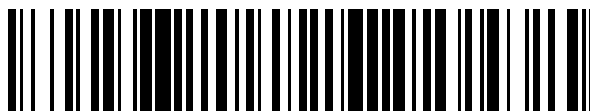


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 005**

51 Int. Cl.:

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 20/285 (2006.01)

B01J 20/291 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2005 PCT/SE2005/001408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2006 WO06033634**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2005 E 05787430 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1793926**

54 Título: **Método para preparar una matriz cromatográfica**

30 Prioridad:

22.09.2004 SE 0402322

27.12.2004 SE 0403173

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

05.04.2017

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE BIOPROCESS R&D AB
(100.0%)**

**Bjorkgatan 30
751 84 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**BERG, HANS;
HOLM, MARIA;
BUCKLEY, DAVID;
HAGVALL, ANDERS;
HOLMGREN, EVA;
IHRE, HENRIK;
LARSSON, ANDERS y
LINDSTRÖM, DAG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 608 005 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 preparar una matriz cromatográfica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la separación y purificación de moléculas diana, tales como biomoléculas, y más específicamente a una matriz cromatográfica y un método novedoso para la preparación de la misma. La invención también abarca el uso de una tal matriz en cromatografía de líquidos, y una columna cromatográfica rellena con la matriz.

Antecedentes de la invención

10 Los recientes avances en el campo de la biotecnología han requerido técnicas más rápidas y precisas para la recuperación, purificación y análisis de sustancias biológicas y bioquímicas, tales como las proteínas. La electroforesis y la cromatografía son dos de tales técnicas de uso común.

15 En la electroforesis, las partículas cargadas se separan por migración en un campo eléctrico. Más específicamente, se coloca una muestra en un medio de un soporte sólido blando, tal como una placa de agarosa o de gel de poliacrilamida, que a su vez se coloca entre dos electrodos, un ánodo cargado positivamente y un cátodo cargado negativamente. Cuando la corriente se conecta, cada componente de la muestra emigra a una velocidad característica determinada por su carga neta y su peso molecular. Una propiedad esencial de un gel de electroforesis que funciona bien es su punto de fusión, que afecta a la capacidad de extraer los compuestos diana migrados desde los puntos de gel separados. Por lo tanto, un gel de bajo punto de fusión es comúnmente ventajoso. La agarosa natural se utiliza comúnmente en geles de electroforesis, pero se ha observado que implica algunos problemas. Por ejemplo, a pesar de que la estructura de poro grueso de la agarosa natural es excelente para resolver grandes macromoléculas, para moléculas más pequeñas, de peso molecular más pequeño, la agarosa debe ser preparada. Esto se obtiene comúnmente mediante el aumento del contenido de agarosa del gel, lo que, sin embargo, produce viscosidades elevadas en las soluciones dando lugar a moldes de geles difíciles de la misma. Para superar tales problemas y otros, se ha sugerido la agarosa modificada para los geles de electroforesis.

25 La electroforesis se discute en la patente de EE.UU. N^o. 3.956.273 (Guiseley), que se refiere a la agarosa o a compuestos de agar útiles para la electroforesis o para interacciones de difusión, y también como espesantes. Los compuestos se han modificado con grupos alquilo y alquenilo a fin de reducir sus temperaturas de gelificación y de fusión, y para aumentar su claridad en comparación con el material sin modificar. Más específicamente, el agar o la agarosa se disuelven primero en un álcali fuerte, después de lo cual se añade un reactivo adecuado para proporcionar la modificación. Un agente difuncional, tal como la epíclorhidrina, se puede utilizar, pero sólo en condiciones que impidan la reticulación.

35 La electroforesis también se discute en la patente de EE.UU. N^o. 5.143.646 (Nochumson et al), que se refiere a composiciones de gel para resolución electroforética que comprenden hidrogeles de polisacáridos, tales como agarosa, que ha sido derivatizada y despolimerizada lo suficiente para reducir su viscosidad de fundición efectiva. Las composiciones descritas no requieren ninguna reticulación o agentes de polimerización.

40 Además, la patente de EE.UU. N^o. 5.541.255 (Kozulic) se refiere a geles para electroforesis, y más específicamente a polímeros de polisacáridos lineales reticulados. Los geles se forman por disolución de un polisacárido en un disolvente tal como agua; añadiendo un agente de reticulación, que no está cargado ni que se carga al entrar en contacto con agua; e incubando la mezcla en un estado de reposo para hacer reaccionar simultáneamente el polisacárido y el agente de reticulación y para gelificar el producto en una placa. De acuerdo con la patente de EE.UU. N^o. 5.541.255, los geles de electroforesis de la técnica anterior podrían volver a disolverse por el agua, mientras que en la patente de EE.UU. N^o. 5.541.255 la invención proporciona un gel que es insoluble en agua. Estas propiedades se obtienen debido a la reticulación y gelificación simultánea, y también debido a la alta proporción de agente de reticulación frente al polisacárido.

45 En cromatografía, dos fases mutuamente inmiscibles son puestas en contacto. Más específicamente, el compuesto diana se introduce en una fase móvil, que está en contacto con una fase estacionaria. El compuesto objetivo se someterá a continuación a una serie de interacciones entre las fases estacionaria y móvil, según es llevado a través del sistema por la fase móvil. Las interacciones explotan las diferencias en las propiedades físicas o químicas de los componentes de la muestra. En la cromatografía líquida, una muestra de líquido, opcionalmente en combinación con un tampón adecuado constituye la fase móvil, que está en contacto con una fase estacionaria, conocida como la matriz de separación. Por lo general, la matriz comprende un soporte al que los ligandos, que son grupos capaces de interacción con la diana, se han acoplado.

55 Las matrices de separación se basan comúnmente en soportes hechos de materiales inorgánicos, tales como sílice, o materiales orgánicos, tales como polímeros sintéticos o naturales, o similares. Los polímeros sintéticos, tales como estireno y divinilbenceno, se utilizan a menudo como soportes que presentan algunos hidrofobicidad, tales como para cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de fase inversa (RPC). Además, los polímeros sintéticos son a veces preferibles a los polímeros naturales debido a sus

propiedades de flujo, lo que puede ser más ventajoso ya que los polímeros sintéticos son a menudo más rígidos y resistentes a la presión de los soportes de polímeros naturales utilizados comúnmente.

Se han utilizado polímeros naturales, que son comúnmente polisacáridos tales como agarosa, como soportes de matrices de separación durante décadas. Debido a la presencia de grupos hidroxilo, las superficies de los polímeros naturales son generalmente hidrófilas, no dando esencialmente interacciones no específicas con las proteínas. Otra ventaja de los polímeros naturales, que es de importancia específica en la purificación de fármacos o moléculas de diagnóstico para uso humano interno, es sus propiedades no tóxicas. La agarosa se puede disolver en agua a temperatura elevada, y luego formar un gel poroso tras su enfriamiento a una temperatura determinada (el punto de gelificación). En el calentamiento, el gel se funde de nuevo a una temperatura (el punto de fusión), que es por lo general considerablemente más alto que el punto de gelificación. La gelificación implica la agregación hélice-hélice de los polímeros del polisacárido, y se denomina, a veces, reticulación física. Para optimizar la velocidad del transporte de masa de la diana y el área con la que interactúa la diana, a menudo se desea aumentar la porosidad del soporte, lo que se puede conseguir variando la concentración de agarosa. Sin embargo, otro parámetro esencial a considerar es las propiedades de flujo del soporte. La matriz se utiliza normalmente en la forma de un lecho relleno de partículas (esféricas o no esféricas). Cuando la fase móvil es forzada a través del lecho, la contrapresión del lecho principalmente se controla por los canales intersticiales entre las partículas. A velocidades de flujo bajas, las partículas pueden considerarse como incompresibles y luego la presión se incrementa de nuevo linealmente con la velocidad de flujo, con la pendiente en función del tamaño de partícula. A velocidades de flujo más altas, las partículas pueden empezar a deformarse bajo la presión hidrostática, resultando en una disminución de los diámetros de los canales intersticiales y un rápido aumento de la contrapresión. A una cierta velocidad de flujo, dependiendo de la rigidez de la matriz, el lecho colapsará y la contrapresión tiende a infinito a menos que se apage automáticamente el sistema de cromatografía. Para mejorar la rigidez y, por lo tanto, las propiedades de flujo de agarosa, ésta con frecuencia es reticulada. Tal reticulación tiene lugar entre los grupos hidroxilo disponibles, y puede obtenerse, por ejemplo, con epíclorhidrina.

La patente de EE.UU. No. 4.973.683 (Lindgren) se refiere a la reticulación de geles de polisacáridos porosos, y más específicamente a un método para mejorar la rigidez y reducir al mínimo la interacción no específica de un gel de polisacárido poroso. El método implica proporcionar un gel de agarosa y un reactivo denotado "monofuncional", que comprende un grupo reactivo, tal como un grupo halógeno o un grupo epóxido, y un doble enlace. El reactivo se une al gel a través de su grupo reactivo; y el doble enlace se activa entonces en un epóxido o halohidrina, que finalmente se hace reaccionar con grupos hidroxilo en la agarosa para proporcionar la reticulación.

La patente de EE.UU. N°. 5.135.650 (Hjertén et al) se refiere a partículas altamente compresibles de fase estacionaria cromatográfica, tales como perlas de agarosa, que son suficientemente rígidas para HPLC y no porosas en la medida en que son impenetrables por los solutos. Más específicamente, tales perlas son producidas partiendo de perlas de agarosa porosas, que están en contacto con un disolvente orgánico para contraer la porosidad, después de lo cual las superficies de las perlas dentro de los poros colapsados son reticuladas para fijar los poros en su estado colapsado. Alternativamente, las perlas son producidas por el llenado de los poros con una sustancia polimerizable, que se injerta a las superficies de los poros, y que realiza la polimerización del injerto. Una de las ventajas declaradas de la invención descrita es que una sola fase estacionaria es eficaz a altas presiones y, sin embargo, se puede utilizar a bajas presiones.

La patente de EE.UU. N°. 6.602.990 (Berg) se refiere a un procedimiento para la producción de un gel de polisacárido reticulado poroso, en el que un agente de reticulación bifuncional se añade a una solución de polisacárido y se deja que se una a través de su sitio activo a los grupos hidroxilo del polisacárido. Un gel de polisacárido se forma entonces a partir de la solución, después de lo cual se activa el sitio inactivo del agente de reticulación y la reticulación del gel se realiza. Por lo tanto, el agente de reticulación se introduce en la solución de polisacárido, al contrario de los métodos anteriormente discutidos en los que se añade a un gel de polisacárido. El agente de reticulación bifuncional comprende un sitio activo, es decir, un sitio capaz de reaccionar con grupos hidroxilo del polisacárido, tales como haluros y epóxidos, y un sitio inactivo, es decir, un grupo que no reacciona en las condiciones en las que el sitio activo reacciona, tales como grupos alilo. Por lo tanto, el agente de reticulación bifuncional presente corresponde a la "reactivos monofuncionales" que se utilizan de acuerdo con la patente de EE.UU. N°. 4.973.683 (Lindgren), anteriormente discutida. Las partículas compuestas del gel resultante se ha demostrado que presentan una mejor capacidad de soportar altas velocidades de flujo y contrapresiones. Un inconveniente con el método de la patente de EE.UU. N°. 6.602.990 es que se requiere bromo para la activación del agente de reticulación.

Finalmente, la patente de EE.UU. N°. 5.998.606 (Grandics) se refiere a un método de síntesis de medios de cromatografía, en el que la reticulación y la funcionalización de una matriz se llevan a cabo de forma simultánea. Más específicamente, dobles enlaces proporcionados en la superficie de una matriz de hidratos de carbono polimérica se activan en presencia de un catalizador metálico para reticular la matriz y funcionalizar con grupos halohidrina, carboxilo o sulfonato. Los dobles enlaces se proporcionan en la superficie de la matriz por el contacto con un reactivo activador, que contiene un átomo de halógeno o epóxido y un doble enlace. Por lo tanto, el reactivo de activación de la patente de EE.UU. N°. 5.998.606 corresponde al reactivo monofuncional de la patente de EE.UU. N°. 4.973.683 y al agente de reticulación bifuncional de la patente de EE.UU. N°. 6.602.990.

Por lo tanto, a pesar de que hay una serie de técnicas disponibles para la producción de matrices de separación de polisacáridos reticulados, ya que las diferentes aplicaciones pondrán diferentes requisitos sobre la matriz, todavía hay una necesidad dentro de este campo de métodos alternativos.

Sumario de la invención

5 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar una matriz cromatográfica de polisacárido reticulada y rígida.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar una matriz cromatográfica de polisacárido reticulada altamente porosa.

10 En un aspecto específico de la invención, se proporciona un método para preparar una matriz cromatográfica rígida reticulada de polisacárido, método que utiliza diferentes materiales y/o materiales de partida. En un aspecto específico, se proporciona un método en el que se evita el uso de halógenos tales como bromo.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona una matriz cromatográfica, que se compone de partículas de polisacáridos reticuladas y que puede soportar altas velocidades de flujo y/o contrapresiones.

15 Además, en un aspecto adicional, se proporciona un sistema desechable que comprende una matriz de polisacárido reticulada. El sistema desechable de acuerdo con la invención, que comprende una columna cromatográfica empacitada con partículas, es estéril y puede comprender los detalles requeridos para la integración dentro de un proceso.

Estos y otros objetos se pueden conseguir como se define en las reivindicaciones adjuntas. Otros objetos y ventajas de la presente invención aparecerán a partir de la descripción detallada que sigue.

20 Definiciones

El término "matriz" de separación significa en la presente memoria un material compuesto de un soporte sólido poroso o no poroso, al que los ligandos han sido unidos. En el campo de la cromatografía, la matriz es a veces denominada resina o el medio.

25 La expresión "compuesto diana" significa en este documento cualquier compuesto u otra entidad que sea la diana deseada en un procedimiento.

El término "ligandos" se utiliza en este documento en su significado convencional, es decir, para las entidades químicas que son capaces de interactuar con un compuesto diana, tales como grupos cargados capaces de interactuar con un compuesto diana de carga opuesta en un proceso de intercambio iónico.

30 K_{av} es un parámetro de filtración en gel (cromatografía de exclusión por tamaños) definido como $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, donde V_e es el volumen de elución del pico de la molécula de ensayo, V_0 es el volumen vacío de la columna y V_t es el total volumen de lecho. K_{av} es una medida de la fracción del volumen de la fase estacionaria accesible a la molécula de ensayo particular.

K_{avDX} es K_{av} para moléculas de dextrano. En los ejemplos, se han utilizado los dextransos de peso molecular 110 kD, 500 kD y 1000 kD.

35 La expresión "punto de gelificación", a veces en la presente memoria denominada la "temperatura de gelificación" significa la temperatura a la que los polímeros de una solución interaccionan físicamente para formar un gel sólido.

El término "gelificable" significa en la presente memoria capaz de formar un gel físico.

40 El término "reticulador", como se usa en el presente documento, abarca a entidades químicas capaces de formar cadenas de reticulación entre polímeros; así como agentes capaces de proporcionar reticulación de cadenas poliméricas en presencia de los agentes apropiados, tales como irradiación gamma o bombardeo electrónico.

La expresión "sustancialmente estéril" significa en este documento que no está presente sustancialmente ningún microorganismo viable.

El término "esterilización" significa en este documento el procedimiento de preparar un objeto libre de microorganismos viables.

45 Descripción detallada de la invención

Se describe un método para preparar una matriz cromatográfica de polisacárido reticulada, cuyo método comprende:

(a) proporcionar una solución acuosa de al menos un polisacárido gelificable, en el que al menos parte de los grupos hidroxilo están sustituidos con grupos que no son susceptibles al ataque nucleófilo y que se seleccionan del grupo que consiste en éteres de metilo, etilo, propilo, butilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo e hidroxietilo;

- (b) proporcionar gotitas esencialmente esféricas de la solución de polisacárido sustituido;
- (c) formar un gel de la solución de polisacárido sustituido; y
- (d) reticular el gel.

5 La presente invención se refiere a un método para preparar una matriz cromatográfica de polisacárido reticulada, cuyo método comprende

(a) proporcionar una solución acuosa de un polisacárido gelificable y sustituir al menos parte de los grupos hidroxilo del polisacárido en la solución acuosa con grupos que no son susceptibles al ataque nucleófilo y que se seleccionan del grupo que consiste en éteres de metilo, etilo, propilo, butilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo e hidroxietilo;

(b) proporcionar gotitas esencialmente esféricas de la solución de polisacárido sustituido;

10 (c) formar un gel de la solución de polisacárido sustituido; y (d) reticular el gel,

en donde la parte de los grupos hidroxilo en el polisacárido que se sustituyen es 1-20%.

En el método anterior, "no susceptible al ataque nucleófilo" se refiere a las propiedades de los grupos obtenidos en el polisacárido después de la sustitución.

15 Así, en la primera realización, el material de partida es un polisacárido previamente sustituido, mientras que en una realización específica; la invención comprende también las etapas de sustituir los grupos hidroxilo del polisacárido. Como el experto en la materia sabe, los grupos hidroxilo disponibles están presentes en todas las superficies del polisacárido y, por lo tanto, los sustituyentes estarán presentes en las superficies de los poros, así como en las superficies externas de la matriz. Más específicamente, el polisacárido proporcionado se ha sustituido con grupos
20 que no son susceptibles a los ataques nucleófilos. En consecuencia, estos grupos no son reactivos con los grupos hidroxilo, y son, por tanto, a veces en este documento denotados como "grupos no reactivos" o simplemente sustituyentes. El tipo opuesto de los grupos, es decir, los grupos que son "reactivos" en el presente contexto, son grupos electrófilos o grupos que se convierten fácilmente en grupos electrófilos, tales como, por ejemplo, grupos alilo (fácilmente epoxidados), epóxidos, halohidrininas, carbonilos α,β -insaturados, que son todos fácilmente reactivos con
25 grupos hidroxilo. Mediante el uso de grupos no reactivos, la estabilidad del polímero sustituido se mejora y es más fácil controlar el paso de reticulación subsiguiente. La parte de los grupos hidroxilo que están sustituidos en el polisacárido según la presente invención puede ser de aproximadamente 10%, tal como aproximadamente 5% y más específicamente 2%. Específicamente, la parte de los grupos hidroxilo que está sustituida está en un intervalo de 1-20%, tal como 2-10% y, más específicamente 2-5%.

30 Los sustituyentes presentes en el polisacárido son éteres, seleccionados del grupo que consiste en éteres de metilo, etilo, propilo, y butilo, hidroxipropilo e hidroxibutilo. En una realización ventajosa, una parte de los grupos hidroxilo del polisacárido está sustituida con grupos éter de hidroxietilo.

Los polisacáridos previamente sustituidos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Cambrex Bioproducts, EE.UU. En la mejor realización de la invención, el polisacárido sustituido es de agarosa hidroxietilo. Métodos de
35 modificación de polisacáridos están fácilmente disponibles para los expertos en este campo; véase, por ejemplo la patente de EE.UU. N° 3.956.273, que se refiere a geles de electroforesis que constan de tales polisacáridos sustituidos. Como se discutió en la patente de EE.UU. N° 3.956.273, la sustitución del polisacárido baja su temperatura de gelificación, lo que se habría esperado que perturbara la estructura de poros del producto y que, evidentemente, es un signo de una unión más débil. Sin embargo, la presente invención muestra lo contrario, ya que
40 las matrices de cromatografía preparadas de acuerdo con la invención exhiben propiedades de flujo mejoradas en comparación con el producto reticulado correspondiente hecho de polisacárido no sustituido, véase la parte experimental a continuación.

La reticulación del gel obtenido de este modo se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos en el campo, tales como la adición de un agente de reticulación que reacciona con grupos hidroxilo del polisacárido.

45 En una primera realización, la reticulación es un procedimiento de dos etapas bien conocido que usa un agente de reticulación que comprende un grupo reactivo, tal como un epóxido, y un grupo que es activable, tal como un grupo alilo, como se describe, por ejemplo en la anteriormente discutida patente de EE.UU. N° 4.973.683.

En una realización alternativa, la reticulación se proporciona en una sola etapa añadiendo un agente de reticulación que comprende dos grupos reactivos. Por tanto, en esta realización, no hay necesidad de activar el agente de
50 reticulación.

Ejemplos de agentes de reticulación usados comúnmente, como se describe anteriormente, comprenden, por ejemplo, isocianatos, epóxidos, compuestos de metilol, halohidrininas, halogenuros de alquilo o aceptores de adición

de Michael (tales como vinilsulfonas). Los agentes de reticulación que son útiles en el presente método están fácilmente disponibles en las fuentes comerciales.

5 Como es bien conocido, la irradiación gamma o el bombardeo electrónico pueden usarse para activar grupos activables de un agente de reticulación. En una realización específica, la irradiación gamma o el bombardeo electrónico se usan para proporcionar la reticulación de los polímeros del polisacárido.

10 En una realización, los sustituyentes no reactivos, es decir, los grupos que no son susceptibles de ataque nucleófilo se escinden después de la reticulación. Se entiende que la forma de la escisión de estos grupos dependerá de la naturaleza del grupo, y el experto en este campo puede seleccionar fácilmente las condiciones adecuadas para cada caso. Grupos hidroxilo disponibles del polisacárido son entonces funcionalizados aún más a la clase deseada de la matriz cromatográfica, como se discute a continuación.

15 Sin embargo, a pesar de que el papel principal de los sustituyentes no reactivos del polisacárido en el presente método es permitir que la solución de polisacárido forme el gel reticulado específico que presenta las propiedades de flujo mejoradas que se muestran en la parte experimental, también se pueden utilizar para su posterior funcionalización. En una realización ventajosa, tanto los sustituyentes no reactivos como cualquier grupo hidroxilo no sustituido restantes son funcionalizados. Dicha funcionalización puede estar provista de grupos cargados en una matriz de intercambio iónico; con grupos que exhiben afinidad biológica en una matriz de afinidad; con grupos quelantes en una matriz cromatográfica de afinidad con metal inmovilizado (IMAC); o con grupos hidrófobos en una matriz cromatográfica de interacción hidrófoba (HIC). En una realización específica, los grupos funcionales son ligandos de intercambio de iones seleccionados del grupo que consiste en grupos amonio cuaternario (Q), dietilaminoetilo (DEAE), dietilaminopropilo (ANX), sulfopropilo (SP), y carboximetilo (CM). Por lo tanto, en una realización alternativa, los sustituyentes no reactivos se utilizan en una etapa posterior para la unión de ligandos de cromatografía. Los sustituyentes son grupos de éter. Los métodos para la fijación de tales grupos funcionales a un soporte son bien conocidos para los expertos en este campo y pueden implicar una etapa precedente de alilación del sustituyente y el uso de reactivos y condiciones estándar. (Véase, por ejemplo, Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia y Paul K. Smith, Academic Press, Inc, 1992.) En una realización específica, los sustituyentes no reactivos constituyen los ligandos, por ejemplo, proporcionando interacciones hidrofóbicas con una sustancia diana. En tal cromatografía HIC, un sustituyente ilustrativo sería los grupos éter de alquilo.

30 En una realización específica, los grupos que se separan de los ligandos de la superficie de gel se acoplan al polisacárido en una etapa que precede al acoplamiento de ligando anteriormente discutido. Tales grupos de separación son conocidos como extensores, brazos flexibles, tentáculos, etc. y pueden ser lineales o ramificados. Un extensor hidrófilo comúnmente usado adecuado para matrices basadas en polisacáridos es el dextrano, que está comercialmente disponible en varios pesos moleculares. Otros tipos de extensores están basados en polímeros sintéticos o copolímeros. La persona experta puede fácilmente unir ligandos a través de extensores a la presente matriz cromatográfica usando métodos bien conocidos. Además, la matriz cromatográfica puede comprender polímeros sensibles a estímulos, que son polímeros conocidos que sufren un cambio físico o químico bajo un estímulo físico tal como la luz, un campo magnético, la temperatura, el pH, etc; véase la patente de EE.UU. 6.641.735 (Japan Chemical Innovation Institute). Como es bien conocido, tales cambios pueden ser utilizados para afectar o mejorar la unión y/o liberación de los ligandos.

40 Además, es bien conocido en este campo que el punto de gelificación de un polisacárido puede ser modificado añadiendo funcionalidades a los polímeros del polisacárido. Por tanto, en una realización específica, los sustituyentes no reactivos del polisacárido son funcionalizados con el fin de cambiar el punto de gelificación del polisacárido. La funcionalidad puede añadir cualquier grupo o grupos bien conocidos, tales como los discutidos anteriormente. Cualquiera o ambos de los sustituyentes no reactivos u cualquiera de los restantes grupos hidroxilos no sustituidos pueden ser funcionalizados para este fin. La presente invención abarca cualquier nueva forma de gel polisacárido, tal como agarosa, obtenido por la modificación de acuerdo con la invención.

50 El polisacárido se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en agarosa, agar, celulosa, dextrano, pectina, almidón, quitosano, konjac, curdlan, carragenina, gellan, y alginato. En una realización ventajosa del presente método, el polisacárido es agarosa. En este contexto, se entiende que el término "agarosa" abarca cualquier derivado o agarosa modificada que sea capaz de proporcionar el gel de rigidez mejorada de acuerdo con la invención. En una realización específica, el presente método utiliza una mezcla de dos o más de los polisacáridos anteriormente ejemplificados.

La temperatura de fusión y/o gelificante del polisacárido es al menos aproximadamente 1°C más baja que la correspondiente al polisacárido no sustituido.

55 Un método para preparar la matriz cromatográfica del polisacárido reticulado puede comprender:

(a) proporcionar una solución acuosa de al menos un polisacárido gelificable, en donde parte de los grupos hidroxilo están sustituidos con alilo;

(b) proporcionar esencialmente gotas esféricas de la solución del polisacárido sustituido;

(c) formar un gel de la solución del polisacárido sustituido; y

(d) reticular el gel, durante la cual los grupos alilo de la etapa (a) no participarán.

5 Por lo tanto, como sería entendido por un experto en la técnica, la reticulación es proporcionada utilizando grupos hidroxilo que no están sustituidos con alilo en la etapa (a), preferiblemente por reacción con un agente de reticulación adecuado como se describe anteriormente. Así, la expresión "parte de" los grupos hidroxilo se entiende que significa "algo, pero no todo". Los métodos de reticulación anteriormente discutidos son igualmente aplicables a esta realización. Mediante la realización de la etapa (d) como la única reticulación del gel, una matriz cromatográfica es obtenida que presenta las ventajas discutidas en este documento de mejor rigidez comparado con las matrices reticuladas convencionales.

10 De acuerdo con esto, este aspecto difiere de la anteriormente discutida patente de EE.UU. 6.602.990 (Berg), en donde un agente de reticulación bifuncional es añadido a una solución de polisacárido y se deja unirse vía su sitio activo a los grupos hidroxilo del polisacárido. Como aparece en la patente de EE.UU. 6.602.990, dichos agentes de reticulación bifuncionales son, por ejemplo, grupos alilo.

15 No obstante, los grupos alilo añadidos antes de la gelificación no se usan en la reticulación del gel. En su lugar, son ventajosamente convertidos en grupos hidrófilos, tales como grupos hidroxilo, después de la reticulación. Por tanto, los grupos alilo pueden ser eliminados después de la reticulación en una etapa separada, por ejemplo, mediante reacción con tioglicerol o mercaptoetanol en grupos hidroxilo. Dicha reacción es una adición bajo condiciones de radicales libres, que es una reacción bien conocida fácilmente realizada por los expertos en la técnica.

20 En una realización alternativa, los grupos alilo proporcionados en los polisacáridos antes de la gelificación, que no se utilizan en la posterior reticulación, pueden ser funcionalizados como se discute anteriormente en el contexto de los sustituyentes no reactivos.

Además de los grupo alilo, el polisacárido gelificable comprende grupos hidroxilo sustituidos con grupos que no son susceptibles al ataque nucleófilo.

25 En una realización del presente método, la matriz cromatográfica se compone de partículas porosas, esencialmente esféricas. El tamaño medio de partícula de las partículas puede estar en un intervalo de 10 a 300 μm , preferiblemente de 30 a 200 μm o más preferiblemente de 45 a 165 μm , tal como de aproximadamente 45 μm , en diámetro. Tales soportes porosos de polisacáridos se preparan fácilmente por los expertos en este campo de acuerdo con métodos estándar, tales como gelificación en suspensión inversa (S Hjertén: *Biochim Biophys Acta* 79 (2), 393-398 (1964)). Por ejemplo, cuando se prepara la agarosa, las gotitas esencialmente esféricas de la solución de polisacárido se obtienen primero por disolución o dispersión de la agarosa en un disolvente acuoso, tal como agua, o cualquier otro disolvente de uso común, a una temperatura por encima del punto de fusión del polisacárido específico. Si es necesario, un porógeno puede ser añadido para asegurar la porosidad deseada del producto. En el caso de un polisacárido no sustituido, se sustituye entonces como se discutió anteriormente. El polisacárido sustituido disuelto se emulsiona a continuación en un disolvente orgánico usado comúnmente, tal como tolueno o heptano con agitación, después de lo cual se baja la temperatura por debajo del punto de gelificación del polisacárido, tal como la temperatura ambiente. Las partículas así producidas se pueden lavar para eliminar cualquier traza de disolvente y reticularse como se discutió anteriormente. Por lo tanto, en una realización del presente método, el polisacárido sustituido disuelto se emulsiona en un disolvente orgánico. En una realización alternativa, las gotitas esencialmente esféricas de la solución del polisacárido se obtienen por pulverización de una composición de un polímero térmicamente gelificante en un medio acuoso en el aire ambiente y permitiendo a la composición atomizada gelificarse en el aire, como se describe en la patente de EE.UU. N°. 6.248.268 (FMC Corporation).

40 En una realización específica, la disolución acuosa de polisacárido se proporciona mediante el calentamiento y el gel se forma mediante la reducción de la temperatura.

45 En una realización del presente método, se añade un porógeno antes de la gelificación para proporcionar un tamaño de poro adecuado. Los porógenos adecuados son bien conocidos para los expertos en este campo. En este contexto, la presente matriz cromatográfica puede presentar una porosidad de al menos aproximadamente 90%, tal como aproximadamente 94% y más específicamente aproximadamente 96%.

50 La presente invención también abarca un método para proporcionar una columna estéril empaquetada con una matriz cromatográfica de polisacárido reticulado de acuerdo con la reivindicación 9. Más específicamente, el método comprende:

(a) proporcionar una solución acuosa de al menos un polisacárido gelificable;

(b) proporcionar esencialmente gotas esféricas de la solución del polisacárido sustituido;

(c) formar un gel de la solución del polisacárido sustituido; y

(d) reticular el gel;

(e) empaquetar el gel reticulado en una columna cromatográfica; y

(f) esterilizar la columna empaquetada por radiación, vapor, o autoclave.

5 En una realización específica, el método de acuerdo con la invención comprende una etapa, en la que la matriz cromatográfica reticulada obtenida de acuerdo con la presente invención es empaquetada en una columna cromatográfica. En una realización, la columna empaquetada se somete entonces a esterilización. En una realización alternativa, el presente método comprende una esterilización separada de la matriz de la cromatografía del polisacárido y el ensamblaje aséptico en una columna empaquetada estéril. La columna de cromatografía de acuerdo con este aspecto es de un tipo comúnmente conocido como una columna desechable o alguna vez como una "columna cromatográfica de un solo uso", y es especialmente ventajosa para productos médicos y/o diagnósticos. En este contexto, se entiende que la expresión "un solo uso" significa uno o un número limitado de usos, tal como 1-3 usos.

15 Un segundo aspecto de la invención es una matriz cromatográfica producida como se describe anteriormente. En una realización, la matriz cromatográfica está comprendida de esencialmente partículas esféricas y exhibe un valor K_{av} para un dextrano de 110 kDa de al menos aproximadamente 0,4, preferiblemente $>0,5$.

En otra realización, la matriz cromatográfica comprende una membrana o un filtro. En otra realización más, la matriz cromatográfica comprende un monolito. En otras realizaciones, la matriz cromatográfica comprende una superficie, un chip, una fibra o similares.

20 En un aspecto específico, la matriz cromatográfica de acuerdo con la invención ha sido preparado de acuerdo con las anteriores etapas (a)-(f).

Un tercer aspecto de la invención es una columna cromatográfica empaquetada con una matriz preparada como se describe anteriormente. En una realización ventajosa, la columna está hecha de cualquier material convencional, tal como un plástico biocompatible, por ejemplo, polipropileno, o vidrio. La columna puede ser de un tamaño adecuado para escala de laboratorio o para purificación a gran escala. En una realización específica, la columna de acuerdo con la invención se proporciona con adaptadores Luer, conectores de tubos, y tuercas ciegas. Así, la presente invención también abarca un kit formado por una columna de cromatografía empaquetada con una matriz cromatográfica como se describió anteriormente; al menos un tampón; y las instrucciones por escrito para la purificación de las moléculas diana; en compartimentos separados. La presente invención también abarca la presente matriz cromatográfica contenida en cualesquiera otros formatos, tales como un lecho fluidizado de partículas en una columna o recipiente; en recipientes por lotes; o se puede aplicar a una superficie, tal como una membrana o un chip.

35 Como parece de lo anterior, en una realización, el método de acuerdo con la invención da como resultado una columna cromatográfica empaquetada estéril. Por tanto, una realización específica de la presente columna cromatográfica en un formato desechable o de un solo uso, que es sustancialmente estéril. Los formatos estériles, o sustancialmente estériles, son especialmente ventajosos para los procesos en la industria médica, tal como la purificación de un fármaco, donde la pureza es crucial.

Una realización adicional es un kit que comprende la columna cromatográfica de acuerdo con la invención. El kit puede comprender una columna cromatográfica empaquetada, tubos; y tampones. El kit puede ser proporcionado en una forma sustancialmente estéril, en donde las partes puedan estar pre-ensambladas.

40 Los compuestos diana pueden ser cualesquiera compuestos biológicos seleccionados del grupo que consiste en péptidos, proteínas, tales como receptores y anticuerpos, ácidos nucleicos, tales como ADN, por ejemplo plásmidos, ARN y oligonucleótidos; virus, priones; células, tales como procariontas como eucariotas; carbohidratos; y otras moléculas orgánicas, tales como fármacos candidatos. En una realización específica, el compuesto diana es un marcador diagnóstico. Por tanto, los compuestos diana purificados usando la presente matriz cromatográfica pueden ser, por ejemplo, compuestos médicos, tales como fármacos de proteínas y anticuerpos; compuestos diagnósticos, tales como antígenos o anticuerpos diagnósticos; y células para uso en terapia, tales como células madre.

Un último aspecto de la presente invención es el uso de una matriz cromatográfica preparada como se describe anteriormente para purificar, aislar o eliminar uno o más compuestos diana de un líquido. Por lo tanto, este aspecto es un método de cromatografía de líquidos, como se discutió anteriormente, y consiste en la adsorción de un compuesto diana o molécula a la matriz cromatográfica de acuerdo con la invención y, opcionalmente, una etapa subsiguiente de desorción selectiva de la diana, comúnmente conocida como elución por gradiente. Si es necesario, se proporcionan una o más etapas de lavado entre la adsorción y la elución. Alternativamente, el presente uso es para el retraso de un compuesto diana, en cuyo caso el compuesto(s) diana se retarda selectivamente en la columna, en comparación con otros componentes. En este caso, no hay necesidad de una etapa de elución para liberar la diana, a menos que la columna sea regenerada para un uso adicional.

5 Como es bien conocido en el campo de la cromatografía, la caída de la presión a través de los lechos empaquetados puede ser un problema significativo especialmente en la operación de columnas cromatográficas preparativas de gran escala. Factores tales como la forma y la proporción de aspecto de un lecho empaquetado; y también las propiedades de flujo de la matriz cromatográfica afectarán a la caída de la presión. La presente invención ha mostrado que una matriz cromatográfica de agarosa preparada de acuerdo con la invención permite sustancialmente mayores caudales que una matriz correspondiente preparada de acuerdo con métodos estándar. Por tanto, en una realización del presente uso, un flujo líquido de al menos aproximadamente 300 cm/h se aplica a una matriz comprendida de esencialmente partículas esféricas que exhiben un K_{av} de al menos aproximadamente 0.4 para dextrano de peso molecular 110 kD.

10 Un aspecto más de la invención es el uso de la presente matriz cromatográfica para la purificación y/o aislamiento de compuestos diana para uso en la industria alimenticia. Por tanto, el uso puede, por ejemplo, comprender la purificación de proteínas de leche de suero. Una ventaja de usar la presente matriz cromatográfica comparado con matrices convencionales de cromatografía es la mejorada rigidez de la presente matriz, lo que permite la manipulación de grandes volúmenes que son comúnmente necesitados a caudales económicos y, de ahí, a los costes.

15 Finalmente, otro aspecto específico de la matriz cromatográfica obtenida de acuerdo con la invención es eliminar pequeñas cantidades de contaminantes tales como virus o priones de un fluido de proceso. En esta realización, la matriz cromatográfica puede ser partículas o una membrana, preferible del tipo de un solo uso para permitir la eliminación segura de los contaminantes con la matriz usada.

20 Finalmente, en una realización, la matriz preparada de acuerdo con el presente método se utiliza como soporte en un cultivo celular. En una realización ventajosa, dicho soporte está en la forma de esencialmente partículas de vehículo esféricas, que son adecuadas tanto para un cultivo en suspensión como para la inmovilización a una superficie. Tales células cultivadas pueden usarse, por ejemplo, como una sustancia médica en esquemas de tratamiento de terapia celular. Un uso adicional de la matriz es para la inmovilización de enzimas para producir un biocatalizador.

35 Ejemplos

Los presentes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente, y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas. Todas las referencias dadas a continuación y en otras partes en la presente memoria descriptiva se incluyen en el presente documento por referencia.

Materiales/Unidades investigadas

Epiclorhidrina

Borohidruro de sodio

Sulfato de sodio

35 Métodos

Ejemplo 1: Preparación de perlas de agarosa reticuladas

40 Se disolvieron 7 g de hidroxietil agarosa (NuSieve™ GTG, Cambrex) con agitación en 200 ml de agua destilada durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo. La solución se cargó en un recipiente de vidrio de fondo plano de 1,5 l mantenido a 60°C, que contenía una solución de 2 g de diisosteato de triglicerina (Prisorine(TM) 3700, Uniqema) en 300 ml de tolueno. La velocidad de agitación (agitador de turbina de 40 mm) fue 400 rpm durante la carga y luego se aumentó a 650 rpm durante 20 min y a 800 rpm durante 20 min. Las gotitas de agarosa hidroxietilo a continuación se gelificaron por enfriamiento del recipiente de 60°C a 20°C durante un intervalo de 30 min. Se añadió 1 l de etanol y el contenido del recipiente se agitó durante 15 min y después se dejó sedimentar. El sobrenadante se decantó y después las perlas se lavaron con etanol y agua en un embudo de filtro de vidrio G3. El diámetro medio de las perlas recuperadas fue 99 μm , medido con un instrumento de difracción de luz Malvern Mastersizer.

50 285 g de perlas obtenidas como se describe anteriormente se añadieron a un matraz y se agitaron a 200 rpm con un agitador de dos palas. Se añadió 137 g de sulfato de sodio y se disolvió por calentamiento a 50°C con agitación a 200 rpm. La agitación se continuó durante 30 min después de que la temperatura objetivo de 50°C había sido alcanzada. Se añadieron 10,7 ml de NaOH 50%, seguido de 0,4 g de borohidruro de sodio. 54 ml de NaOH 50% y 80 ml de epiclorhidrina se bombearon a continuación más de 7 h usando bombas Dosimat (TM) (velocidades de alimentación: 50% de NaOH-0,129 ml/min, epiclorhidrina 0,190 ml/min). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación 200 rpm durante la noche a 50°C. A continuación, la suspensión de gel se neutralizó a pH 5,1 usando ácido acético al 60% y el gel se lavó con agua sobre un filtro de vidrio. Finalmente, las perlas se tamizaron en 55 tamices entre 40 y 160 μm .

Ejemplo 2: Preparación de perlas de agarosa reticuladas

Perlas que comprenden agarosa sustituida en forma de gel se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1. Las perlas se reticularon de acuerdo al mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que la temperatura se mantuvo a lo largo a 70°C.

5 Ejemplo 3: Rendimiento de presión-flujo

Las perlas obtenidas como se describe anteriormente fueron empaquetadas en una columna HR 5/5 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que se une a una bomba P-900 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Una solución de etanol al 50% se bombeó a través de la columna a un caudal inicial de 0,5 ml/min. El caudal se incrementó en etapas de 0,5 ml/min cada 30 s, hasta que se observó un aumento de la contrapresión drástico. Se observó el caudal más alto antes del aumento de presión, cuando el flujo máximo del gel en cuestión. Los resultados se presentan en la Tabla 1 más abajo.

Ejemplo 4: Determinación de la porosidad

Las perlas se empaquetan en una columna HR10, dando una altura de lecho de 15 cm. La columna se monta en un sistema de FPLC con LCC Plus/Director de FPLC, una bomba P-500 y un detector de UV-M MV-7. Se inyectaron muestras de color de dextrano (0,1% soluciones, 0,2 ml) y se eluyó isocráticamente con tris 0,05 M NaCl 0,15 M, pH 8,0 a un caudal de 0,2 ml/min (15 cm/h). Como referencia, una columna se empaquetó con Sepharose (TM) 4FF (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) y se evaluó de la misma manera. Los resultados se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Resultados

20 Tabla 1

Muestra	T de reticulación	Flujo máximo (ml/min)	Kav x Dx 1.400 kDa	Kav * Dx 500 kD	Kav * Dx 110 kD
Ejemplo 1	50°C	5,0	0,18	0,65	0,77
Ejemplo 2	70°C	8,5	0,05	0,63	0,76
Sepharose™ 4FF	-	3,5	0,06	0,56	0,69

* Los valores de Kav determinados de acuerdo con Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991 (ISBN 91-97-0490-2-6)

Las perlas producidas de acuerdo con la presente invención tienen poros más grandes que la matriz de agarosa de referencia Sepharose™ 4FF y permiten un caudal considerablemente mayor.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una matriz cromatográfica de polisacárido reticulada, cuyo método comprende:
- 5 (a) proporcionar una solución acuosa de al menos un polisacárido gelificable, en el que al menos parte de los grupos hidroxilo están sustituidos con grupos éter que no son susceptibles al ataque nucleófilo y que se seleccionan del grupo que consiste en éteres de metilo, etilo, propilo, butilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo e hidroxietilo;
- (b) proporcionar gotitas esencialmente esféricas de la solución de polisacárido sustituido;
- (c) formar un gel de la solución de polisacárido sustituido; y
- (d) reticular el gel,
- 10 en donde la parte de los grupos hidroxilo en el polisacárido que se sustituye es 1-20%.
2. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polisacárido sustituido disuelto se emulsiona en un disolvente orgánico.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se añade un porógeno antes de la gelificación.
- 15 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución acuosa del polisacárido se proporciona por calentamiento y el gel se forma mediante la reducción de la temperatura.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el punto de gelificación del polisacárido es al menos aproximadamente 1°C más bajo que el del correspondiente polisacárido no sustituido.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polisacárido es agarosa.
- 20 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de reticulación comprende añadir un agente de reticulación.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa posterior de unir ligandos de cromatografía a los grupos hidroxilo del polisacárido gelificado después de la reticulación de los mismos.
- 25 9. Un método para preparar una matriz cromatográfica de polisacárido reticulada estéril, cuyo método comprende:
- preparar una matriz de polisacárido reticulada de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
 - empaquetar el gel reticulado en una columna cromatográfica; y
 - esterilizar la columna empaquetada por radiación, vapor, o autoclave.

30