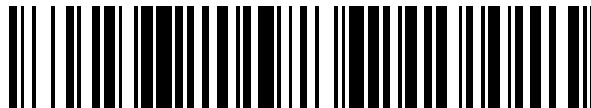


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 613**

51 Int. Cl.:

C08B 37/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2008** **E 08779289 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** **EP 2203481**

54 Título: **Método para la fabricación de geles de agarosa**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 915976 P

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

17.10.2016

73 Titular/es:

**BIO-WORKS TECHNOLOGIES AB (100.0%)
Virdings Allé 18
754 50 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

LINDGREN, GÖRAN EMANUEL SAMUEL

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 586 613 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

Método para la fabricación de geles de agarosa

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método simple y barato para fabricar geles de separación de agarosa, principalmente geles de agarosa derivatizados. Los geles obtenidos según la invención son adecuados como soportes o fases sólidas en diversos tipos de separaciones, en particular dentro de la biociencia y están preferiblemente reticulados.

Tecnología anterior

Los geles de agarosa para fines de separación han estado comercialmente disponibles durante al menos tres décadas. Derivatizando los geles básicos - tanto en forma reticulada o no reticulada - los geles se han usado en separaciones basándose en varios principios diferentes. Dos líneas de productos bien conocidas son Novarose (Inovata, Bromma, Suecia) y Sepharose (GE Health Care, Uppsala, Suecia).

El agar consiste en cantidades aproximadamente iguales de agarosa y agarpectina siendo ambas polisacáridos con subunidades alternas de anhidrogalactosa y galactosa, es decir, sus esqueletos de polisacárido son los mismos. La agarpectina está significativamente sulfatada y por tanto cargada negativamente. También está metilada, es decir, contiene grupos metoxilo. La agarosa está en esencia sin carga y sin grupos sulfato. Tanto agar, en particular agar desulfatado, como agarosa se sugirieron inicialmente como materiales de partida para la fabricación de geles de separación reticulados. Véase por ejemplo el documento US 3959251 (Porath *et al*). Sin embargo a lo largo de los años las personas se han centrado más en agarosa que en agar, más probablemente debido al alto contenido de grupos sulfato de agar (presentes en agarpectina) y los problemas con la eliminación de los grupos sulfato sin afectar negativamente a la calidad del material de base de agar.

Convencionalmente los geles de agarosa se obtienen enfriando una disolución caliente de agarosa hasta una temperatura por debajo de su temperatura de gelificación. La porosidad del gel variará dependiendo de la concentración de agarosa en las disoluciones de partida. Una concentración más alta llevará a un gel más denso (menor porosidad) que una concentración más baja. Incluyendo ciertos reactivos de estabilización en la disolución se estabilizará el gel obtenido, por ejemplo mediante reticulación. El gel puede obtenerse en diversas formas físicas tales como lecho plano, perlas, insertos etc. Geles de agarosa en formas particuladas se han obtenido emulsionando una disolución caliente de agarosa en un disolvente que es inmiscible en agua, enfriando la disolución por debajo de la temperatura de gelificación de agarosa, y recogiendo las partículas. Los tamaños de las partículas de gel dependerán de los tamaños de las gotitas en la emulsión que a su vez dependerán de la agitación, emulsificantes etc. En la práctica el proceso de emulsión se estudia en microscopía con el fin de decidir cuándo parar la etapa de emulsión. Principalmente se desea una cierta fracción de tamaño que puede lograrse tamizando después de haberse aislado las partículas. Incluyendo agentes de reticulación apropiados (principalmente solubles en agua) en la emulsión las partículas se estabilizarán y la temperatura de gelificación aumentará. El gel puede funcionalizarse introduciendo ciertos grupos o ligandos sobre el gel, por ejemplo grupos de afinidad (incluyendo grupos de intercambio iónico) para hacer el gel adecuado para la captación por afinidad tal como en cromatografía de afinidad, grupos enzimáticamente activos para hacer el gel adecuado para su uso en reactores de enzimas, grupos activados para permitir la introducción de cualquiera de los grupos previamente mencionados o como fase de soporte en síntesis de fase sólida etc.

Métodos ventajosos para producir geles de separación de agarosa rígidos a partir de agarosa y posiblemente derivatizándolos se proporcionan en por ejemplo el documento US 4665164 (Pernemalm *et al*), el documento US 4.973.683 (Lindgren G) y el documento WO 1994004192 (Lindgren G).

Existe un deseo general de evitar el uso de agarosa altamente purificada y costosa al fabricar geles de separación de agarosa, en particular formas reticuladas y/o derivatizadas de tales geles. Sería interesante tener un método simple para producirlos partiendo de material menos costoso sin perder en características de rendimiento en comparación con geles de separación de agarosa fabricados convencionalmente.

Todas las patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

60 Objetivo

El objetivo principal es proporcionar un método para producir geles de separación de agarosa que evita la necesidad de agarosa altamente purificada. Un método alternativo también debe ser tan simple como métodos previos y posible de llevar a cabo en el mismo tipo de equipo de procesamiento como se usa para métodos previos. Un método nuevo debe evitar etapas adicionales complicadas. Este objetivo en particular se aplica a variantes derivatizadas incluyendo entre otras variantes reticuladas.

Invención

5 El primer aspecto principal de la invención es un método para la fabricación de un gel de separación de agarosa. La característica distintiva principal es que el método comprende las etapas de:

- i) proporcionar una disolución de agar o agar parcialmente desulfatado (= material de agar de partida), y
- 10 ii) una, dos o más subetapas (ii.A, ii.B, ii.C etc.), cada una de las cuales comprende la desulfatación del material de agar para dar agarosa que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato que es menor del, preferiblemente $\leq 75\%$, del grado de sustitución de grupos sulfato en el material de agar de partida, por ejemplo agar natural,
- 15 iii) gelificar el material de agar disuelto antes de la etapa (ii) y/o asegurar de modo que el material de agar desulfatado esté en forma de gel al menos después de una o más de las subetapas de la etapa (ii), y obligatoriamente después de la etapa (ii).

20 En el contexto de esta memoria descriptiva el término "material de agar" se usará para agar natural y diversas formas parcialmente desulfatadas. Formas desulfatadas pueden usarse como material de agar de partida o aparecerse como productos intermedios durante el proceso. El producto final del método se denomina material de separación de agarosa.

25 Además de las subetapas de desulfatación (ii.A, ii.B, ii.C etc.) la etapa (ii) puede comprender otras subetapas, por ejemplo subetapas de una o más secuencias S (S_1 , S_2 etc.) que introduce cada una una estructura química por ejemplo una reticulación covalente, un grupo de afinidad, un grupo reactivo etc. véase a continuación. Posterior a o entre las subetapas que implican la reacción del material de agar (subetapas de desulfatación y subetapas de secuencias S) puede existir una o más subetapas en las que se eliminan reactivos en exceso y/o se purifica un producto intermedio deseado o el producto final de los subproductos y/o el exceso de reactivos. Si el material de agar está en forma de gel puede insertarse una subetapa de filtración/sedimentación y/o una subetapa de lavado y/o una subetapa de tamización etc. La tamización solo es aplicable si el material de agar del gel final está en forma de partículas y se usa para eliminar las fracciones de partículas por encima y/o por debajo de un cierto tamaño. Si el material de agar está en forma disuelta puede insertarse de manera similar una subetapa de diálisis y/o una subetapa de precipitación etc.

La disolución de agar de partida y gelificación (etapas (i) y (iii))

35 La disolución de agar en la etapa (i) se prepara disolviendo agar en agua caliente. El agar normalmente constituye $\leq 25\%$, tal como el $20\% \leq 15\% < 10\% \leq 7,5\% \leq 5\% \leq 4\% \leq 2\% \leq 1\% \leq 0,5\%$ (p/p) de la disolución. La concentración más baja es normalmente $\geq 0,01\%$ (p/p).

40 La temperatura de la disolución inicial está normalmente por encima de la temperatura de gelificación de agar, es decir \geq aproximadamente 30°C , tal como $\geq 32^\circ\text{C}$ antes de haberse llevado a cabo cualquiera de las etapas (ii) (iii).

45 La etapa (iii) se lleva a cabo simplemente enfriando la disolución por debajo de la temperatura de gelificación del material de agar. Si se desea llevar a cabo cualquiera de las subetapas de la etapa (ii) con el material de agar en forma de gel se prefiere que se inserte una subetapa de reticulación o bien antes de o bien durante tales subetapas (véase a continuación). La ventaja de trabajar con el material de agar en forma de gel es que, si se desea, el material puede aislarse fácilmente, lavarse, tamizarse (si está en forma de partícula) etc. entre las subetapas. Si el producto final es un gel, es mucho más ventajoso realizar ciertas etapas/subetapas o el proceso completo con el material en un estado gelificado, por ejemplo para incluir la reticulación del material de agar antes de o simultáneamente con la primera subetapa de desulfatación o al menos antes de lograrse el producto final del método. Véase a continuación en el apartado titulado "Introducción de estructuras químicas".

55 Un gel puede ser discontinuo o continuo. Se ilustran geles discontinuos con a) partículas de gel, por ejemplo una población o un lote de partículas de gel de agarosa, preferiblemente en forma de perlas, y b) gel de agarosa recubierto sobre la superficie exterior y/o las superficies interiores de los poros de partículas no porosas o porosas normalmente desarrollada a partir de material distinto de gel etc. Se ilustran geles continuos con a) un lecho plano de gel de agar o de gel de agarosa, y b) recubrimientos de gel de agar y de geles de agarosa sobre paredes internas de matrices integrales porosas, tales como insertos porosos, membranas porosas etc., y sobre paredes internas de estructuras en canal.

60 Perlas en el contexto de la invención significa cualquier tipo de partículas que comprende una forma redondeada con preferencia por esferoides incluyendo formas tales como esferas, gotas, nódulos, granos etc. Pueden haberse obtenido partículas de gel, por ejemplo en forma de perlas, gelificando una disolución de agar que está suspendida en un disolvente que es inmiscible en agua.

65 Si el gel de partida, es decir el gel formado en la etapa (iii) está en forma de partículas éstas tienen normalmente un

tamaño medio seleccionado dentro del intervalo de 1-1000 μm , tal como $\leq 500 \mu\text{m}$ o $\leq 200 \mu\text{m}$ o $\leq 100 \mu\text{m}$ o $\leq 50 \mu\text{m}$ o $\leq 25 \mu\text{m}$ y/o $\geq 10 \mu\text{m}$ o $\geq 15 \mu\text{m}$ o $\geq 25 \mu\text{m}$ o $\geq 50 \mu\text{m}$ o $\geq 100 \mu\text{m}$ o $\geq 200 \mu\text{m}$. Un lote de partícula típico a proporcionar en la etapa (i) tiene $\geq 40\%$, tal como $\geq 50\%$ o $\geq 75\%$ o $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ de sus partículas distribuidas dentro de un intervalo de tamaño con una anchura de $\leq 100 \mu\text{m}$, tal como $\leq 75 \mu\text{m}$ o $\leq 50 \mu\text{m}$ o $\leq 25 \mu\text{m}$ o $\leq 10 \mu\text{m}$. En lotes de partícula preferidos el 40%, tal como $\geq 50\%$ o $\geq 75\%$ o $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$, de las partículas tienen tamaños dentro del intervalo del tamaño medio $\pm 1000\%$, tal como $\pm 500\%$ o $\pm 100\%$ o $\pm 50\%$ o $\pm 25\%$ o $\pm 10\%$, del tamaño de partícula medio. En este contexto "tamaño" se refiere al diámetro de una partícula. Para una partícula irregular esto significa la distancia más grande entre dos lados de la partícula. Aunque el tamaño de partícula puede cambiar durante el método de la invención estos intervalos se aplican en principio también a las partículas obtenidas como un producto final del método inventivo (si también están en forma de partícula).

Las estructuras en canal están cubiertas o sin cubrir y tienen diversos tipos de sección transversal, tal como circular, triangular, rectangular etc. Las dimensiones de sección transversal puede estar en el intervalo de μm o mayor donde el intervalo de μm normalmente significa que al menos una dimensión de sección transversal es $\leq 5000 \mu\text{m}$, tal como $\leq 1000 \mu\text{m}$ y también cubre dimensiones de sección transversal $< 1 \mu\text{m}$. El término "estructura en canal" abarca tubos.

Eliminación de grupos sulfato (subetapas ii.A, ii.B, etc.)

La desulfatación (subetapas ii.A, ii.B, etc.) normalmente significa hidrólisis de grupos sulfato directamente a hidroxilos pero también incluye otros mecanismos y/o modos para disminuir el grado de sustitución de grupos sulfato. La desulfatación por tanto también abarca A) el reemplazamiento del grupo sulfato por un ion haluro o algún otro nucleófilo (si están presentes nucleófilos distintos de $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ durante una etapa de desulfatación) para reemplazar el grupo sulfato por un grupo que es eficaz como grupo saliente que puede reemplazarse por hidroxilo durante condiciones proporcionadas durante una etapa de desulfatación, o B) la transformación de un grupo sulfato en un sustituyente distinto de hidroxilo y estable durante las condiciones proporcionadas durante una etapa de desulfatación. Alternativamente (B) puede ilustrarse con la transformación de un grupo sulfato en diversos tipos de grupos unidos por de unión éter, tales como alcoxilo, alquenoxilo o hidroxilo alquenoxilo, por ejemplo metoxilo, etoxilo, propoxilo, propenoxilo (= alil éter), grupos hidroxilo, alcoxilo y alquenoxilo correspondientes con como máximo un oxígeno unido al mismo átomo de carbono (por ejemplo ataque nucleofílico del oxígeno del éster de sulfato, C-O-S, sobre el carbono de alilo), etc. La desulfatación normalmente tiene lugar a un pH ≥ 10 , preferiblemente ≥ 12 o ≥ 13 , preferiblemente con ion hidróxido en exceso. Concentraciones de ion hidróxido típicas son $\geq 0,1 \text{ M}$, tal como $\geq 1 \text{ M}$. Los hidróxidos usados son normalmente solubles, por ejemplo hidróxido de metal alcalino, tal como hidróxido de sodio o potasio. El pH así como la concentración y tipo de hidróxido de metal puede variar para las diferentes subetapas ii.A, ii.B, etc.

El número de subetapas para eliminar grupos sulfato depende de qué es aceptable con respecto a contenido en sulfato para el uso pretendido del producto final del método inventivo. Para una pequeña reducción, tal como hasta el 25%, una o dos subetapas ii.A, ii.B, etc podría ser suficiente. Para reducciones más significativas, tales como del 50% o más pueden requerirse 5, 6, 7 o más subetapas. Normalmente 3-10 subetapas ii.A, ii.B etc podrían ser suficientes. El contenido en sulfato o el grado de sustitución de grupos sulfato en el producto final del método debe ser normalmente $\leq 75\%$, tal como $\leq 50\%$ o $\leq 25\%$ o $\leq 10\%$ o $\leq 5\%$, del contenido en sulfato o grado de sustitución del material de agar de partida. El contenido en sulfato se mide normalmente como contenido en azufre.

El material de agar puede estar en estado gelificado o en estado disuelto durante una subetapa de desulfatación (ii.A, ii.B etc.). Si el producto final del método inventivo está en forma particulada, por ejemplo perlas, en la fecha de prioridad se prefiere realizar las subetapas de desulfatación (ii.A, ii.B etc.) con el material de agar en un estado gelificado en emulsión. Para asegurar el estado gelificado el material de agar puede someterse a reticulación antes de la primera subetapa de desulfatación o durante la secuencia de subetapas que contienen las subetapas de desulfatación (ii.A, ii.B etc.) o para realizar la reacción a una temperatura suficientemente baja por debajo de la temperatura de gelificación del material de agar. Se cree que para formatos físicos del producto final distintos de perlas pueden existir ventajas para trabajar con el material de agar en estado disuelto, aunque entonces también pueden existir ventajas para cambiar a un estado gelificado en ciertas etapas del método, por ejemplo cuando van a eliminarse reactivos en exceso del material de agar después de haberse llevado a cabo una subetapa de desulfatación, una subetapa de una secuencia de reticulación y/o una secuencia de reticulación y/o todas las subetapas de desulfatación.

Introducción de estructuras químicas (secuencias S_1 , S_2 etc. con subetapas ii.1₁, ii.2₁ etc.; ii.1₂, ii.2₂ etc.)

En variantes preferidas, la etapa (ii) puede comprender, además de las subetapas de desulfatación (ii.A, ii.B, ii.C etc.), una o más secuencias (S_1 , S_2 etc.) cada una de las cuales comprende una o más subetapas (ii.1₁, ii.2₁ etc.; ii.1₂, ii.2₂ etc.) para la introducción de una estructura química que puede ser diferente entre las secuencias y posiblemente estará presente en el producto final.

Dependiendo de la estructura que va a introducirse y las condiciones seleccionadas la introducción puede tener

lugar en una única subetapa o de manera gradual. Tres tipos principales típicos de estructuras químicas que pueden introducirse son: a) estructuras de reticulación, b) grupos de afinidad, tales como grupos de intercambio iónico, (véase (c) a continuación), y c) grupos que pueden usarse para funcionalización adicional, es decir grupos reactivos y/o activados. La funcionalización adicional abarca entre otros la introducción de grupos de afinidad que normalmente se seleccionan entre miembros de pares de afinidad tales como a) hapteno/antígeno y anticuerpos anti-hapteno/antígeno incluyendo diversos fragmentos de anticuerpo de unión a hapteno incluyendo formas recombinantes y formas de unión obtenidas mediante diversas técnicas combinatorias, por ejemplo *affibodies*, b) ácidos nucleicos complementarios, c) estructuras de carbohidrato y lectinas, d) proteínas microbianas de unión a Ig, tales como proteína A, G etc., y regiones constantes de inmunoglobulina, e) grupos quelantes y iones de metal, f) quelatos y proteínas/polipéptidos que contienen cisteína y serina, g) miembros de sistemas enzimáticos tales como enzimas como tal, sustratos, cosustratos, cofactores, coenzimas etc. (es decir, grupos enzimáticamente activos), h) grupos cargados complementarios (por ejemplo grupos de intercambio iónico) etc.

En variantes preferidas una o más de las subetapas de desulfatación (ii.A, ii.B, ii.C etc.) coincide por completo o al menos en parte con una subetapa (ii.1, ii.2 etc.) en al menos una de las secuencias (S₁, S₂ etc.). Esto significa que también se prefiere seleccionar la ruta para la introducción de una estructura química tratada anteriormente de manera que comprenda al menos una subetapa (ii.1₁, ii.2₁ etc.) que se lleva a cabo en condiciones de desulfatación, preferiblemente condiciones de desulfatación alcalinas.

En variantes preferidas una estructura química final y/o una estructura intermedia creadas en una subetapa de una secuencia S deben estabilizar física y/o químicamente la estructura de gel facilitando así la desulfatación durante la misma subetapa o una subetapa posterior. Estructuras de estabilización son normalmente de reticulación.

Si una secuencia S comprende dos o más subetapas (ii.1, ii.2 etc.) entonces la estructura química se introduce de manera gradual. Las subetapas individuales de una secuencia S pueden corresponder a:

subetapa ii.1) transformar una primera estructura en una segunda estructura donde la primera estructura está presente en el material de agar al inicio de la secuencia y/o se ha introducido como una estructura intermedia en una subetapa previa de la etapa (ii),

subetapa ii.2) transformar la segunda estructura en una tercera estructura que es una estructura intermedia,

subetapa ii.3) transformar la tercera estructura en una cuarta estructura que i) está presente en el material de agar después del final de la secuencia (es decir la cuarta estructura es igual a la estructura química deseada del producto final), o ii) es una estructura intermedia,

subetapa ii.4) posiblemente realizar las subetapas (ii.1-iii.4) un número de veces predeterminado, es decir una segunda vez, una tercera vez hasta haberse logrado la estructura química deseada y/o el grado de sustitución deseado de la estructura química deseada sobre el gel, es decir sobre el producto final (el gel de separación de agarosa).

Cuando las subetapas (ii.1)-(ii.4) se repiten un número de veces predeterminado las condiciones y/o reactivos correspondientes pueden diferir entre al menos dos, tres o más de los ciclos que se llevan a cabo en las subetapas (ii.1)-(ii.4). La diferencia puede ser, por ejemplo, con respecto a los reactivos usados. Si una subetapa (ii.1) en un ciclo por ejemplo utiliza un reactivo bifuncional particular de los tipos tratados a continuación, la longitud de B, los grupos Z e Y, la estructura/el grupo creados mediante la activación de Y, etc. pueden diferir en otros ciclos. Esto incluye que otras condiciones también están adaptadas al reactivo bifuncional real usado en un ciclo particular.

En variantes preferidas de una secuencia S que comprende las subetapas (ii.1)-(ii.4), al menos una de estas subetapas utiliza condiciones de desulfatación, preferiblemente condiciones alcalinas, de manera que esta subetapa y una subetapa para eliminar grupos sulfato pueden llevarse a cabo simultáneamente. En otros casos la eliminación de grupos sulfato se lleva a cabo como una subetapa separada antes de la secuencia y/o entre dos subetapas de la secuencia y/o posterior a la secuencia.

Una variante preferida incluye que

la subetapa (ii.1) comprenda la transformación de hidroxilos del material de agar en una estructura que comprende insaturación, por ejemplo haciendo reaccionar hidroxilos del material de agar con haluro de alquilo insaturado (reactivo heterobifuncional) en condiciones de desulfatación alcalinas, normalmente a pH ≥ 10 , tal como ≥ 12 o ≥ 13 y un exceso de OH⁻.

La subetapa (ii.2) comprenda la transformación de la insaturación en una estructura que comprende halohidrina (-CH(OH)CHX-) o dihaluro vecinal (-CHXCHX-) (X = halógeno), por ejemplo mediante la adición de hipohalito (HOX/XO) o halógeno (X₂) en condiciones de pH moderado a la insaturación. X es preferiblemente Br.

La subetapa (ii.3) comprenda la transformación de halohidrina y dihaluro vecinal en un dialcohol vecinal mediante la

reacción con agua y/o en reticulación mediante la reacción con hidroxilos del material de agar. Puede formarse epóxido pero reaccionará o bien en esta subetapa o bien en una subetapa alcalina posterior de la misma manera que una halohidrina y un dihaluro vecinal. Las condiciones de pH son normalmente alcalinas, al menos inicialmente. La desulfatación puede tener lugar o bien mediante hidrólisis directa de los grupos sulfato o bien mediante los mecanismos alternativos tratados anteriormente.

La subetapa (ii.4) comprenda realizar las subetapas (ii.1)-(ii.3) una segunda vez, una tercera vez etc., I) hasta que la reticulación ha conferido al gel una rigidez predeterminada, o II) parar la repetición final después de haberse introducido halohidrina/dihaluro vecinal o epóxido y usar esos grupos para la funcionalización del producto final, por ejemplo con grupos de afinidad.

Alternativamente se realizan al menos una, dos o más de las repeticiones según (ii.4) con un reactivo bifuncional distinto del haluro de alquilo insaturado usado en la subetapa (ii.1) con cambios posteriores en las subetapas (ii.2) y (iii.3), por ejemplo con otro tipo de haluro de alquilo insaturado o un reactivo bifuncional completamente diferente, tal como un reactivo homobifuncional o un reactivo heterobifuncional diferente, por ejemplo de los tipos tratados a continuación. Las condiciones y/o otros reactivos usados en una ronda de las subetapas particular están adaptados al reactivo bifuncional seleccionado.

Las transformaciones tratadas anteriormente normalmente se llevan a cabo mediante el uso de un reactivo que comprende al menos dos grupos funcionales, cada uno de los cuales puede formar una unión covalente con los oxígenos de hidroxilo del material de agar (= reactivos bifuncionales). Un tipo de reactivos bifuncionales usado en la invención es heterobifuncional en sentido de que uno de los grupos funcionales del reactivo reacciona con los hidroxilos del material de agar mientras que el otro está latente necesitando una activación de/transformación en un grupo que reaccione fácilmente con hidroxilos. Cuando se aplica a la presente invención este tipo de reactivo requiere una secuencia S que normalmente comprende al menos tres subetapas - una para que reaccione el primer grupo funcional con los hidroxilos, una para la activación del segundo grupo funcional, y una para hacer reaccionar el grupo activado con los hidroxilos u otros nucleófilos. Otro tipo de reactivo bifuncional usado en la invención es homobifuncional en sentido de que todos los grupos funcionales pueden reaccionar directamente con los hidroxilos del material de agar. Si la distancia entre el grupo funcional es apropiada los reactivos homobifuncionales implican la introducción de estructuras de reticulación en una única subetapa cuando se usan en la invención. Se prefieren los reactivos que transforman hidroxilos sobre el material de agar en uniones éter.

Para ambos tipos de reactivos bifuncionales es muy ventajoso repetir la parte secuencia que lleva a la estructura de reticulación. El uso pretendido del producto final del método inventivo puede requerir por ejemplo una rigidez del gel que necesita una repetición de las subetapas que llevan a reticulación.

Reactivos bifuncionales adecuados a usarse como reactivo de partida en la subetapa (ii.1) de una secuencia S tienen la estructura general

Z-B-Y

B es un puente en que existe una cadena de hidrocarburo lineal que contiene normalmente 1-15, tal como ≤ 12 o ≤ 10 , carbonos, posiblemente con oxígeno insertado entre dos carbonos en una, dos, tres o más posiciones y posiblemente sustituida con grupos alquilo inferior, alcoxilo inferior, y/o mediante grupos alquileo inferior, grupos adicionales, X y/o Y. Puede estar presente hidroxilo como sustituyente si los diversos grupos Z e Y están apropiadamente seleccionados. Como máximo un átomo de oxígeno se une al mismo carbono en B. Alquilo inferior, alcoxilo inferior y alquileo inferior significan alquileo/alquil/alcoxilo que contiene como máximo 10, tal como como máximo 7, átomos de carbono donde pueden haber átomos de oxígeno insertados en una o más posiciones. Los carbonos están preferiblemente saturados en sentido de que tienen hibridación sp^3 y normalmente solo se unen a átomos seleccionados entre oxígeno, carbono e hidrógeno. B es preferiblemente hidrófilo en sentido de que la razón entre el número de átomos de carbono y el número de oxígeno es ≤ 4 , tal como ≤ 3 o ≤ 2 .

En reactivos hetero- y homobifuncionales a usarse en la invención un grupo funcional Z y/o Y está normalmente directamente unido a un carbono con hibridación sp^3 en B.

Los grupos funcionales Z e Y que son reactivos con los hidroxilos sobre el material de agar normalmente se seleccionan entre grupos que llevan a una unión estable entre el reactivo y un oxígeno de hidroxilo, preferiblemente a una unión éter. Normalmente tales grupos Z e Y son halo, tal como flúor, cloro, bromo y yodo, tosilato, brosilato, etc., halohidrina, epoxi, dihalo vecinal, etc. Grupos funcionales Y típicos que deben activarse antes de poder reaccionar con los hidroxilos en el material de agar son grupos insaturados (alqueno y alquino) que se activan mediante la adición de halógeno o ácido hipohaloso/hipohalito a lo largo de la insaturación seguido, si es necesario, por la conversión a halohidrina/epóxido. Otros grupos Y potenciales que necesitan activación para poder reaccionar con los hidroxilos son nucleofílicos y se convierten a estructuras que comprenden grupos electrofílicos en el proceso de activación, es decir tienen una reactividad que es opuesta al grupo Z que normalmente es electrofílico.

Los grupos de afinidad del tipo tratado anteriormente pueden introducirse fácilmente de manera covalente sobre el

material de agar según la invención usando una secuencia S que es al menos en parte diferente de una secuencia S que lleva a reticulación. También pueden usarse otras secuencias una vez se haya obtenido el gel de separación de base final.

5 La introducción de grupos de afinidad sobre el material de agar utiliza según la invención preferiblemente reactivos heterobifuncionales del tipo tratado anteriormente, normalmente inmovilizando primero el reactivo mediante su extremo Z al material de agar seguido por la inmovilización de un compuesto que comprende la afinidad deseada (compuesto de afinidad) mediante el extremo Y del mismo reactivo. Si se usa un grupo nucleofílico sobre el compuesto de afinidad para la inmovilización, el grupo Y normalmente se activará/transformará primero en una estructura que comprende un grupo electrofílico. Alternativamente un grupo nucleofílico sobre el compuesto de afinidad se activa/transforma en una estructura que comprende un grupo electrofílico que es reactivo con el grupo nucleofílico Y del reactivo heterobifuncional. Con el fin de evitar la reticulación en paralelo con la unión a un compuesto de afinidad que contiene un grupo nucleofílico, es apropiado seleccionar un reactivo bifuncional en el que la cadena de hidrocarburo de B no sea lo suficientemente larga para permitir la reticulación y/o evitar extender la cadena de reticulación mediante la repetición de las primeras subetapas de la secuencia S utilizada. Véase por ejemplo el documento WO 1994004192 (Lindgren G).

Normalmente los centros nucleofílicos que pueden estar presentes sobre un compuesto de afinidad y pueden usarse para inmovilizar el compuesto de afinidad a las cadenas de polisacárido del material de agar son amino (primario, secundario o terciario), hidroxilo y mercapto. Durante el proceso de inmovilización los grupos amino preferiblemente se transforman en amino/amonio o amido, por ejemplo amino primario en amino secundario o amido, amino secundario en amino terciario o amido y amino terciario en amonio cuaternario; hidroxilo en éter, preferiblemente dialquil éter, y mercapto en tioeter preferiblemente dialquil tioeter.

25 Los reactivos homobifuncionales que son adecuados para su uso en la invención son diversos tipos de bis-epóxidos, epihalohidrina, dihaluro, etc. Un reactivo heterobifuncional muy preferido es haluro de alilo ya que es fácil de controlar la formación gradual (tres carbonos al mismo tiempo) de estructuras espaciadoras al inmovilizar ligandos de afinidad mediante el uso de este reactivo y de estructuras de reticulación (documento WO 1004004192 Lindgren G; y documento US 4.973.683 Lindgren G).

30 El segundo aspecto principal de la invención es un gel de separación de agarosa. Las características distintivas son que agarosa en el gel comprende

a) una pluralidad de grupos metoxilo cada uno de los cuales está en la misma posición que en agar natural con un grado de sustitución que está en el intervalo del 1-100%, normalmente $\geq 50\%$, tal como $\geq 75\%$ o $\geq 80\%$ o $\geq 95\%$, del grado de sustitución de agar natural, y

b) una pluralidad de grupos sulfato con un grado de sustitución que es $\leq 75\%$, tal como $\leq 50\%$ o $\leq 25\%$ o $\leq 10\%$ o $\leq 1\%$ o $\leq 0,5$ del grado de sustitución para grupos sulfato en agar natural.

40 Características físicas y químicas adicionales son tal como se trataron anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas. Normalmente existen estructuras de reticulación B' entre oxígenos que están directamente unidos a las cadenas de polisacárido del material de agar. B' preferiblemente comprende elementos estructurales seleccionados entre los mismos elementos estructurales que B del reactivo bifuncional. Los grupos de afinidad y/o estructuras reactivas están unidos al esqueleto de polisacárido de agarosa mediante un espaciador B'' que de la misma manera que la estructura de reticulación B' puede comprender elementos estructurales seleccionados del mismo grupo de elementos estructurales como pueden estar presentes en B y/o B'.

50 El gel de separación según la invención encontrará su uso para separaciones basándose en principios de electroforesis, exclusión molecular y/o adsorción, donde los principios de adsorción incluyen unión de intercambio iónico, unión de bioafinidad tal como adsorción inmunitaria etc. y es independiente de la separación que tiene lugar en procesos de tipo discontinuo o procesos cromatográficos. El campo primario será la biociencia incluyendo también la industria alimentaria.

55 Mejor modo

El mejor modo se proporciona en la parte experimental y también incluye realizaciones según las realizaciones preferidas y ventajosas resumidas en esta memoria descriptiva.

60 **Parte experimental**

Ejemplo 1. Síntesis de un gel de separación de agarosa a partir de agar. Reticulación gradual en paralelo con desulfatación gradual

65 Se prepararon perlas de agar esféricas usando un método tradicional en un sistema de dos fases (agua/tolueno) con un emulsionante adecuado. Se clasificaron las perlas en dos fracciones diferentes mediante tamización teniendo las

perlas diámetros dentro de los intervalos de 200-300 μm y 40-60 μm , respectivamente.

A 500 ml de la fracción 1 (diámetros de 200-300 μm) se añadieron 90 gramos de bromuro de alilo recién destilado y 9 ml borohidruro de sodio junto con 190 gramos de hidróxido de sodio (5,26 mmol) y 700 ml de agua. Se permitió que continuara la reacción con agitación durante la noche. Entonces se lavaron las perlas sobre un embudo de vidrio con agua hasta pH neutral. Se secó 1 gramo del gel sobre un embudo de vidrio con acetona y se determinó su contenido en azufre con análisis elemental (tabla 1). Se repitió la reacción una segunda vez y se analizó para determinar azufre. Se incluyen los contenidos en azufre de agar y agarosa como la comparación (tabla 1.)

10 Tabla 1

Material	CONTENIDO EN AZUFRE (%)
Agar	0,6
Material de agar después de la etapa de reticulación 1	0,3
Material de agar después de la etapa de reticulación 2	0,1
Agarosa natural	0,05

La síntesis fue esencialmente tal como se resume generalmente para geles de polisacárido en el documento US 4973683 (Lindgren, G) y está particularmente bien adaptada para dar como resultado perlas rígidas permitiendo altas velocidades de flujo y altas diferencias de presión a lo largo de columnas llenas de las perlas, por ejemplo en el tratamiento a gran escala de bebidas. Ejemplo comparativo 2

Ejemplo 2. A. Introducción de ligandos de adsorción que pueden adsorber sustancias polifenólicas mediante interacción $n-\pi$ y $\pi-\pi$ y B. Adsorción de polifenoles a partir de una bebida.

Se trataron 100 ml de las perlas grandes reticuladas, diámetros de 200-300 μm , del ejemplo 1 con un exceso de epíclorohidrina en disolución alcalina para formar grupos éter agrupados.

Se llenó una columna corta (25 x 50 mm) de las perlas y se conectó a una bomba y se equilibró con agua. Se permitió que cerveza que se había desgasificado a vacío durante aproximadamente 1 hora hasta que ya no se creaba espuma atravesara la columna a una alta velocidad de flujo (5 ml/min, 60 cm/min). Después de aproximadamente 200 ml, se tomaron muestras de la cerveza procesada para su análisis. Se midió la cantidad de polifenoles y proteínas en la cerveza antes y después de pasar la columna. Se determinaron los polifenoles usando los "polifenoles totales en cerveza mediante espectroscopía" tal como se describe en Analytica-EBC, Sección 9, método de cerveza 9.11. Se midió la proteína total mediante el uso del "ensayo de proteínas Bradford Quick Start" (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA) (Bradford *et al.*, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254).

La captación de polifenoles fue del 25% y de proteínas insignificante, es decir el contenido en polifenol se redujo un 25% y el contenido en proteína no cambió pasando la cerveza a través del adsorbente.

Ejemplo 3. Introducción de ligandos de adsorción que pueden aumentar la adsorción de polifenoles y de proteínas. Adsorción a partir de una bebida.

Se derivatizaron adicionalmente perlas sintetizadas según el ejemplo 2 con grupos alquilo hidrófobos mediante tratamiento con exceso de óxido de propileno. Se llenaron una columna del mismo tipo como en el ejemplo 2 de las perlas. Se permitió que el mismo tipo de cerveza que el usado en el ejemplo 2 pasara a través del adsorbente. Se midieron los polifenoles y proteína total en la cerveza antes y después de pasar el adsorbente de la misma manera que en el ejemplo 2. La captación de sustancias polifenólicas y de proteínas fue del 35% y el 25%, respectivamente.

Ejemplo 5. Gel de separación de agarosa adecuado para cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Se preparó el gel esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1 del documento EP 203049 y el documento US 4.973.683 excepto que se sustituyó el material polisacárido con la cantidad de agar correspondiente. El número de ciclos con haluro de alilo fue tres. Se tamizó el producto y se recogió la fracción de 40-60 μm y se sometió a prueba en cromatografía de exclusión molecular con tiroglobulina, ferritina, IgG, albúmina sérica bovina, ovalbúmina, mioglobulina y ribonucleasa midiendo K_{av} para las diferentes proteínas. Se obtuvo un gráfico de $\log M_w$ frente a K_{av} esencialmente lineal indicando que mediante el uso del método inventivo se puede obtener material de exclusión molecular con al menos las mismas características de rendimiento que cuando se parte de agarosa.

Mientras se ha descrito la invención y se indica con referencia a realizaciones funcionales de la misma, los expertos en la técnica entenderán que pueden hacerse diversos cambios, modificaciones, sustituciones y omisiones.

REIVINDICACIONES

1. Método para la fabricación de un gel de separación de agarosa caracterizado por comprender las etapas de:
 - i) proporcionar una disolución de un material de partida que es agar o agar parcialmente desulfatado, y
 - ii) dos o más subetapas ii.A, ii.B, ii.C etc., cada una de las cuales comprende la eliminación de grupos sulfato que se producen de manera natural transformando así el material de agar en agarosa que tiene un grado de sustitución de grupos sulfato que es menor del o igual al 75% del grado de sustitución de grupos sulfato en el material de agar de partida,
 - iii) gelificar el material de agar de partida disuelto antes de la etapa (ii) enfriando la disolución hasta una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación del material de agar de partida y realizando la eliminación a una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación del material de agar,
 - en el que la etapa (ii), además de las subetapas de desulfatación (ii.A, ii.B, ii.C etc.), comprende una secuencia (S₁) que comprende una o más subetapas (ii.1₁, ii.2₁ etc.) e introduce una estructura química que es una estructura de reticulación, y en el que
 - una o más de las subetapas (ii.A, ii.B, ii.C etc.) coincide por completo o al menos en parte con una (subetapa ii.1, ii.2 etc.) en la secuencia (S₁).
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la eliminación comprende reemplazar grupos sulfato por grupos hidroxilo.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque la forma de gel está en forma de partículas, en particular perlas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque dicha desulfatación en al menos una de dichas subetapas comprende hidrólisis alcalina realizada en disolución acuosa a un pH ≥ 10 en presencia de un hidróxido de metal soluble, normalmente a una concentración de hidróxido $\geq 0,1$ M.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la etapa (ii), además de las subetapas de desulfatación ii.A, ii.B, ii.C etc. y la secuencia S₁, comprende una o más secuencias S₂ etc. cada una de las cuales comprende una o más subetapas ii.1₂, ii.2₂ etc.; etc. e introduce una estructura química que es diferente entre las secuencias S₁, S₂ etc. y estará presente en el producto final.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque al menos una de las secuencias S₂ etc. introduce una estructura química que es un grupo funcional, por ejemplo
 - a. un grupo de afinidad, tal como grupos de intercambio iónico (cargados), y
 - b. un grupo que puede usarse para funcionalización adicional, tal como introducción de un grupo de unión de afinidad, tal como un receptor, un ligando, etc. incluyendo entre otros un grupo enzimáticamente activo.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, caracterizado porque una o más de las subetapas ii.A, ii.B, ii.C etc. coincide al menos en parte con una subetapa ii.1, ii.2 etc. en al menos una de las secuencias S₁, S₂ etc.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, caracterizado porque
 - A) al menos una de las secuencias S₁, S₂ etc. comprende las subetapas de:
 - ii.1) transformar una primera estructura en una segunda estructura donde la primera estructura está presente en el material de agar al inicio de dicha al menos una secuencia o se ha introducido como una estructura intermedia en una subetapa previa,
 - ii.2) transformar la segunda estructura en una tercera estructura que es una estructura intermedia,
 - ii.3) transformar la tercera estructura en una cuarta estructura que está presente en el material de agar que significa que la cuarta estructura es igual a una estructura química que está presente en el producto final o es una estructura intermedia en la subetapa (ii),
 - ii.4) realizar las subetapas ii.1-ii.3 un número de veces predeterminado hasta haberse logrado la estructura química deseada sobre el gel, por ejemplo

- a) una estructura de reticulación,
- b) una estructura reactiva que va a usarse para la derivatización adicional del gel,
- 5 c) una estructura de afinidad, tal como un grupo de intercambio iónico (grupo cargado), un receptor, un ligando, un grupo enzimático etc.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque
- 10 la subetapa ii.1 comprende la transformación de hidroxilo en una estructura que comprende insaturación,
- la subetapa ii.2 comprende la transformación de la insaturación en una estructura que comprende
- 15 halohidrina o dihaluro vecinal mediante la adición de hipohalito o halógeno, en condiciones de pH moderado,
- la subetapa iii.3 comprende la transformación de halohidrina o dihaluro vecinal en un diol vecinal en condiciones alcalinas, y
- 20 la subetapa ii.4 comprende realizar las subetapas ii.1-ii.3 una segunda vez, una tercera vez etc., hasta que una reticulación ha conferido al gel una rigidez predeterminada o como alternativa para la repetición final después de haberse introducido halohidrina/dihaluro vecinal o epóxido en la subetapa ii.2.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el gel proporcionado en la etapa
- 25 (iii) está en forma de partículas con un tamaño medio seleccionado dentro del intervalo de 1-1000 μm con las partículas saturadas con agua
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque el gel proporcionado en la
- 30 etapa (iii) está en forma de partículas con $\geq 40\%$ de las partículas teniendo tamaños dentro del intervalo del tamaño medio $\pm 1000\%$, del tamaño de perla medio con las partículas saturadas con agua.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque la concentración de agar en la
- disolución proporcionada en la etapa (i) es $\leq 25\%$ (p/p).
- 35 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque el número de etapas de desulfatación es tres o más.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado porque el exceso de reactivos y/o
- subproductos formados durante una subetapa se elimina después de la subetapa.