

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 306**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/291** (2006.01)  
**B01J 20/32** (2006.01)  
**B01D 15/08** (2006.01)  
**B01J 39/26** (2006.01)  
**B01J 20/26** (2006.01)  
**B01J 20/28** (2006.01)  
**B01J 20/285** (2006.01)  
**B01J 20/286** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2006 E 06254783 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1764152**

54 Título: **Perla adsorbente porosa asimétrica**

30 Prioridad:

**19.09.2005 US 718469 P**

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

**03.02.2016**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
290 CONCORD ROAD  
BILLERICA, MASSACHUSETTS 01821, US**

72 Inventor/es:

**CHENG, KWOK-SHUN;  
RAMASWAMY, SENTHILKUMAR;  
WANG, CHEN;  
BIAN, NANYING;  
GAGNON, BRIAN;  
UMANA, JOAQUIN;  
AQUINO, DENNIS;  
SOICE, NEIL P. y  
LYDDIATT, ANDREW**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 558 306 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Perla adsorbente porosa asimétrica

**Fundamentos de la invención**

La presente invención se refiere a perlas porosas asimétricas adecuadas para uso cromatográfico.

5 Las biomoléculas tales como proteínas, polipéptidos y fragmentos de biomoléculas han llegado a ser agentes importantes para aplicaciones farmacéuticas y de diagnóstico. En la actualidad, la purificación de biomoléculas con frecuencia implica múltiples etapas, incluyendo cromatografía. La síntesis y el uso de medios cromatográficos porosos para separaciones de biomoléculas están bien documentados. Con frecuencia, las etapas cromatográficas se realizan usando lechos empaquetados de perlas en los que se separa un producto o impureza de la corriente de alimentación. Estas perlas son generalmente una matriz de base (tal como un polisacárido, polímero o material sintético, cerámica, vidrio o un material compuesto de lo anterior) que contiene o ha sido modificada con funcionalidad que interactúa con la biomolécula por medios químicos o físicos; proporciona una “fuerza impulsora” para unión o interacción. Esta serie compleja de interacciones contribuye a cómo realiza el medio en la separación deseada. La capacidad de los medios para influir en una separación determinada entre biomoléculas se refiere con frecuencia como la “selectividad de los medios”. Típicamente, estas matrices presentan una porosidad que permite que la biomolécula de interés acceda al volumen interno de la partícula. Esta porosidad interna es uniforme por toda la partícula.

Las separaciones cromatográficas se realizan típicamente en columnas empaquetadas con la matriz de separación en forma de perlas de material en forma de partículas. El tamaño de las partículas de los medios dicta la cinética de la separación, pero las partículas más pequeñas pueden dar como resultado alta contrapresión. Para poder separar moléculas grandes las partículas deberían tener grandes poros, pero los poros grandes reducen la estabilidad mecánica de las partículas, en particular con polisacáridos tales como agarosa. Los polisacáridos son ventajosos debido a que presentan típicamente poca unión a proteína, son fáciles de funcionalizar y pueden formar estructuras porosas. Convencionalmente, las perlas de polisacáridos se fabrican típicamente a partir de un polisacárido con una estructura de poro uniforme o “simétrica” por toda la perla. Los ejemplos de estas perlas “simétricas” incluyen (celulosa) Cellufine®, (agarosa) Sepharose® y (dextrano) Sephadex®. Estas perlas simétricas unen moléculas por toda la estructura interna de la perla. El entorno químico (tamaño de poro, hidrofobicidad, tipo de ligando y densidad de ligandos) es esencialmente uniforme dentro de la estructura interna. Por lo tanto, la naturaleza del entorno de unión por toda la perla es uniforme. En estos sistemas, la fuerza impulsora para la separación viene de la diferencia en resistencia a la unión entre biomoléculas absorbidas. Típicamente, cuando se usa una resina simétrica, la optimización de la resistencia a la unión por control de las condiciones del tampón es la única fuerza impulsora para conseguir la separación deseada. Además, los materiales de polisacárido son inherentemente compresibles y con frecuencia requieren modificación química para reducir la compresibilidad tal como por reticulación.

Otra propiedad de una resina simétrica es la resistencia mecánica de los medios, que es un resultado del material, la estructura de poro y la modificación química. Típicamente para los polisacáridos, cuanto menor es el tamaño de poro de los medios, mayor es la resistencia mecánica debido a mayor concentración de material sólido (porosidad menor). Sin embargo, cuanto menor es el tamaño de poro, más impedida está la transferencia de masa de especies mayores (tales como IgG) en el adsorbente. Por lo tanto, el diseño de los medios simétricos con frecuencia implica la optimización/compensación de rigidez de partícula y transferencia de masa de biomoléculas. Este problema de optimización se complica además por el hecho de que la permeabilidad de una perla simétrica es el resultado del tamaño y la distribución de tamaño de la partícula. A medida que el tamaño de partícula se hace más pequeño, la superficie externa de la partícula aumenta y por lo tanto también la transferencia de masa. Durante la elución, la partícula más pequeña permite un tiempo de difusión menor fuera de los medios, produciendo así un pico de elución estrecho, más concentrado. Sin embargo, esta mejora de la transferencia de masa es a costa de la permeabilidad, que restringe las dimensiones de la columna y el rendimiento de los medios.

En muchas separaciones de biomoléculas, la especie de interés (molécula fijada como objetivo) es la especie más concentrada en la materia prima. En otras palabras, las impurezas son sólo un pequeño porcentaje de la mezcla total que se tiene que separar. Con medios de cromatografía simétricos, la separación está influida con frecuencia por la unión de la molécula fijada como objetivo y algunas de las impurezas y separación después de la impureza usando la condición de elución para diferenciar las especies. Si las dos especies son muy similares en su resistencia a la unión a los medios, incluso si las proteínas son diferentes en tamaño, la separación puede ser muy difícil. En algunos casos, la difícil naturaleza de la separación es el resultado del número limitado de fuerzas impulsoras que influyen en la purificación. El resultado final es un rendimiento menor de proteína purificada a partir de una separación incompleta o que otra etapa cromatográfica sea entonces esencial para purificar más la molécula fijada como objetivo usando un medio diferente con diferentes fuerzas impulsoras para la separación. Esto exige tiempo, es ineficaz y caro.

Las perlas de polisacárido cargadas están establecidas para usos que incluyen cromatografía en lecho expandido o en lecho fluidizado. Típicamente, estos materiales se fabrican por adición de una esfera sólida o no porosa al polisacárido (típicamente agarosa) durante la formación de la perla. De esta manera, se puede formar una perla con

una o más partículas no porosas encapsuladas en el interior del material de polisacárido. Otra técnica común es recubrir la partícula sólida con un material que eventualmente llega a ser el absorbente. La partícula sólida no tiene ninguna función en la capacidad de las proteínas o las propiedades de separación de la perla. La partícula actúa típicamente sólo para modificar la densidad de la perla de manera que el material se pueda usar para aplicaciones de lecho no empaquetado. En algunos casos la partícula sólida proporciona rigidez y/o volumen de gel reducido.

Recientemente, se han desarrollado materiales con las denominadas "tapas" o una capa externa de polisacárido no absorbente usadas para restringir la entrada a la estructura porosa, para evitar la unión de moléculas grandes al tiempo que se mantiene la capacidad para especies más pequeñas. Estos materiales presentan capacidades muy bajas para moléculas mayores ya que su superficie interna no está disponible para la unión para ambas especies.

El trabajo previo ha mostrado posible modificar una estructura de polisacáridos simétrica con una modificación química de una manera asimétrica. Esta técnica permite la creación de un entorno químico cambiante dentro de la perla. Típicamente, la modificación se usa para proporcionar una capa neutral en el exterior de la perla. Esto evita el ensuciamiento del exterior de la perla, especialmente en corrientes de alimentación sucias tales como las encontradas en absorción en lecho expandido (EBA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, esta técnica no cambia el tamaño de poro de la perla, dando como resultado por lo tanto un tamaño de poro simétrico por toda la perla.

También se han desarrollado métodos para modificar el tamaño de poro de medios cromatográficos porosos. Usando estas técnicas, es posible la creación de una distribución bimodal de tamaños de poro. Sin embargo, esta estructura de poro se distribuye uniformemente por toda la perla y por lo tanto no crea regiones químicamente únicas dentro de la perla para ajustar/modificar la selectividad observada.

Se tiene en cuenta la publicación de patente europea EP 0266580-A2 (Excorim KB) que describe un método para recubrir partículas sólidas con un gel hidrófilo, caracterizado por que como dichas partículas se eligen partículas hidrófilas que se mezclan con una sustancia formadora de gel a una temperatura que está por encima de la temperatura de gelificación. La sustancia formadora de gel se fabrica para cubrir cada partícula individual, tras lo cual las partículas se separan entre sí y se enfrían a una temperatura que está por debajo de la temperatura de gelificación. La invención también se refiere a partículas recubiertas de la manera ya mencionada. Las partículas recubiertas de gel así obtenidas se pueden usar como tales en diversos procedimientos de separación, por ejemplo como intercambiador de iones, si la sustancia formadora de gel contiene grupos cargados. Alternativamente, las partículas recubiertas de gel se pueden proporcionar con posterioridad con grupos adsorbentes adecuados, por ejemplo grupos de intercambio iónico, grupos hidrófobos o grupos con bioespecificidad. Son ejemplos de tales grupos inhibidores de enzimas, enzimas, anticuerpos y proteína A de staphylococcus Aureus.

También se tiene en cuenta la patente de Estados Unidos US 4732811 (Yeda Research & Development) que describe perlas de polialdehído y agarosa y agar, magnéticas y no magnéticas, con diámetros que oscilan de 40 micrómetros hasta 1 cm y procedimientos para la síntesis de tales perlas. Los compuestos de polialdehído, por ejemplo, poliácroleína, polimetacroleína o poliglutaraldehído, se usaron como microesferas o como polvos. Las perlas de agarosa-polialdehído son capaces de unirse mediante enlaces covalentes en una sola etapa, por sus grupos aldehído, compuestos que contienen grupos amino primario de grupos tiol, tales como proteínas, anticuerpos, enzimas y fármacos. Las perlas son útiles para diversas aplicaciones biológicas, por ejemplo, cromatografía de afinidad, hemoperfusión, resinas de intercambio iónico, etiquetado de células, fines de diagnóstico y separación de células.

De acuerdo con esto, se requiere un mejor diseño de los medios para mejorar las purificaciones de biomoléculas en el que se conduzca la separación mediante más de una característica de la biomolécula.

### Sumario de la invención

De acuerdo con la invención se proporciona una partícula de cromatografía asimétrica que comprende agarosa según la reivindicación 1, en la que la partícula comprende una región interna y una región externa, teniendo la región interna una distribución de tamaño de poro menor que la de la región externa y en la que la concentración de agarosa en la región interna es mayor que la concentración de agarosa en la región externa. La región interna está constituida por 11% a 19% de agarosa y que en la región externa está constituida por 2% a 10% de agarosa. Preferiblemente, la región interna está constituida por 15% de agarosa y la región externa está constituida por 6% de agarosa.

Preferiblemente, la región interna comprende una o más primeras características seleccionadas del grupo que consiste en: densidad de ligando, tipo de ligando, mezcla de ligandos y material de los medios y la región externa comprende una o más segundas características seleccionadas del grupo que consiste en: densidad de ligando, tipo de ligando, mezcla de ligandos y material de los medios, en la que una o más primeras características de la región interna son diferentes de una o más segundas características de la región externa. Lo más preferiblemente, la primera y la segunda característica es densidad de ligandos.

La invención también proporciona una población de perlas que comprende las partículas.

Los problemas de la técnica anterior se han superado por la presente invención, que proporciona un medio de

5 cromatografía asimétrico adecuado para aplicaciones de separaciones, en particular como medios de cromatografía de lecho empaquetado, lecho fluidizado o lecho magnetizado. Los medios de cromatografía asimétricos comprenden partículas asimétricas, preferiblemente perlas, que tienen al menos dos capas distintas, teniendo en general cada una distintas distribuciones de tamaño de poro controladas. La región externa es preferiblemente un recubrimiento sobre la partícula. Estas distribuciones de tamaño de poro distintas se pueden modificar con grupos funcionales uniformes o alternativamente únicos o mezclas de grupos funcionales. La presente invención permite el control sobre la distribución de tamaño de poro dentro de una partícula porosa asimétrica proporcionando una región interna distinta, preferiblemente en forma de una perla y una región externa distinta, preferiblemente en forma de un recubrimiento sobre la perla.

10 Las perlas asimétricas de acuerdo con la presente invención proporcionan rigidez y permiten controlar la ruta de transferencia de masa de medios de lecho empaquetado. Un medio rígido se puede apilar más alto, consiguiéndose así una mayor capacidad de absorción o intercambio, completa, para la columna. Acortando la ruta de difusión, el gel se puede utilizar a una eficiencia mucho mayor que las perlas homogéneas. En ciertas condiciones de operación, las perlas de núcleo pueden dar como resultado picos de elución más agudos y menos consumo de tampón. Otro aspecto de esta invención es la capacidad para tener una perla con dos regiones distintas, teniendo cada una una o más características que son diferentes entre sí. Por ejemplo, puede ser tipo de ligando, densidad o mezcla, usada en cada región (cuando se prepara una perla de agarosa) y similar que difiere.

15 Otra aplicación de las perlas de núcleo de la presente invención es en cromatografía en lecho fluidizado o cromatografía magnética donde el núcleo proporciona la densidad requerida (para lechos fluidizados) o las propiedades magnéticas para la cromatografía magnetizada.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una vista en sección transversal de una perla de agarosa simétrica y una perla de agarosa asimétrica y

25 La figura 2 es una vista esquemática de una serie de perlas asimétricas de acuerdo con una realización de la presente invención.

**Descripción detallada de la invención**

30 El medio cromatográfico asimétrico de acuerdo con la presente invención permite el ajuste de las propiedades mecánicas y la selectividad de los medios para proporcionar materiales mejorados particularmente adecuados para separaciones de biomoléculas. En una realización preferida, el medio incluye dos distribuciones de tamaño de poro controladas, distintas, con modificación química única para cada región de tamaño de poro. Una distribución de tamaño de poro distinta se sitúa en una región interna de los medios y la otra se sitúa en una región externa tal como un recubrimiento. El tamaño de los poros no está limitado en particular; por ejemplo, el tamaño de poro interno puede ser suficientemente pequeño para adsorber sólo eficazmente biomoléculas pequeñas (por ejemplo, peso molecular menor que 10 KD) o puede ser suficientemente abierto para biomoléculas grandes. Los tamaños de poro internos y externos se pueden extender por un intervalo necesario para influir en una separación cromatográfica mejorada.

35 Las perlas se pueden formar de la producción de agarosa o pueden ser un material compuesto de agarosa con uno o más materiales, preferiblemente materiales porosos, seleccionados de: vidrio y polímeros naturales y sintéticos tales como copolímero de estireno-divinilbenceno, derivados de agarosa, agar, alginato, celulosa, derivados de celulosa, dextrano, almidón, carragenina, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma tragacanto, goma karaya, goma garrofín, goma xantana, pectinas, mucinas, heparinas y gelatinas. Se puede incluir carga para controlar la densidad, por ejemplo. La distribución de tamaño de poro se puede controlar variando la concentración de agarosa. Por ejemplo, una concentración mayor de agarosa dará como resultado un tamaño de poro menor y así la región interna puede ser 15% agarosa mientras que la capa de recubrimiento externa puede ser 6% agarosa. Dicha capa externa adsorberá por lo tanto proteínas grandes, tales como IgG, mientras que la capa de núcleo interna excluye eficazmente (dentro de las escalas de tiempo de la separación cromatográfica) proteínas grandes.

Más específicamente, los núcleos de las partículas de la presente invención pueden ser una perla de agarosa reticulada. Preferiblemente, cuando la perla acabada tiene que presentar alta rigidez, el núcleo tiene una composición que no funde a las temperaturas usadas en el procedimiento de fabricación y que sea autosuficiente.

40 Los núcleos son preferiblemente de una forma de material en forma de partículas en general esférica o irregular. Su diámetro depende del tamaño de perla que se desee, pero preferiblemente es de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros de diámetro.

45 Como es común en la fabricación de perlas de agarosa, se pueden usar varios aditivos para mejorar la producción o añadir una propiedad a las perlas. Una clase de aditivos comprende compuestos orgánicos volátiles, miscibles con la disolución. Son ejemplos alcoholes monohídricos tales como metanol, etanol y propanoles. Estos se pueden usar hasta concentraciones que proporcionan una disolución ligeramente turbia. También se pueden usar cetonas miscibles tales como acetona, pero se debe tener cuidado ya que la solubilidad de la agarosa es menor en mezclas

de cetona-agua. También se considera cualquier mezcla de dos o más de estos materiales.

Una clase más de aditivos comprende compuestos orgánicos miscibles no volátiles. Ejemplos no limitantes de éstos incluyen: glicerina, etilenglicol, metilpentanodiol, dietilenglicol, propilenglicol, trietilenglicol, los metil, etil o n-butil éteres de etilenglicol, los dimetil o dietil éteres de etilenglicol, acetato de etilenglicol dimetil éter, acetato de etilenglicol dietil éter, dietilenglicol metil éter, dietilenglicol etil éter, dietilenglicol n-butil éter, dietilenglicol dimetil éter, dietilenglicol dietil éter, acetato de dietilenglicol dimetil éter, acetato de dietilenglicol dietil éter, N-metilmorfolina, N-etilmorfolina y similares. Polietilenglicoles de peso molecular bajo son también ejemplos de materiales que están en esta clase. También se considera cualquier mezcla de dos o más de estos materiales.

Otra clase de aditivos comprende polímeros solubles en agua, que incluyen como ejemplos, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polietilenglicoles, dextranos y poliácilamidas solubles en agua, incluyendo poliácilamidas sustituidas, tales como polidimetilacrilamida. Estos aditivos poliméricos se pueden usar como mezclas con la agarosa en la etapa de disolución inicial o se pueden disolver en la disolución después de la adición y la disolución de la agarosa. Se debe tener cuidado para no añadir una cantidad excesiva de polímero, ya que puede tener lugar coagulación de la disolución. Son posibles las relaciones de polímero a agarosa de desde aproximadamente 0,1 a 10. Los polímeros preferidos son alcohol polivinílico, dextranos y poliácilamidas.

La agarosa, puede ser reticulada si se desea por cualquiera de las químicas comúnmente usadas en la industria para reticular materiales que contienen múltiples grupos hidroxilo, tales como perlas de polisacáridos, siendo estas químicas como ejemplos no limitantes, epiclorohidrina u otros compuestos epoxídicos multifuncionales, varias químicas de bromilo u otros haluros multifuncionales; formaldehído, gluteraldehído y otros aldehídos multifuncionales, bis(2-hidroxietil)sulfona, dimetildicloro-silano, dimetilolurea, dimetiloletilurea, diisocianatos o poliisocianatos y similares.

Puede presentar también una o más funcionalidades aplicadas a la misma, incluyendo ligandos, tales como Proteína A o Proteína G, versiones naturales o derivadas recombinatoriamente de versiones modificadas de proteína A o G para hacerlas más estables a la cáustica y similares, varios ligandos químicos tales como 2-aminobenzimidazol (ABI), aminometilbenzimidazol (AMBI), mercaptoetilpiridina (MEP) o mercaptobenzimidazol (MBI), o diversas químicas que hacen la agarosa catiónica, aniónica, filica, fóbica o cargada, como se conoce en la técnica de la formación de medios.

Los grupos funcionales usados en cromatografía líquida que son adaptables a la presente invención incluyen grupos tales como, pero no limitados a, grupos de intercambio iónico, bioafinidad, hidrófobos, útiles para cromatografía covalente, grupos de interacción tiofílicos, quelato o quelantes, grupos con interacciones denominadas pi-pi con compuestos fijados como objetivo, unión de hidrógeno, hidrófilos, etc.

Estos grupos se pueden añadir después de que se ha formado y reticulado la perla de agarosa o pueden ser añadidos a la disolución inicial y la composición de la disolución inicial se modifica de acuerdo con esto, tal como disminuyendo o elevando el pH, de manera que tenga lugar la reacción para unir los grupos funcionales a la agarosa de manera concurrente con la reacción de reticulación.

Estas funcionalidades se aplican comúnmente de dos maneras. Primero, estas funcionalidades se pueden aplicar con la adición de una molécula que contenga electrófilo que posea el grupo funcional deseado o un precursor del mismo. Típicamente, la matriz de base que contiene hidroxilo es activada con hidróxido de sodio, que permite reacción eficaz de la matriz de base con el electrófilo mencionado. Ejemplos no limitantes incluyen: ácido bromopropanosulfónico, propano sulfona, alil glicidil éter, bromuro de alilo, cloruro de glicidil trimetilamonio, butanodiol diglicidil éter, cloroacetato de sodio. Alternativamente, un grupo nucleófilo, tal como una amina o tiol, se puede añadir a la matriz de base usando métodos conocidos en la técnica y después se pueden usar los reactivos electrófilos anteriores para modificar la matriz de base. En segundo lugar, estas funcionalidades se pueden aplicar con activación de la matriz de base con un grupo electrófilo incluyendo los siguientes ejemplos no limitantes, bromuro de cianógeno, ácidos carboxílicos activados, aldehídos, ésteres, epóxidos tales como butanodiol diglicidil éter, epiclorohidrina, bromuro de alilo y alil glicidil éter, seguido por reacción de la matriz de base activada con la molécula nucleófila apropiada conteniendo la funcionalidad de elección. Estos nucleófilos pueden ser moléculas pequeñas tales como ácido aminopropanosulfónico o entidades mayores tales como polietilenimina o proteínas y péptidos. Además, todas las químicas anteriores se pueden añadir a la perla después de que se hayan unido brazos espaciadores hidrófilos o "tentáculos" tales como dextrano a la matriz de base. Esto proporciona superficie adicional para la unión y más cambios del tamaño de poro y el entorno químico dentro de la estructura asimétrica de la perla.

Los medios de cromatografía asimétricos de la presente invención ofrecen propiedades mecánicas mejoradas sobre las perlas simétricas. Muchos medios de cromatografía comunes formados a partir de polisacáridos son compresibles. Esta compresibilidad se determina inicialmente por la porosidad del material. Por ejemplo, las perlas de agarosa comerciales son típicamente 4-6% agarosa, que significa que las partículas son porosas al 96-94%. Sin modificación química, estos materiales presentan aplicaciones cromatográficas muy limitadas. Aunque después de reticulación extensa, estos materiales pueden ser suficientemente rígidos para muchas aplicaciones, cuanto más porosa sea la perla de polisacárido inicial, más limitadas serán sus propiedades mecánicas. Con los medios asimétricos de la presente invención, si la perla interna es mucho menos porosa que la estructura de poro externa,

- las propiedades mecánicas de la región interna son mucho mayores que las de la región externa. Bajo estrés mecánico, la región externa se comprimirá como sus contrapartidas simétricas. Sin embargo, después de la compresión inicial, las regiones internas de perlas adyacentes empezarán a ponerse en contacto entre sí, como se muestra en forma de diagrama en la Figura 2. Este “contacto puntual” de las regiones internas conduce a un lecho empacado con la compresibilidad mecánica de la estructura interna de la perla. Debido a que esta estructura interna puede ser menos porosa y más rígida, el efecto neto es una estructura externa más porosa o abierta con la compresibilidad mecánica del lecho de un material mucho más rígido. Si se usa un material incompresible como la estructura interna de poro, entonces el lecho de cromatografía resultante será incompresible después de “contacto puntual” de las estructuras internas.
- La selectividad de los medios cromatográficos para una biomolécula determinada o mezcla de la misma, está gobernada por una compleja serie de factores incluyendo tipo de ligando, densidad de ligandos, tamaño de poro de los medios, hidrofobicidad de los medios, etc. La selectividad de una perla simétrica se podía considerar como “unidimensional” debido a que el entorno de unión en la perla es uniforme. Por lo tanto, la selectividad de los medios se conduce por la capacidad de cada biomolécula individual para interactuar dentro del mismo entorno de unión. En otras palabras, “interacciones específicas de las moléculas” (carga neta de las especies, hidrofobicidad, unión de hidrógeno, etc.), tamaño no molecular, conducen la separación de las diferentes biomoléculas. Una ventaja de una perla de cromatografía asimétrica es que el material contiene al menos dos entornos químicos/de unión distintos en los que se pueden unir las especies. Esta estructura puede ser creada variando 1) el tamaño de poro entre las estructuras de poro interna y externa, 2) el tipo de ligando, la densidad de ligandos y/o mezcla de ligandos, 3) material de los medios (por ejemplo, exterior más filico/interior más fóbico) y combinaciones de 1), 2) y 3). Estos materiales proporcionan selectividad “bidimensional”, debido a que la separación se conduce no sólo por las interacciones específicas de las moléculas sino también por al menos dos regiones distintas dentro de los medios. Por ejemplo, una especie de unión más débil se concentrará probablemente en un entorno de unión más fuerte o pueden ser excluidas especies mayores de la estructura interna del poro.
- Un ejemplo específico de una aplicación de los nuevos medios de la presente invención es la separación de un Mab de proteínas de célula huésped (HCP, por sus siglas en inglés). Los Mab son proteínas de peso molecular mayor (160 kD) y no pueden difundir fácilmente en geles de agarosa al 15%. De acuerdo con esto, una perla de agarosa al 6% con una perla interna de agarosa al 15% proporciona un “sumidero” de impurezas en el que se puede adsorber HCP a una región (con una modificación química posiblemente única) mientras que el Mab se absorbería a la estructura al 6%. Esto proporciona eliminación mejorada de impureza común de HCP. Para maximizar la capacidad de unión de la proteína deseada (Mab), la región de tamaño de poro menor (la región de sumidero) se puede minimizar al 20% del volumen total y la región de poro más abierto de la perla de agarosa se puede modificar con “tentáculos” de un portador de ligando hidrófilo tal como dextrano. Esto puede doblar la capacidad de la perla de agarosa para Mab.
- Otra ventaja es que la región externa puede estar limitada en espesor (1-15 micrómetros) para permitir una ruta de difusión menor durante la elución. Esto puede proporcionar un pico de elución más estrecho y posiblemente mejor resolución.

Un procedimiento adecuado para preparar los medios de la presente invención implica disolver/fundir el material de los medios de agarosa en un líquido adecuado, añadiendo núcleos que contienen agarosa preferiblemente en forma de perla, de manera que los núcleos se recubran con la agarosa, mezclándose los núcleos recubiertos con un líquido hidrófobo para formar una emulsión y manteniendo esa emulsión a una temperatura igual a, o mayor que, el punto de fusión de la agarosa, haciéndola pasar por un mezclador estático para crear gotitas de agarosa y solidificando las gotitas de agarosa en un segundo baño de líquido hidrófobo. Las perlas se pueden lavar después y usar o tratar además para reticular la agarosa y/o añadir diversas funcionalidades sobre la agarosa como es conocido en la técnica.

### Ejemplos

Ejemplo 1A. (Ejemplo de Referencia). Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y tamaño de poro uniforme.

- Se recubrió SP-Sepharose Fast Flow (agarosa reticulada al 6%) con una capa de 10-15 micrómetros de agarosa al 6% de acuerdo con el siguiente método: se mezclaron después 50 ml de las perlas en 300 ml de disolución de agarosa al 6% (Agarosa D-5 de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla de perlas de agarosa a 1.000 ml de aceite de parafina a 90°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa es continua. Después se bombeó la emulsión a través de un mezclador estático Kenics (KMR-SAN-12) de 0,5 pulgadas (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de agarosa resultantes presentaron un espesor de capa externa estimado de 10 µm y la población de perlas fue predominantemente de un solo núcleo (>50%). Se sedimentaron las perlas, se lavaron con agua, etanol y después agua. Se reticularon las perlas de acuerdo con el método descrito en Porath, Jerker and Janson, Jan-Christer and Laas, Torgny, *Journal of Chromatography*, 60 (1.971) Pág. 167-177. Después se modificó la perla con ácido bromoporanansulfónico (BPSA, por sus siglas en inglés). En un tarro, se añadieron 10 g de perlas, 30 ml de NaOH 5 M, 7,2 g de BPSA y se agitó durante la noche a 50°C. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua de calidad

Milli-Q y se repitió el procedimiento de BPSA por segunda vez. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%.

#### Ejemplo 1B. (Ejemplo de Referencia)

5 Se recubrió SP-Sepharose Fast Flow (agarosa reticulada al 6%) con una capa de 10-15 micrómetros de agarosa al 6% como se discutió en el Ejemplo 1A. Se reticularon las perlas de acuerdo con el método descrito en Porath, Jerker and Janson, Jan-Christer and Laas, Torgny, *Journal of Chromatography*, 60 (1.971) Pág. 167-177. Después se modificó la perla con ácido bromoporanosulfónico (BPSA). En un tarro, se añadieron 10 g de perlas, 30 ml de NaOH 5 M, 7,2 g de BPSA y se agitó durante la noche a 50°C. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua de calidad Milli-Q y se repitió el procedimiento de BPSA tres veces adicionales. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%.

#### Ejemplo 1C. (Ejemplo de Referencia)

15 Se recubrió SP-Sepharose Fast Flow (agarosa reticulada al 6%) con una capa de 10-15 micrómetros de agarosa al 6% como se discutió en el Ejemplo 1A. Se reticularon las perlas de acuerdo con el método descrito en Porath, Jerker and Janson, Jan-Christer and Laas, Torgny, *Journal of Chromatography*, 60 (1.971) Pág. 167-177. Después se modificó la perla con alil glicidil éter (AGE). En un tarro, se añadieron 10 g de perlas, 10 ml de NaOH 8 M, 2 g de AGE, 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se agitó durante la noche a 25°C. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua de calidad Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%.

#### Ensayo de selectividad

20 Se usaron dos proteínas de diferente carga neta y peso molecular para ensayar la naturaleza de la selectividad o el factor de separación en condiciones típicas de intercambio de cationes (CEX, por sus siglas en inglés). Se aplicaron pulsos de una mezcla de proteínas conteniendo 0,5 mg/ml de IgG policlonal (Sigma) y 0,5 mg/ml de lisozima (Sigma) en tampón de acetato 50 mM con NaCl para proporcionar una conductividad de 10 mS a pH 4,5, a cada columna de muestra a 200 cm/h (7 cm de altura de lecho, 0,66 cm de diámetro). Después se eluyó el pulso a 200 cm/h usando un gradiente de NaCl de 20 VC empezando a 10 mS y terminando a 80 mS. Se registró el pico para cada proteína en términos de volúmenes de columna (VC) desde el comienzo del gradiente de elución (el volumen muerto fue corregido). Los datos para la separación de los picos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

Muestra	Pico de IgG (VC)	Pico de lisozima (VC)	Separación de pico (VC)
Ejemplo 1A	9,36	13,46	4,1
Ejemplo 1B	9,63	14,03	4,4
Ejemplo 1C	9,95	13,65	3,7
SP-Sepharose Fast Flow	9,95	13,85	3,9

30 La Tabla indica las posiciones de los picos en el gradiente de elución tanto para IgG como para lisozima. Cuanto más prolongado el retraso en la elución (mayor VC), más fuertemente está unida una especie al medio. Se diseñó que los medios tengan diferentes entornos químicos, principalmente la densidad de los ligandos de sulfopropilo. La diferencia en densidad de ligandos entre la región de agarosa externa y la región interna aumenta en el siguiente orden: Ejemplo 1C < Ejemplo 1B < Ejemplo 1A. Hay muy poca diferencia entre la densidad de ligandos interior y la densidad de ligandos exterior en el Ejemplo 1C, teniendo cada una una química esencialmente idéntica. La posición del pico de IgG sigue esta tendencia general. La elución del pico de IgG tiene lugar primero para la perla con la densidad de ligandos más baja en la capa más externa, mientras que para el Ejemplo 1C la elución tiene lugar de manera idéntica para la estructura de perla interna sola (control de SP-Sepharose). Curiosamente, la lisozima y la separación de picos no muestran la misma tendencia simple. Sin embargo, es claro que la separación de picos es mayor para las perlas asimétricas con regiones químicas únicas dentro de la estructura de la perla.

## Ejemplo 2 (Ejemplo de Referencia)

Se reticularon perlas de agarosa (ABT Technologies) que contenían agarosa al 10% según Porath, et al., anterior. Después se modificó la perla con ácido bromopropano sulfónico (BPSA). En un tarro, se añadieron 100 g de perlas, 300 ml de NaOH 5 M, 72 g de BPSA y se agitó durante la noche a 50°C. Se lavaron las perlas con 1.500 ml de agua de calidad Milli-Q y se repitió el procedimiento de BPSA dos veces más. Se lavaron las perlas con 1.500 ml de agua Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%. Se recubrieron después las perlas con una capa de agarosa al 6% para formar perlas de agarosa asimétricas de acuerdo con el siguiente método: se mezclaron después 100 ml de las perlas en 600 ml de disolución de agarosa al 6% (Agarosa D-5 de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla de perlas de agarosa a 2.000 ml de aceite de parafina a 90°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa es continua. Después se bombeó la emulsión a través de un mezclador estático Kenics (KMR-SAN-12) de 0,5 pulgadas (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de agarosa resultantes presentaron un espesor de capa externa estimado de 10  $\mu$ m y la población de perlas fue predominantemente de un solo núcleo (>50%). Se sedimentaron las perlas, se lavaron con agua, etanol y después agua. Se reticularon estas perlas de acuerdo con Porath, et al., anterior. Después se trataron las perlas con cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC, por sus siglas en inglés). En un tarro, se añadieron 100 ml de perlas a 100 ml de GTMAC al 75%. Después de mezclado, se añadieron 3,3 ml de NaOH al 50% y se agitó la reacción durante la noche a 25°C. Se lavaron las perlas con 1.500 ml de agua Milli-Q. Después se recubrieron las perlas con de nuevo otra capa de agarosa al 6%. Las perlas mostraron después una mezcla de dos tintes: azul de metileno (1 mg/ml) y ponceau S (1 mg/ml) en agua Milli-Q. Una muestra de perlas mostró sólo azul de metileno como control. Se lavaron las perlas con agua Milli-Q tres veces (100 ml). La posición del tinte se registró usando una cámara digital adaptada a una lente de microscopio.

La región de agarosa al 10% central de BPSA (carga negativa) se ligó a tinte de azul de metileno. La segunda región está cargada positivamente (con GTMAC) y no se unió a azul de metileno. Sin embargo, con la exposición de la perla a una mezcla de azul de metileno y el tinte cargado negativamente ponceau S (color rojo), se observó una región central azul con una fuerte banda de rojo donde está la región de GTMAC. La región más externa neutra contenía algún tinte rojo residual de lavado incompleto, pero fue rojo menos intenso como se esperaba.

## Ejemplo 3

Ejemplo 3 A. Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y dos regiones de tamaño de poro distintas: preparación de estructura interna.

Se preparó una perla de agarosa al 15% usando el método siguiente: se añadieron 1.000 ml de disolución de agarosa al 15% (Agarosa D-5 de Hispanagar) a 2.000 ml de aceite de parafina que contenía 120 ml de emulsionante Span 80 en un primer baño de aceite a 80°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa es continua. Después se bombeó la emulsión a través de un mezclador estático Kenics (KMR-SAN-12) de 0,5 pulgadas (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en un segundo baño de aceite de parafina a 5°C. Las perlas de agarosa homogéneas esféricas se obtuvieron con un diámetro de partícula más grande de 200  $\mu$ m. Se sedimentaron las perlas, se lavaron con agua, etanol y después agua y se tamizaron para proporcionar un intervalo de tamaño de perla de 75-125  $\mu$ m. Después se reticularon las perlas de acuerdo con el método descrito en Porath, Jerker and Janson, Jan-Christer and Laas, Torgny, *Journal of Chromatography*, 60 (1.971) Pág. 167-177. Después se modificaron las perlas con aili glicidil éter (AGE). En un tarro, se añadieron 120 g de perlas, 150 ml de NaOH 8 M, 30 g de sulfato de sodio y 100 g de AGE y se agitó durante la noche a 45°C. Se lavaron las perlas con 3x500 ml de agua de calidad Milli-Q.

Ejemplo 3 B. Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y dos regiones de tamaño de poro distintas: preparación de estructura interna.

Se modificó una porción de las perlas preparadas en el Ejemplo 3A para crear un material de intercambio catiónico. Se modificaron las perlas con meta-bisulfito de sodio. En un tarro, se añadieron 60 g de perlas, 47 ml de agua Milli-Q, 7,9 g de NaOH al 50% en peso y 23,4 g de meta-bisulfito de sodio y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se lavaron las perlas con 3x500 ml de agua de calidad Milli-Q.

Ejemplo 3 C. Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y dos regiones de tamaño de poro distintas: preparación de estructura externa.

Se recubrieron las perlas del Ejemplo 3B con agarosa al 6% según el método siguiente: se mezclaron después 50 ml de las perlas en 300 ml de disolución de agarosa al 6% (Agarosa D-5 de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla de agarosa-perlas a 1.000 ml de aceite de parafina a 90°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa es continua. Después se bombeó la emulsión a través de un mezclador estático Kenics (KMR-SAN-12) de 0,5 pulgadas (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de agarosa resultantes tenían un espesor de capa externa estimado de 10  $\mu$ m y la población de perlas fue predominantemente de un solo núcleo (>50%). Se sedimentaron las perlas, se lavaron con agua, etanol y después agua y se tamizaron para proporcionar un intervalo de tamaño de perla de 75-125  $\mu$ m. Se reticularon las perlas de acuerdo con el método descrito en Porath, Jerker and Janson, Jan-

Christer and Laas, Torgny, *Journal of Chromatography*, 60 (1.971) Pág. 167-177. Se lavaron las perlas con 3x500 ml de agua de calidad Milli-Q.

Ejemplo 3 D. Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y dos regiones de tamaño de poro distintas: adición de ligandos de intercambio catiónico a estructura externa.

- 5 Se modificó después una porción de las perlas del Ejemplo 3C con ácido bromopropanosulfónico (BPSA). En un tarro, se añadieron 10 g de perlas, 30 ml de NaOH 5 M, 7,2 g de BPSA y se agitó durante la noche a 50°C. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua de calidad Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%.

Ejemplo 3 E. Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y dos regiones de tamaño de poro distintas: adición de ligandos de intercambio catiónico a estructura externa.

- 10 Se modificó después una porción de las perlas del Ejemplo 3C con ácido bromopropanosulfónico (BPSA). En un tarro, se añadieron 10 g de perlas, 30 ml de NaOH 5 M, 7,2 g de BPSA y se agitó durante la noche a 50°C. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua de calidad Milli-Q y se repitió el procedimiento de BPSA una vez adicional. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%.

- 15 Ejemplo 3 F. Perla de agarosa asimétrica con entornos químicos únicos y dos regiones de tamaño de poro distintas: adición de ligandos de intercambio catiónico a estructura externa.

Se modificó después una porción de las perlas del Ejemplo 3C con ácido bromopropanosulfónico (BPSA). En un tarro, se añadieron 10 g de perlas, 30 ml de NaOH 5 M, 7,2 g de BPSA y se agitó durante la noche a 50°C. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua de calidad Milli-Q y se repitió el procedimiento de BPSA dos veces adicionales. Se lavaron las perlas con 500 ml de agua Milli-Q y se almacenaron después en etanol al 20%.

- 20 Ensayo de selectividad

Se usaron dos proteínas de diferente carga neta y peso molecular para ensayar la naturaleza de la selectividad o el factor de separación en condiciones típicas de intercambio de cationes (CEX). Se aplicó una mezcla de una proteína conteniendo 0,5 mg/ml de IgG policlonal (Sigma) y 0,5 mg/ml de lisozima (Sigma) en tampón de acetato 50 mM con NaCl para proporcionar una conductividad de 10 mS a pH 4,5, a cada columna de muestra a 200 cm/h (7 cm de altura de lecho, 0,66 cm de diámetro) de manera que la proteína neta cargada en el medio fue 10 mg/ml. Después se eluyó la mezcla de proteínas a 200 cm/h usando un gradiente de NaCl de 30 VC empezando a 10 mS y terminando a 80 mS. Se registró el pico para cada proteína en términos de volúmenes de columna (VC) desde el comienzo del gradiente de elución (el volumen muerto fue corregido). Los datos para la separación de los picos se muestran en la Tabla 2:

- 30 Tabla 2

Muestra	Pico de IgG (VC)	Pico de lisozima (VC)	Separación de pico (VC)
Ejemplo 3D	19,7	25,7	6,6
Ejemplo 3E	18,6	26,7	8,1
Ejemplo 3F	18,7	26,8	8,1
SP-Sepharose Fast Flow	20,3	26,3	6

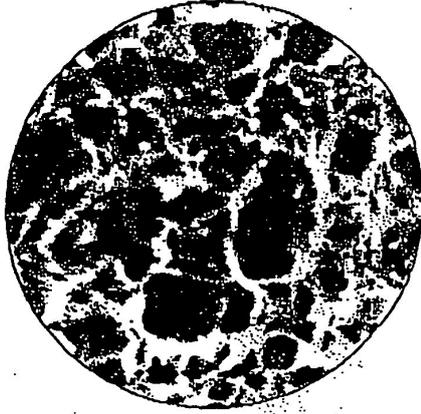
- 35 La Tabla 2 indica las posiciones de los picos en el gradiente de elución tanto para IgG como para lisozima. Cuanto más prolongado el retraso en la elución (mayor VC), más fuertemente está unida una especie al medio. Se diseñó que los medios tengan diferentes entornos químicos y físicos, principalmente la densidad de los ligandos de sulfopropilo y el tamaño de poro de la estructura interna. Para el Ejemplo 3D, la selectividad es similar a la de una resina comercial clásica (Sepharose Fast Flow). Sin embargo, los Ejemplos 3E y 3F muestran una separación aumentada de los dos picos de proteína como resultado de la estructura de perla asimétrica con regiones únicas de química y tamaño de poro.

Ejemplo 4. Perla de núcleo de agarosa.

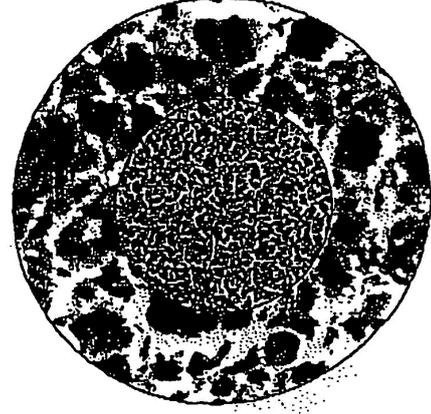
5 Se mezclaron 75 ml de perlas de agarosa reticuladas al 15% de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio con 100 ml de disolución de agarosa al 4% (Hispanagar D5) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla agarosa-perla a 2.000 ml de aceite de parafina a 80°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa es continua. Después se bombeó la emulsión a través de un mezclador estático Ross ISG de 0,5 pulgadas (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas asimétricas resultantes presentaron un espesor de la región externa estimado de 10  $\mu\text{m}$  y la población de perlas fue predominantemente de un solo núcleo (>60%).

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Una partícula de cromatografía asimétrica que comprende agarosa, en la que la partícula comprende una región interna y una región externa, teniendo la región interna una distribución de tamaño de poro menor que la de la región externa y en la que la región interna está constituida por desde 11 % a 19% de agarosa y la región externa está constituida por desde 2% a 10% de agarosa.
  2. La partícula según la reivindicación 1, en la que la región interna está constituida por agarosa al 15% y la región externa está constituida por agarosa al 6%.
  3. Una población de perlas que comprende partículas de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

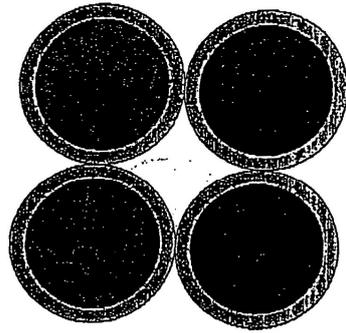


**Perla Agarosa  
Homogénea**

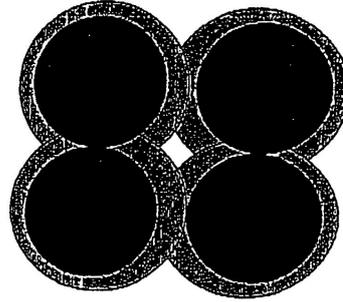


**Perla Agarosa  
Asimétrica**

**Figura 1.** Perla de agarosa homogénea o simétrica frente a agarosa asimétrica.



**Baja tensión:  
Compresibilidad  
gobernada por  
gel absorbente**



**Alta tensión:  
Compresibilidad  
gobernada por "contacto  
puntual" de núcleos**

**Figura 2.** Propiedades mecánicas mejoradas desde el "contacto puntual" de estructuras o núcleos de perlas, internos, menos compresibles.