación y al uso de disoluciones novedosas para preparar suspensiones líquido-sólidas que inhiben el crecimiento bacteriano y destruyen bacterias. La invención también da a conocer una composición o disoluciones para preparar suspensiones líquido-sólidas y almacenar tales suspensiones.

Antecedentes de la invención

El análisis cromatográfico es una de las técnicas analíticas usadas comúnmente para determinar las propiedades, los componentes y/o las características de diversos materiales. Sin embargo, aunque se ha adoptado ampliamente el análisis cromatográfico, un problema que ha surgido es el problema de que los medios y el equipo utilizados en tal análisis cromatográfico se vuelvan impuros o se infecten con materia bacteriana, particularmente cuando los medios cromatográficos y el equipo cromatográfico se someten a almacenamiento, particularmente a almacenamiento a largo plazo cuando no están utilizándose. La técnica anterior no ha ofrecido ninguna solución eficaz al problema de seguridad y almacenamiento eficaz de medios cromatográficos y equipo cromatográfico, especialmente para el almacenamiento a largo plazo.

Se usan ampliamente diversas disoluciones tales como ácido fosfórico (0,01-0,5 N), ácido clorhídrico (0,1-0,5 N), NaOH (0,1-2 N) y alcohol (etanol o isopropanol como mínimo al 20% v/v en agua) para la inhibición bacteriana. Sin embargo, estas disoluciones son altamente ácidas o básicas o conllevan algunos riesgos medioambientales y de manipulación y no son compatibles con medios cromatográficos y equipo cromatográfico. Según la práctica actual, si se usan hidróxido de sodio (0,1 M-0,5 M) o ácidos (0,1 M-0,5 M), es necesario neutralizarlos en primer lugar o bien usando un ácido o bien una base, respectivamente, seguido por lavado con agua suficiente para eliminar la sal en exceso. Si se necesitan concentraciones de alcohol (etanol o alcohol isopropílico) del 20% o superiores para un efecto bactericida, se requiere el desecho y la manipulación orgánica apropiados. Además a las disoluciones anteriores, se han usado algunas composiciones de disoluciones que contienen tampón de pH 5,0 o inferior y alcohol bencílico al 1,0% para el almacenamiento de algunos medios cromatográficos. Sin embargo, debido a la estabilidad reducida de los medios cromatográficos a bajo pH, no son adecuadas formulaciones de bajo pH para el almacenamiento a largo plazo. El alcohol bencílico es un conservante antimicrobiano frente a bacterias gram-positivas y se usa en cosméticos, alimentos y una amplia gama de formulaciones farmacéuticas aunque sólo tiene propiedades bactericidas modestas, conociéndose que se produce una actividad óptima por debajo de pH 5,0 tal como se indica en Karabit, M. S., Juneskans, O. T. y Lundgren, P. *Journal of Clinical and Hospital Pharmacy* (1986) 11, 281-289; y R.C. Rowe, P.J. Sheskey y P.J. Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4ª edición American Pharmaceutical Association, (2003) 53-55. Además, se ha demostrado que la actividad del alcohol bencílico se reduce por incompatibilidades con algunos materiales de relleno tales como metilcelulosa, polietileno, poliestireno, caucho natural, neopreno y caucho butílico y similares, tal como se afirma en R.C. Rowe, P.J. Sheskey y P.J. Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4ª edición, American Pharmaceutical Association (2003), 53-55 y M.S. Roberts et. al, *Int. J. Pharm.* (1979) 2, 295-306].

Por tanto, sigue habiendo una clara necesidad de una composición o disolución aceptable que permitirá el almacenamiento eficaz y seguro de medios cromatográficos y equipo cromatográfico sin riesgo o con un riesgo esencialmente minimizado de que se produzca una infección bacteriana de los medios o el equipo. Hay especialmente una necesidad de una composición o disolución que permitirá el almacenamiento eficaz y seguro de medios cromatográficos y equipo cromatográfico durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, aproximadamente un tiempo de dos años o más, sin riesgo o con un riesgo esencialmente minimizado de que se produzca una infección bacteriana de los medios o el equipo. El documento WO 2006/081002 describe la conservación de sólidos cromatográficos con cualquiera de los alcoholes etílico o bencílico.

Sumario de la invención

Se ha descubierto inesperadamente que empleando composiciones de disoluciones antimicrobianas, pueden proporcionarse disoluciones con un pH esencialmente neutro, generalmente desde aproximadamente pH 5,5 hasta 7,5, preferiblemente un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5, que son compatibles con sólidos cromatográficos, tales como medios o soportes cromatográficos y equipo cromatográfico, y que tales disoluciones mantienen propiedades de inhibición y destrucción microbiana. Las composiciones o disoluciones de esta invención comprenden disoluciones antimicrobianas tamponadas de aproximadamente el 1,5% hasta aproximadamente el 4%

de alcohol bencílico, de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 4% de alcohol etílico y generalmente desde aproximadamente el 92% hasta aproximadamente el 98% de tampón de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM para proporcionar disoluciones a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, en las que los porcentajes son porcentaje en peso. En tales disoluciones los sólidos cromatográficos, tales como los medios, soportes y equipo; pueden almacenarse de manera segura durante periodos de tiempo cortos o prolongados sin un riesgo excesivo de que se produzca una infección bacteriana de los medios, soporte o equipo. Las disoluciones de esta invención pueden destruir bacterias e inhibir el crecimiento bacteriano en presencia de sólidos cuando se almacenan los medios, soportes o equipo cromatográficos en estas disoluciones durante periodos de tiempos cortos o prolongados. Otra característica de esta invención es que proporciona tales disoluciones que no son ni altamente básicas ni ácidas y que no contienen gran cantidad (alto porcentaje) de disolvente orgánico. Adicionalmente, las disoluciones de esta invención son inertes a los materiales de construcción para medios y equipo cromatográficos usados comúnmente. Además, las disoluciones de esta invención son de baja toxicidad y son respetuosas con el medio ambiente.

Una composición preferida incluye tampón de fosfato-acetato de sodio 100 mM para proporcionar una disolución de pH 6,0-pH 7,0 que contiene el 2% de alcohol bencílico y el 2% de etanol. Esta disolución puede usarse para el almacenamiento de medios cromatográficos basados en perlas poliméricas o sílice. Se muestra que la suspensión líquido-sólida preparada usando los medios cromatográficos y dicha disolución destruye *E. coli* y *C. albicans* en el plazo de 2 horas y *A. niger* en el plazo de 24 horas mientras que mantiene las disoluciones libres de bacterias durante tiempos prolongados. Además, se muestra también que esta disolución destruye diversos microorganismos presentes sobre el soporte sólido tal como medios cromatográficos y lo mantiene libre de bacterias a largo plazo. Puesto que esta disolución es altamente inerte y no tóxica, permite operaciones habituales tales como relleno de columnas cromatográficas o limpieza de equipos. Además, los componentes de la disolución pueden eliminarse fácilmente de superficies tales como superficies de medios o equipo cromatográficos lavando con agua, otros tampones o ácidos diluidos tales como ácido acético (al 1,0%) que se usan normalmente en las operaciones cromatográficas.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

Un fin de la invención es preparar disoluciones que puedan destruir bacterias e inhibir el crecimiento bacteriano en presencia de sólidos cromatográficos cuando se almacenan la disolución o sólidos cromatográficos en esta disolución de corto a largo plazo. Otro fin de la invención es proporcionar una disolución que no sea altamente ácida o básica, que no contenga altas cantidades de disolvente orgánico, sea inerte, es decir, no dañe los materiales de construcción de medios y equipo cromatográficos usados comúnmente, sea de baja toxicidad y respetuosa con el medio ambiente.

La invención se refiere a proporcionar disoluciones novedosas para preparar suspensiones líquido-sólidas que inhiben el crecimiento microbiano y destruyen la flora microbiana. Más particularmente, esta invención se refiere al almacenamiento de sólidos cromatográficos, particularmente medios cromatográficos en recipientes o columnas de procesos cromatográficos. El procedimiento de la invención comprende proporcionar una disolución tampón antimicrobiana que contiene de aproximadamente el 1,5 a aproximadamente el 4% de alcohol bencílico, de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 4% alcohol etílico, de aproximadamente el 92 a aproximadamente el 98% de disolución tampón de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. Otro aspecto de la invención comprende almacenar sólidos cromatográficos durante periodos de tiempos cortos o largos en tales disoluciones tampón antimicrobianas. Esto se logra, por ejemplo, mezclando aproximadamente 1 parte de medios cromatográficos con aproximadamente 1-4 partes de disolución tampón antimicrobiana en un recipiente u otro aspecto de la invención es almacenar la suspensión espesa antimicrobiana de los medios cromatográficos en la disolución tampón antimicrobiana en un recipiente cerrado o en una columna cromatográfica hasta su próximo uso.

La disolución antimicrobiana tamponada puede prepararse mezclando disolución tampón con etanol y alcohol bencílico. En una realización preferida, en primer lugar se mezcla el alcohol bencílico con el etanol y luego se añade el tampón para proporcionar el pH deseado desde aproximadamente 5,5 hasta 7,5. Los ejemplos de diversos agentes tamponantes adecuados que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, trietanolamina, tris(hidrometil)aminometano (TRIS), HEPES (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfonato)) y MES (4-morfolina-etanosulfonato).

La composición antimicrobiana preferida de esta invención es aproximadamente el 2% de etanol, aproximadamente el 2% de alcohol bencílico y aproximadamente el 96% de fosfato de sodio (dibásico) aproximadamente 100 mM valorado hasta pH 6,0 con ácido acético en agua. Se muestra que la disolución antimicrobiana o suspensión espesa de sólidos cromatográficos-disolución tamponada almacenada en recipientes de polipropileno mantiene su eficacia antimicrobiana y su composición química durante al menos 2 años.

La disolución antimicrobiana y su uso para el almacenamiento de medios cromatográficos la hacen muy adecuada

para uso industrial de pequeña a gran escala. La disolución antimicrobiana de esta invención usa alcohol bencílico que generalmente se considera como seguro (GRAS, *generally regarded as safe*) junto con menos del 4% de alcohol etílico que lo hace fácil de manipular y que se desecha rápidamente. Además, el alcohol bencílico puede eliminarse fácilmente de los medios cromatográficos o bien mediante lavado con tampones cromatográficos usados generalmente tales como en el intervalo de concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M en el intervalo de pH de 3,0 a 9,0. Por ejemplo, pueden usarse TRIS, HEPES, MES, acetato de sodio, citrato de sodio y fosfato de sodio. Alternativamente, también puede usarse ácido acético diluido (DE 0,01 M a 0,5 M) para la eliminación de la disolución antimicrobiana y sus componentes de los sólidos cromatográficos tales como medios cromatográficos.

Los materiales y métodos usados en esta descripción de la invención son los siguientes:

Microorganismos de prueba.

Los microorganismos usados en los diversos ensayos se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10810 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. Se obtuvieron los siguientes microorganismos: *Candida albicans* (n.º ATCC 10231), *Aspergillus niger* (n.º ATCC 16404), *Staphylococcus aureus* (n.º ATCC 6538) y *Escherichia coli* (n.º ATCC 8739). Se mantuvieron los cultivos de *C. albicans* en agar malta-levadura (YMA, yeast malt agar) al 2% (Sigma Chemical Co. n.º Y3127). Se mantuvieron los cultivos de *A. niger* en agar patata-dextrosa (PDA, potato dextrose agar) al 2% (Sigma Chemical Co. n.º P2182). Se mantuvieron los cultivos de *S. aureus* y *E. coli* en agar nutriente (NA, nutrient agar) al 2% (Sigma Chemical Co. n.º N0394). Todos los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente o a 5-10°C hasta que se necesitaron y se cultivaron en estrías periódicamente (aproximadamente de manera semanal) en placas estériles nuevas de medios.

Determinación del efecto antimicrobiano mediante el método de unidades formadoras de colonias.

Se recogió una colonia individual de cualquier microorganismo dado con un asa estéril y se transfirió a agua estéril o solución salina tamponada con fosfato 1X y se diluyó hasta aproximadamente 10.000 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. A 5 ml de una disolución antimicrobiana de prueba (o agua estéril o solución salina tamponada con fosfato 0,1-1,0 X para que sirviese como control), se le añadieron 0,1 ml de aproximadamente 10.000 UFC/ml de cultivo y se mezcló brevemente mediante agitación en vórtex suave. En diversos momentos, se transfirieron 0,1-1,0 ml de disolución antimicrobiana inoculada al centro de una placa estéril vacía y se añadieron 15 ml de medios estériles (agar) mantenidos a 45-50°C y se mezclaron meticulosamente. Los medios añadidos para cada microorganismo respectivo eran los mismos que los usados para mantener los cultivos. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente durante 20-45 minutos, luego se transfirieron a un incubador mantenido a 34-37°C en el que se mantuvieron durante 4 días. Periódicamente, se examinaron las placas para determinar el crecimiento y se contaron las colonias. Normalmente, las colonias eran evidentes en 24 horas y se contaron a las 24, 48 y 72 horas. Habitualmente, los recuentos a las 48 y 72 horas fueron idénticos. Como 2º control, se añadió una muestra de disolución antimicrobiana de prueba (0,1-1,0 ml) sin microorganismos añadidos al centro de una placa estéril y se añadieron 0,1 ml del cultivo control del microorganismo en cuestión a 1.000-2.000 UFC/ml a la placa a una distancia de al menos 2 cm de la muestra de prueba. Como anteriormente, se añadieron 15 ml de medios estériles (agar) de elección para ese microorganismo mantenido a 45-50°C y se mezclaron meticulosamente. Esto sirvió para determinar si la presencia de los componentes de prueba estaba inhibiendo el crecimiento en la placa en lugar de destruir los microorganismos en la disolución antimicrobiana inoculada.

Ejemplos

Ejemplo 1. Diversas composiciones tamponantes

Se valoraron tampones de diversos tipos y concentraciones (0,02-1,0 M) hasta pH de 5,0-7,5 con ácidos o bases apropiados, luego se añadieron etanol y alcoholes bencílico para proporcionar el 2% de cada uno. Tampones representativos fueron acetato de sodio (ácido acético valorado con hidróxido de sodio), acetato-trietanolamina (ácido acético valorado con trietanolamina), fosfato de sodio-ácido acético (fosfato de sodio, dibásico, valorado con ácido acético) y fosfato de sodio (fosfato de sodio, monobásico, valorado con hidróxido de sodio). Normalmente, el agente tamponante de elección se preparaba hasta 1,1-1,3 veces la concentración deseada y se valoraba hasta el pH deseado, luego se diluía con agua para proporcionar la concentración deseada. Los pH siguieron siendo iguales que los de la disolución madre no diluida. A un matraz volumétrico de 100 ml, se le añadieron 2,0 +/- 0,02 gramos de alcohol bencílico y 2 +/- 0,01 gramos de etanol, y luego se añadió la disolución tamponante. En algunas ocasiones, se filtró la disolución final a través de un filtro estéril de 0,2 micrómetros en un matraz estéril para hacerla sin duda estéril. Se encontró que esto no era necesario generalmente ya que varios ensayos con disoluciones que contenían concentraciones del 1% o superiores de alcohol bencílico y otros esterilizantes (con o sin etanol presente) indicaron que una incubación durante 24 horas era suficiente para hacer que la disolución estuviese libre de microorganismos endógenos. La prueba se comenzó transfiriendo 5 ml de la disolución de prueba a un tubo de vidrio estéril y añadiendo 0,1 ml de cultivo microbiano, mezclando bien y manteniéndolo a temperatura ambiente (20-23°C) durante

una cantidad de tiempo apropiada de aproximadamente 1 a 24 horas para permitir la destrucción o crecimiento bacterianos transfiriendo luego 0,1-1,0 ml a placas estériles. A cada una de las placas se les añadieron entonces 15 ml de medios de crecimiento bacteriano apropiados a 45-55°C y se mezclaron bien los medios con el cultivo de prueba. Se determinó la formación de colonias tras una incubación apropiada a 34-37°C durante 48-72 horas. Se encontró que el tipo de tampón parecía tener poca influencia sobre la velocidad de destrucción de los microorganismos pero la concentración y el pH eran importantes a menudo. Las concentraciones requeridas para proporcionar un aumento sustancial en las velocidades de destrucción eran generalmente superiores a 0,1 M. Además, se destruían más microorganismos a pH inferiores a 5,5 que a pH superiores a 5,5.

Ejemplo 2. Antimicrobiano y destrucción usando disolución antimicrobiana a pH 4,0-7,5

Se prepararon composiciones tampón valorando fosfato de sodio 0,025 M, dibásico, con ácido acético glacial hasta diversos pH en incrementos de 0,5 unidades de pH. A un matraz volumétrico de 100 ml, se le añadieron 2,0 +/- 0,02 gramos de alcohol bencílico y 2 +/- 0,01 gramos de etanol, luego se enrasó con fosfato de sodio-ácido acético 0,025 M a un pH dado. El pH siguió siendo el mismo que el del tampón solo +/- 0,09 unidades de pH. Se dejaron estas mezclas a temperatura ambiente durante al menos 24 horas para permitir la eliminación de microorganismos endógenos, que normalmente fueron 0, de todos modos. Se sometieron a prueba estas disoluciones añadiendo cultivos activos de los microorganismos a 5 ml de disolución de prueba y se incubaron durante una cantidad de tiempo apropiada a temperatura ambiente. Se sembraron en placa periódicamente muestras de la mezcla de prueba con los medios apropiados para el microorganismo en cuestión y se hicieron crecer durante 72-96 horas a 33-37°C. Aunque la velocidad de destrucción a pH 4,5 e inferior era considerablemente más rápida que a pH 5,5-7,5, la disolución ácida de pH 4,5 no era estable de manera aceptable y es perjudicial para los medios cromatográficos mientras que la velocidad de destrucción a pH 5,5-6,5 era aceptable, requiriéndose aproximadamente 24 horas para eliminar al >95% de las células de *A. niger* activas y menos de 2 y 4 horas para destruir el 100% de las células de *E. coli* y *C. albicans* activas, respectivamente, sin embargo no era perjudicial para los medios cromatográficos y eran estables tales disoluciones de aproximadamente pH 5,5 a 6,5.

Ejemplo 3. Efecto antimicrobiano en suspensión espesa de medios cromatográficos

Se prepararon composiciones tampón valorando fosfato de sodio 0,025 M, dibásico, con ácido acético glacial hasta diversos pH. A un matraz volumétrico de 100 ml, se le añadieron o bien 1,5 +/- 0,2 o bien 2,0 +/- 0,02 gramos de alcohol bencílico y, o bien 1,5 +/- 0,2 o bien 2 +/- 0,01 gramos de etanol, luego se enrasó con fosfato de sodio 0,025 M-ácido acético a un pH dado. El pH siguió siendo el mismo que el del tampón solo +/- 0,09 unidades de pH. Se dejaron estas mezclas a temperatura ambiente durante al menos 24 horas para permitir la eliminación de microorganismos endógenos, que normalmente fueron 0, de todos modos. Mientras tanto, se centrifugaron de manera breve aproximadamente 3,1 ml rellenos de medios de proteína A - sílice que se habían almacenado en fosfato de sodio 25 mM-ácido acético, pH 6, que contenía el 2% de alcohol bencílico y el 2% de etanol a temperatura ambiente durante 48 horas y se trasvasó el sobrenadante. Se suspendió el sedimento relleno en 15 ml de agua filtrada a través de un filtro de 0,2 micrómetros y se centrifugó para formar un sedimento y se trasvasó el sobrenadante. Esto se repitió 3 veces más con agua filtrada, luego se repitió 3 veces más con agua estéril (tratada en autoclave). Se suspendió el sedimento de medios de proteína A-sílice en agua estéril (tratada en autoclave) para proporcionar un volumen de suspensión de 8 ml. A cada una de las varias disoluciones de prueba, se le transfirieron 0,25 ml del sorbente suspendido que representaba aproximadamente 0,1 ml del sorbente de medios de proteína A-sílice. Otros tubos recibieron sólo 0,25 ml de agua estéril. A los tubos se les añadieron entonces "cantidades conocidas" de un cultivo microbiano y se dejaron a temperatura ambiente durante diversos periodos de tiempo con lo que se sembró en placa una muestra para el recuento de células vivas tal como se describió anteriormente. Se destruyeron tanto *E. coli* como *C. albicans* hasta menos del 1 % del recuento inicial mientras que *A. niger* requirió hasta 90 horas para destrucción del 100%. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia detectable entre las velocidades de destrucción en presencia o ausencia del sorbente.

Ejemplo 4. Efecto antimicrobiano frente al tiempo

Se preparó una disolución antimicrobiana valorando ácido acético 10 mM con NaOH hasta pH 6, añadiendo luego NaCl hasta 25 mM y alcohol bencílico y etanol cada uno hasta el 2% como anteriormente. Se añadieron cultivos vivos como una "cantidad conocida" y se contaron periódicamente las células vivas. Después de almacenar la disolución durante un mes, el potencial de destrucción microbiana todavía era el mismo que cuando se sometió a prueba con *S. aureus*.

Ejemplo 5. Estabilidad de la disolución antimicrobiana

Se almacenó una disolución de ácido acético 10 mM-NaOH-NaCl 25 mM-2% de alcohol bencílico-2% de etanol, pH 5,5, durante 22 meses en botellas de polietileno de alta densidad sin pérdida detectable (menos del 1% de su concentración original) de alcohol bencílico basado en absorbancias medidas a 257 nm en disoluciones diluidas con agua.

Ejemplo 6. Estabilidad de la disolución antimicrobiana en presencia de medios cromatográficos

Se prepararon disoluciones del 2% de cada uno de alcohol bencílico y etanol en fosfato de sodio 25 mM, dibásico, y se valoraron hasta pH 6 con ácido acético. Se mantuvieron las disoluciones a temperatura ambiente y a 5-8°C durante 4 meses en botellas de polipropileno y se sometieron a prueba para determinar la concentración de alcohol bencílico y para determinar la capacidad bactericida con *E. coli* usando la determinación del efecto antimicrobiano mediante el método de unidades formadoras de colonias. No hubo pérdida detectable de alcohol bencílico ni pérdida de capacidad bactericida en los 4 meses.

Ejemplo 7. Estabilidad de medios cromatográficos almacenados en disoluciones antimicrobianas

Se aclararon varias veces medios cromatográficos Bakerbond™ XWP 500 PolyABx-35 (500 Å) (n.º 7586-02, lote A24804) con acetato de sodio- 100 mM ácido acético, pH 5, que contenían el 2% de alcohol bencílico y el 2% de etanol, luego se suspendieron en un volumen igual de la misma combinación de alcohol bencílico-etanol-tampón. Se dejó la suspensión a temperatura ambiente durante 2 años. El alcohol bencílico perdió menos del 2% de su concentración original basado en ensayos de absorbancia y se encontró que no habían perdido potencial bactericida detectable cuando se sometieron a ensayo mediante la determinación del efecto antimicrobiano mediante el método de unidades formadoras de colonias. Se sometió a prueba periódicamente el sorbente para determinar la capacidad y resolución de las proteínas de prueba y se encontró que no demuestra ningún cambio significativo durante hasta 2 años. Se midió la capacidad de PolyABX-35 mediante el método de interferencia usando gamma-globulina de conejo. En las mismas condiciones, la capacidad de interferencia del 10% a cero meses era de 54,5 mg/ml de resina y después de veinticuatro meses era de 54 mg/ml, indicando ningún cambio significativo en la capacidad de interferencia.

Ejemplo 8. Estabilidad de medios cromatográficos de afinidad almacenados en disoluciones antimicrobianas

Se aclararon varias veces medios cromatográficos de proteína A unida a sílice con acetato de sodio 100 mM -ácido acético, pH 6, que contenían el 2% de alcohol bencílico y el 2% de etanol, luego se suspendieron en un volumen igual de la misma combinación de alcohol bencílico-etanol-tampón. Se dejó la suspensión a 4-8°C durante 4 meses. El alcohol bencílico perdió menos del 2% de su concentración original basado en ensayos de absorbancia y se encontró que no había perdido potencial bactericida detectable cuando se sometió a ensayo mediante la determinación del efecto antimicrobiano mediante el método de unidades formadoras de colonias. Adicionalmente, los medios de afinidad perdieron ligando de la resina a los medios líquidos a una velocidad mucho más lenta a pH 6 y superior a la velocidad a pH inferiores a 6. Se midió la fuga de ligando con un ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La fuga de proteína A detectada mediante los ensayos de ELISA a los medios a pH 5,0 fue 2-3 veces superior que a pH 6,0 y casi 15 veces superior a pH 4,5 que a pH 6,0.

REIVINDICACIONES

1. Disolución antimicrobiana tamponada para el almacenamiento de sólidos cromatográficos, comprendiendo la disolución antimicrobiana tamponada desde el 1,5% hasta el 4% en peso de alcohol bencílico, del 0,5% al 4% en peso de alcohol etílico y desde el 92% hasta el 98% en peso de tampón de 50 mM a 200 mM para proporcionar una disolución a pH de 5,5 a 7,5.
2. Disolución antimicrobiana tamponada según la reivindicación 1, en la que el pH es pH 6,0.
3. Disolución antimicrobiana tamponada según la reivindicación 1, en la que la cantidad de alcohol bencílico es del 2% en peso y la cantidad de alcohol etílico es del 2% en peso.
4. Disolución antimicrobiana tamponada según la reivindicación 1, en la que el tampón se selecciona de citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, trietanolamina, TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), HEPES (N-(2-hidroxietil)piperizina-N'-(2- etanosulfonato) y MES (4-morfolina-etanosulfonato).
5. Disolución antimicrobiana tamponada según la reivindicación 1, que comprende el 2% en peso de alcohol bencílico, el 2% en peso de alcohol etílico y el 96% en peso de fosfato de sodio 100 mM, dibásico valorado hasta pH 6,0.
6. Método de almacenamiento de un sólido cromatográfico mientras se impide la infección del sólido que comprende retener el sólido cromatográfico en una disolución antimicrobiana tamponada según cualquier reivindicación anterior.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el sólido cromatográfico se selecciona de medios cromatográficos o equipo cromatográfico.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el sólido cromatográfico son medios cromatográficos.
9. Método según la reivindicación 6, para almacenar el sólido cromatográfico durante un periodo de hasta dos años.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el sólido cromatográfico son medios cromatográficos.
11. Método según la reivindicación 10, en el que el sólido cromatográfico son medios cromatográficos.
12. Producto que comprende un sólido cromatográfico y una disolución antimicrobiana tamponada, en el que la disolución antimicrobiana tamponada comprende desde el 1,5% hasta el 4% en peso de alcohol bencílico, del 0,5% al 4% en peso de alcohol etílico y desde el 92% hasta el 98% en peso de tampón de 50 mM a 200 mM para proporcionar una disolución un pH de 5,5 a 7,5.
13. Producto según la reivindicación 12, en el que el sólido cromatográfico se selecciona de medios cromatográficos o equipo cromatográfico.
14. Producto según la reivindicación 12, en el que la disolución antimicrobiana tamponada comprende el 2% en peso de alcohol bencílico, el 2% en peso de alcohol etílico y el 96% en peso de fosfato de sodio 100 mM, dibásico valorado hasta pH 6,0.