

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 638**

51 Int. Cl.:

<b>B01J 20/30</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/24</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/32</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/26</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/28</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/285</b>	(2006.01)
<b>B01J 20/291</b>	(2006.01)
<b>C08J 3/24</b>	(2006.01)
<b>C08B 37/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2006 PCT/SE2006/000790**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2007 WO07004947**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2006 E 06747969 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1904226**

54 Título: **Método para preparar una matriz de separación**

30 Prioridad:

**06.07.2005 SE 0501609**  
**24.10.2005 SE 0502373**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.04.2017**

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;**  
**BUSSON, PHILIPPE;**  
**HAGVALL, ANDERS;**  
**HOLMGREN, EVA;**  
**IHRE, HENRIK;**  
**LARSSON, ANDERS y**  
**LINDSTRÖM, DAG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 608 638 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 de separación

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a la separación y purificación de moléculas objetivo, tales como biomoléculas, y más específicamente a un método nuevo para preparar una matriz de separación.

**Antecedentes**

10 Los avances recientes en el campo de la biotecnología han requerido técnicas más rápidas y más precisas para recuperación, purificación y análisis de sustancias biológicas y bioquímicas, tales como proteínas. La cromatografía es una técnica de purificación comúnmente usada en este campo. En cromatografía, se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Más específicamente, la molécula objetivo se introduce en una fase móvil, que se pone en contacto con una fase estacionaria. La molécula objetivo después se somete a series de interacciones entre las fases estacionaria y móvil a medida que avanza hacia el sistema mediante la fase móvil. Las interacciones se valen de las diferencias en las propiedades físicas o químicas de los componentes de la muestra. En cromatografía líquida, una muestra líquida, opcionalmente combinada con un tampón adecuado, constituye la fase móvil, que se pone en contacto con una fase estacionaria, conocida como una matriz de separación. Normalmente, la matriz comprende un soporte al que los ligandos, que son grupos capaces de reaccionar con el objetivo, se han emparejado.

15 Las matrices de separación normalmente están basadas en soportes hechos a partir de materiales inorgánicos, tales como silicio, o materiales orgánicos, tales como polímeros sintéticos o naturales. Los polímeros sintéticos, tales como estireno y divinilbenceno, a menudo se usan para soportes que muestran algo de hidrofobicidad, tales como cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de fase inversa (RPC). Además, algunas veces son preferentes los polímeros sintéticos sobre los polímeros naturales, ya que fácilmente se hacen más rígidos y resistentes a presión, dando como resultado soportes que proporcionan propiedades de fluidez más ventajosas.

20 Los polímeros naturales, que comúnmente son polisacáridos tal como agarosa, se han utilizado como soportes de matrices de separación durante décadas. Debido a la presencia de grupos hidroxilo, las superficies de los polímeros naturales normalmente son hidrófilos, dando interacciones esencialmente no específicas con proteínas. Otra ventaja de los polímeros naturales, que tiene importancia específica en la purificación de medicamentos o moléculas de diagnóstico para uso interno humano, son sus propiedades no tóxicas. La agarosa se puede disolver en agua a temperatura creciente, y entonces formará un gel poroso al enfriarse hasta cierta temperatura (el punto de gelificación). Al calentar, el gel se fundirá de nuevo a una temperatura (el punto de fusión), que normalmente es considerablemente más alta que el punto de gelificación. La gelificación implica agregación hélice-hélice de los polímeros de polisacárido, y algunas veces es referida como un retrocruzamiento físico.

25 Como se mencionó anteriormente, los polímeros naturales son menos rígidos y resistentes a presión que los polímeros sintéticos, y en consecuencia se han desarrollado métodos para mejorarlos. Por ejemplo, mediante la variación de la concentración de polisacáridos, se puede incrementar la porosidad, dando como resultado mejora del transporte de masa objetivo e incremento del área con la que el objetivo interactúa durante la cromatografía. Otro parámetro esencial a considerar es las propiedades de fluidez del soporte, por ejemplo en un lecho compacto de matriz de separación en partículas. Cuando la fase móvil se fuerza a través del lecho, la presión posterior se controla principalmente mediante los canales intersticiales entre las partículas. A velocidad de fluido lenta, las partículas se pueden considerar como incompresibles y después la presión posterior incrementa linealmente con la velocidad de flujo, con la pendiente dependiente del tamaño de partícula. A medida que la velocidad de flujo aumenta, las partículas pueden empezar a deformarse bajo la presión hidrostática, dando como resultado diámetros en disminución de los canales intersticiales y un rápido incremento de la presión posterior. A cierta velocidad de flujo, dependiendo de la rigidez de la matriz, el lecho colapsa y la presión posterior se aproxima a infinito.

30 La manera más común de mejorar la rigidez y por tanto las propiedades de fluidez de agarosa es su retrocruzamiento químico. Tal retrocruzamiento se da entre grupos hidroxilo disponibles, y se puede obtener mediante métodos comúnmente conocidos usando por ejemplo epiclorhidrina.

35 La patente de EEUU 4.973.683 (Lindgren) se refiere al retrocruzamiento de geles porosos de polisacáridos, y más específicamente a un método para mejorar la rigidez mientras se minimiza la interacción no específica de un gel poroso de polisacárido. El método implica proporcionar un gel de agarosa y un reactivo denominado "monofuncional", que comprende un grupo de reacción tal como un grupo halógeno o un grupo epoxi, y un doble enlace. El reactivo se une al gel por medio de su grupo de reacción; y después el doble enlace se activa en epóxido o halohidrina, que finalmente reacciona con los grupos hidroxilo de la agarosa para proporcionar retrocruzamiento.

40 La patente de EEUU 5.135.650 (Hjertén et al) se refiere a partículas en fase estacionaria altamente comprensibles por cromatografía, tales como gotas de agarosa, que se ha constatado que son suficientemente rígidas para HPLC y no porosas hasta el punto de que son impenetrables por solutos. Más específicamente, las gotas Hjertén se

5 producen a partir de gotas de agarosa porosas, que se ponen en contacto con un disolvente orgánico para disminuir la porosidad, después de lo que la superficie de las gotas dentro de los poros disminuidos es retrocruzada para fijar los poros en su estado disminuido. Alternativamente, las gotas se producen rellenando los poros con una sustancia polimerizable, que se injerta a la superficie de los poros, y realiza polimerización injertada. Un estado avanzado de la invención descrita es que una fase estacionaria sencilla es eficaz a altas presiones y aún se puede usar a bajas presiones. Sin embargo, el uso de disolventes, especialmente los disolventes que se usan en la presente patente, se evita en general por razones de salud y seguridad.

10 La patente de EEUU 6.602.990 (Berg) se refiere a un proceso para la producción de un gel de polisacárido retrocruzado poroso, en el que se añade una gente retrocruzado funcional a una disolución de polisacárido y se deja que se una mediante su sitio activo a los grupos hidroxilo del polisacárido. Después se forma un gel de polisacárido a partir de la disolución, después de lo que el sitio inactivo del agente retrocruzado se activa y se realiza el retrocruzamiento del gel. Por tanto, el agente retrocruzado se introduce en la disolución de polisacárido, al contrario de los métodos discutidos anteriormente en los que se añade a un gel de polisacárido. El agente retrocruzado bifuncional comprende un sitio activo, es decir un grupo capaz de reaccionar con grupos hidroxilo del polisacárido, tales como haluros y epóxidos, y un sitio inactivo, es decir un grupo que no reacciona bajo las condiciones que reacciona el sitio activo, tales como grupos alilo. Por tanto, el presente agente retrocruzado bifuncional corresponde a los "reactivos monofuncionales" usados según la patente de EEUU 4.973.683 (Lindgren) discutida anteriormente. Las partículas que comprenden el gel que resulta han mostrado presentar una capacidad mejorada de resistencia a alta velocidad de flujo y presión posterior. Una desventaja con el método de la patente de EEUU 6.602.990 es que se requiere bromo para la activación del agente retrocruzado.

15 La patente de EEUU 5.998.606 (Grandics) se refiere a un método para sintetizar matrices de cromatografía, en el que el retrocruzamiento y funcionalización de una matriz tiene lugar simultáneamente. Más específicamente, los dobles enlaces que se proporcionan en la superficie de una matriz de hidrato de carbono polimérica se activan en presencia de un catalizador metálico para retrocruzar la matriz y funcionalizarla con grupos halohidrina, carboxilo o sulfonato. Los dobles enlaces se proporcionan en la superficie de la matriz por contacto con un reactivo activador, que contiene un átomo halógeno o epóxido y un doble enlace. Por tanto, el reactivo activador de la patente de EEUU 5.998.606 corresponde al reactivo monofuncional de la patente de EEUU 4.973.683 y al agente retrocruzado bifuncional de la patente de EEUU 6.602.990.

20 Qi et al (Journal of Functional Polymers, Vol. 13, March 2000: "Preparation of Two Types of Immobilized Metal-Chelated Complex Affinity membrane Chromatography Media") describe como se producen membranas con afinidad a celulosa macroporosa usando papel de filtro de celulosa como la matriz, sometiendo a tratamiento alcalino, activación por epoxidación, emparejamiento con iminodiacetato disodio, e inmovilización de  $\text{Cu}^{2+}$ . Además, la agarosa se retrocruzó covalentemente sobre las membranas de postactivación para producir membranas que poseen una estructura tipo sándwich.

25 La patente de EEUU 2005/0220982 (Moya et al) se refiere a un método para formar estructuras de polisacáridos tales como gotas, películas de gel y recubrimientos porosos sobre sustratos porosos formando una disolución inhibidora de gel a temperatura ambiente, uno o más agente(s) inhibidor de gel y un disolvente tal como agua, calentar la mezcla hasta que todos los componentes estén disueltos, enfriar la mezcla como una disolución hasta aproximadamente temperatura ambiente, formar una estructura tridimensional con la disolución y añadir la estructura a un agente gelificante para formar un gel polisacárido. El agente que inhibe el gel se basa por ejemplo en sales de zinc, litio o sodio. El recubrimiento del polisacárido se considera que es suficientemente grueso para permitir que se de flujo difusor en la misma capa de polisacárido. Una ventaja declarada del método descrito es que las estructuras se forman a temperatura ambiente y con gelificación controlada del polímero con polímeros de polisacárido que normalmente gelifican bien a temperatura superior a ambiente. También se declara que el recubrimiento de superficies se logra sin bloquear significativamente los poros con el polisacárido. Sin embargo, tales operaciones a temperatura ambiente requerirán control cuidadoso de la disolución de agarosa, que hace al proceso global relativamente consumidor de tiempo.

30 El documento WO03091315 describe la preparación de matrices de separación basados en gotas de polisacárido con estructura de poro adecuada para cromatografía de proteína. Este documento menciona que el retrocruzamiento puede incrementar la estabilidad mecánica de las matrices.

35 Por tanto, incluso aunque están disponibles técnicas para producir matrices de separación de polisacáridos retrocruzados, diferentes aplicaciones futuras pondrán diferentes requerimientos sobre la matriz, dando como resultado una necesidad permanente de métodos alternativos.

#### Breve descripción de la invención

40 Un aspecto de la presente invención es proporcionar un método para preparar una matriz de separación de polisacárido, cuya matriz presenta propiedades de flujo adecuadas para procesado a gran escala. Esto se puede lograr preparando una matriz de separación según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto específico de la presente invención es proporcionar un método para preparar una matriz de separación de polisacárido en partículas, que permite retrocruzamiento con riesgo reducido de agregación. Esto se puede lograr mediante una matriz de separación preparada según se define en las reivindicaciones adjuntas, que se puede retrocruzar a temperaturas más altas que las que se usan convencionalmente.

5 Un aspecto específico de la presente invención es proporcionar un método que permita fabricar una matriz de separación porosa de rigidez mejorada sin disminuir la estructura porosa. Esto se puede lograr usando el método definido en las reivindicaciones adjuntas para preparar una matriz de separación, el tamaño de poro que permite a las moléculas objetivo entrar por los poros. Este aspecto es ventajoso para la purificación y/o aislamiento de moléculas objetivo relativamente pequeñas, tales como proteínas, a velocidad de flujo incrementada.

10 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se harán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada.

### Definiciones

El término matriz de separación "en partículas" significa en la presente memoria una matriz de separación que comprende partículas, tales como esencialmente partículas esféricas o partículas de formas menos regulares.

15 El "punto de gelificación", algunas veces en la presente memoria llamada "temperatura de gelificación" significa la temperatura a la que los polímeros de una disolución interactúan físicamente para formar un gel sólido.

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

El término polisacárido "nativo" se refiere a un polisacárido en un estado no modificado, es decir, un polisacárido que no se ha sustituido o derivado.

20 El término "matriz" de separación significa en la presente memoria un material que comprende un soporte sólido poroso o no poroso, al que se han unido los ligandos. En el campo de la cromatografía, a la matriz de separación a veces se la llama resina o medio.

El término "ligandos" se usa en la presente memoria en su significado convencional, es decir para entidades químicas que son capaces de interactuar con una molécula objetivo, tales como grupos cargados capaces de interactuar con una molécula objetivo con carga opuesta en un proceso de intercambio de iones.

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

30  $K_{avDX}$  es  $K_{AV}$  para moléculas de dextrano. En los ejemplos, se ha usado dextrano de peso molecular de 110 kD, 500 kD y 1000 kD, respectivamente.

### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se refiere a un método para preparar una matriz de separación insoluble, tal como partículas, un monolito o una membrana, mediante tratamiento con sal de un gel de polisacárido seguido de retrocruzamiento de los polímeros de polisacárido. El método puede incluir una etapa precedente de proporcionar el gel de polisacárido a partir de una disolución, preferentemente mediante la disminución de su temperatura. El gel se puede proporcionar como un recubrimiento de un vehículo de membrana; como partículas de polisacárido; o como un recubrimiento sobre partículas hecho de un material diferente. El gel ventajosamente es poroso.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para preparar una matriz de separación, según la reivindicación 1.

40 El polisacárido puede ser cualquier polisacárido capaz de formar un gel, preferentemente mediante un cambio de temperatura, y se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en agarosa, agar, celulosa, dextrano, almidón, quitosano, konjac, curdlan, carragenano, pectina, gellan, y alginato. Como entenderá el experto en la técnica, tales partículas de polisacárido gelificadas ventajosamente están comprendidas por un polisacárido, pero la presente invención también implica el uso de partículas que comprenden una mezcla de uno o más polisacáridos. En una realización ventajosa del presente método, el polisacárido es agarosa. En un método específico, un núcleo de partícula o vehículo se recubre con un polisacárido según se describió anteriormente. El vehículo puede estar según se describe a continuación en el contexto del vehículo de membrana. Como se ve de lo anterior, según la presente invención, las partículas de polisacáridos proporcionadas en la etapa (a) comprenden un polisacárido nativo, es decir, un polisacárido cuyos polímeros no se han sometido a ninguna modificación o sustitución tal como derivación o retrocruzamiento. Por tanto, la presente invención añade sal a polisacárido no modificado.

50 En una realización ventajosa, las partículas de polisacárido esencialmente son partículas esféricas (gotas). En el campo de la cromatografía, el tamaño de partícula comúnmente se da como el tamaño medio de partícula de la distribución de volumen acumulativo. En el presente método, el tamaño medio de las gotas puede estar en el

intervalo de 10-300  $\mu\text{m}$ , preferentemente 30-200  $\mu\text{m}$  o más preferentemente 45-165  $\mu\text{m}$ , tal como aproximadamente 45  $\mu\text{m}$ , en diámetro.

Tales gotas de polisacárido se preparan fácilmente por el experto en la técnica en este campo según los métodos estándar, tal como gelificación por suspensión inversa (S Hjertén: *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393-398 (1964). Por ejemplo, cuando se prepara agarosa, se obtienen gotas de agarosa mediante disolución o dispersión de la agarosa en un disolvente acuoso, tal como agua, o cualquier otro disolvente usado comúnmente, a una temperatura por encima de su punto de fusión. La agarosa disuelta después se emulsiona en un disolvente orgánico comúnmente usado tal como tolueno o heptano agitando, después de lo cual la temperatura se reduce por debajo del punto de gelificación de la agarosa, convenientemente a temperatura ambiente. En el presente método, las gotas así producidas se lavan ventajosamente para eliminar cualquier resto de disolvente, p. ej. con etanol o agua, y se suspenden en agua o en una disolución acuosa adecuada. Por tanto, en una realización ventajosa, las partículas se lavan antes de la etapa de retrocruzamiento.

Como comprende la persona experta en este campo, hay otros métodos de preparar la disolución acuosa de partículas de polisacárido aparte de emulsión. Por tanto, en una realización alternativa, las partículas de polisacárido se obtienen por pulverizado de una composición, que está comprendida por un polisacárido gelificable termalmente en un medio acuoso, en el aire ambiente y permitiendo a la composición atomizada gelificar en el aire, según se describe p. ej. en la patente de EEUU 6.248.268 (FMC Corporation), que se incorpora en la presente memoria mediante referencia.

En una realización alternativa, las partículas de polisacárido tienen forma irregular, tal como la que se obtiene por ejemplo simplemente preparando un segmento grande de polisacárido y triturándolo en partículas de tamaño medio adecuado. Aún en otra realización alternativa, las partículas de polisacárido se alargan tal como partículas ovoides o como fibras.

La sal añadida en la etapa (b) del presente método puede ser cualquier sal capaz de proporcionar la rigidez deseada a temperatura seleccionada y concentración de sal, pero preferentemente está compuesta de dos iones que ambos están en el orden más alto de la serie de Hofmeister.

En una realización, el anión de la sal que se añade en la etapa (b) es un sulfato o un fosfato, preferentemente sulfato. En otra realización, el catión de la sal se selecciona a partir del grupo que consiste en Mg; Li; Na; K, y  $\text{NH}_4$ . En una realización ventajosa, el catión de la sal se selecciona a partir del grupo que consiste en Mg y Na. Por tanto, la sal añadida en la etapa (b) puede ser p. ej.  $\text{MgSO}_4$  o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . En una realización ventajosa, la sal es  $\text{MgSO}_4$ .

La sal(es) añadida en la etapa (b) se puede añadir en disolución acuosa o forma sólida. En una realización, la cantidad de sal(es) añadida en la etapa (b) es suficiente para proporcionar una concentración final de la disolución que está en el intervalo de 0,5-1,3 M. En una realización específica, la concentración de sal en la disolución está por debajo de 1,0 M, tal como en el intervalo 0,5-1,0 M, y preferentemente 0,5-0,8 o 0,8-1,0 M. En una realización alternativa, la concentración de sal en la disolución está por encima de 1,0 M, tal como en el intervalo 1,0-1,3 M, y preferentemente 1,0-1,2, p. ej. aproximadamente 1,1 M o 1,2-1,3 M.

La disolución a la que se ha añadido la sal se mantiene a una temperatura incrementada durante un tiempo suficiente para que las propiedades de los polisacáridos cambien hacia las propiedades de flujo mejoradas y rigidez mejorada observado por los presentes inventores, preferentemente con agitado. La duración del tratamiento de sal se determina fácilmente por la persona experta en este campo, y puede p. ej. durar hasta una hora, tal como 20-40 minutos, y ventajosamente durante aproximadamente 30 minutos. Por tanto, la temperatura durante el tratamiento de sal se mantiene en cualquier punto en el intervalo 94-98°C, y se adapta dependiendo de las propiedades deseadas de la matriz. En una realización, la temperatura está en el intervalo de 94-96°C, tal como 94-95°C o 95-96°C, tal como 94, 95 o 96°C. En otra realización, la temperatura está en el intervalo de 96-98°C, tal como 96-97°C o 97-98°C, tal como 97 o 98°C.

En una realización ventajosa, el presente método comprende tratamiento de sal, preferentemente mediante adición de sulfato, tal como  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{MgSO}_4$ , a una temperatura de 96°C.

En una realización más ventajosa, el método comprende tratamiento de sal mediante adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{MgSO}_4$  hasta una concentración de sal en la disolución de 1,0 M, dándose el tratamiento a una temperatura de 96-97°C.

Como se muestra a partir de lo anterior, las partículas de polisacárido se retrocruzan en la etapa posterior a la adición de sal. En una realización preferente, en la etapa (c), la etapa de retrocruzamiento comprende la adición de un agente de retrocruzamiento. El agente de retrocruzamiento puede ser cualquier monómero adecuado o reactivo funcional conocido por polimerizar polisacáridos, tales como epiclorhidrina, divinilsulfona, diepóxidos, diisocianatos, etc. El retrocruzamiento de polisacáridos se conoce bien en este campo, véase p. ej. la patente de EEUU 4.973.683 y EEUU 6.602.990 discutidas anteriormente. Una ventaja del presente método es que permite la fabricación de partículas de polisacárido muy rígidas mediante retrocruzamiento a una temperatura más alta que las técnicas comúnmente usadas, que a cambio reduce o incluso elimina la formación de agregados. Sin desear ser limitante de cualquier teoría específica, se puede asumir que esta característica está relacionada con la adición de sal antes del retrocruzamiento.

En una realización, el presente método comprende una etapa posterior de añadir ligandos de cromatografía a grupos hidroxilo de la matriz de polisacárido retrocruzada. Añadir ligandos por cromatografía, también conocido como funcionalización o a veces derivación, a una matriz insoluble se puede proporcionar por adición de grupos cargados o cargables para preparar una matriz de intercambio de iones; por adición de grupos que muestran afinidad biológica para preparar una matriz de afinidad; por adición de grupos quelantes para hacer una matriz por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC); o por adición de grupos hidrófobos para hacer una matriz por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Alternativamente, grupos conocidos como multimodales, es decir, grupos que contienen más de un grupo, tales como grupos de intercambio de iones además de grupos hidrófobos, se adicionan a la matriz preparada según la invención. En una realización específica, los grupos funcionales son ligandos de intercambio de iones seleccionados a partir del grupo que consiste en amonio cuaternario (Q), dietilaminoetil (DEAE), dietilaminopropil, sulfopropil (SP), y grupos carboximetil (CM). Los métodos para la adición de grupos funcionales a un soporte insoluble tal como una matriz de separación son muy conocidos por la persona experta en este campo y pueden implicar una etapa precedente de alilación del sustituyente y uso de reactivos y condiciones estándar. (Véase p. ej. Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia and Paul K, Smith, Academic Press , INC, 1992). En una realización preferente, la matriz de separación retrocruzada se proporciona con extensores, también conocidos como brazos flexibles, tentáculos, o hueco, antes de la funcionalización. Un extensor muy conocido es dextrano; véase p. ej. la patente de EEUU 6.537.793 donde se describe en más detalle la adición de extensores a una matriz de polisacárido.

La matriz de separación de polisacárido preparada según la invención está comprendida por partículas porosas, esencialmente esféricas. En una realización, las partículas muestran un valor  $K_{av}$  para un dextrano de 110 kDa de al menos aproximadamente 0,4, preferentemente  $>0,5$ . En una realización ventajosa, las partículas se han proporcionado con ligandos de cromatografía. En esta realización, los poros son de un tamaño suficiente para permitir la entrada de las moléculas objetivo que hay que separar, por lo tanto mejora la capacidad de unión de las partículas. Además, el método de preparación descrito anteriormente proporciona una matriz suficientemente rígida para procesado a gran escala. Esta realización es útil para cualquiera de las moléculas objetivo del ejemplo siguiente en el contexto del aspecto de uso, pero es particularmente ventajoso para moléculas objetivo relativamente pequeñas tales como proteínas.

Incluso aunque anteriormente se ha discutido una matriz de separación en la forma de partículas, como comprende la persona experta en este campo, el presente método es igualmente útil para hacer matrices de separación de otros formatos. Por tanto, la matriz de separación según la presente invención se puede preparar de cualquier forma comúnmente usada, tales como monolitos; filtros o membranas; láminas; superficies; capilares; fibras, etc.

Como se ve de lo anterior, el polisacárido se prepara en partículas.

Finalmente, la matriz de separación preparada según se describe anteriormente se puede emplear para cualquier tipo de molécula objetivo tal como una biomolécula o una molécula orgánica aislada, purificada y/o eliminada de un líquido. Por tanto, este aspecto es un método de cromatografía líquida, como se discutió anteriormente, e implica adsorber una molécula objetivo a la matriz y opcionalmente una etapa posterior de desadsorción selectiva del objetivo, comúnmente conocido como elución en gradiente. Si se requiere, se proporcionan una o más etapas de lavado entre adsorción y elución. Alternativamente, el presente uso es para retardar una molécula objetivo, en cuyo caso el objetivo se retarda selectivamente en la columna, comparado con otros componentes. En este caso, no hay necesidad de una etapa de elución.

En una realización del presente uso, un líquido que fluye a al menos aproximadamente 300 cm/h, tal como al menos 400, preferentemente al menos 500 y más preferentemente al menos 700 cm/h, se aplica a una matriz que comprende esencialmente partículas esféricas que muestran un  $K_{av}$  de al menos aproximadamente 0,4 para dextrano de peso molecular de 110 kD.

Como se ve de lo anterior, las moléculas objetivo pueden ser moléculas biológicas, tales como péptidos, proteínas, tales como receptores y anticuerpos monoclonales o policlonales, ácidos nucleicos, tales como ADN, ARN y oligonucleótidos, p. ej. plásmidos, virus, y células procariotas o eucariotas; o moléculas orgánicas, tales como candidatos para medicamentos. En una realización, el candidato para medicamento se puede usar en medicina personalizada. La matriz de separación preparada según la presente invención también es útil para separar moléculas objetivo útiles en la industria alimentaria y de bebidas, tal como purificación de productos alimentarios funcionales y/o la purificación de una bebida a partir de moléculas objetivo contaminantes. Moléculas objetivos muy conocidas en la industria alimentaria son productos de suero, tal como varias proteínas de leche.

### Parte experimental

Los presentes ejemplos se proporcionan solo con propósitos ilustrativos, y no pretenden ser limitantes de la presente invención según se define en las reivindicaciones adjuntas. Todas las referencias que se dan a continuación y en cualquier sitio de la presente especificación se incluyen en la presente memoria como referencia.

Materiales y métodos.

Propiedades de partícula.

Dextranos para evaluación  $K_d$  de prototipos.

Dextrano original	5 mg/ml
M = 196300	10 mg/ml
M = 123600	10 mg/ml
5 M = 66700	10 mg/ml
M = 43500	10 mg/ml
M = 4440	10 mg/ml
M = 1080	10 mg/ml

10 Todos los dextranos diluidos con disolución 0,2 M de NaCl, con excepción del dextrano original que se diluyó en 0,25 M de NaCl.

Prueba de eficacia.

Se llevó a cabo la prueba de eficacia usando un explorador ÄKTA™ (ID 494) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) mediante inyección de disolución de acetona al 1%. Esta prueba da un valor de la calidad del envase de columna. La asimetría aprobada está en el intervalo de 0,75-1,25 y un número de placa >1.000 Nm.

15 Selectividad.

Se llevó a cabo la evaluación  $K_d$  usando un explorador ÄKTA™ (ID 494) equipado con un automuestra A-900. Se conectó un detector RI Shimadzu (RID-10A) al sistema ÄKTA™ para detección de las muestras de dextrano. Se usaron las siguientes condiciones:

Flujo: 0,2 ml/min

20 Fase móvil: 0,2 M NaCl

Bucle de inyección: 100 µm

Evaluación.

Se evaluaron los picos de dextrano según los métodos muy conocidos en este campo. Después se calcularon los valores  $K_d$  como una medida de la superficie de poro disponible como sigue:

$$25 \quad K_d = (V_e - V_o) / (V_c - V_o - \text{matriz gel}) = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

$V_e$  = volumen de retención de dextrano eluido (ml)

$V_o$  = volumen vacío (retención dextrano original) (ml)

$V_c$  = volumen de columna calculado (altura lecho (cm) X superficie área columna (cm<sup>2</sup>)) (ml)

$V_t$  = volumen total líquido (volumen retención NaCl) (ml)

30 Ejemplo 1: síntesis general de partículas de polisacáridos.

Tratamiento de sal: se lavó aproximadamente 1,5 g de Sepharose™ sin retrocruzar (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) con 10 volúmenes de lecho de agua desionizada para proporcionar una suspensión acuosa de partículas de gel de 75%. Después se añadieron las sales según se especifica a continuación para cada prototipo a la suspensión. La mezcla de reacción se calentó a la temperatura especificada a continuación para cada prototipo durante 30 minutos agitando antes de enfriar por debajo de 30°C con baño de hielo. Después se eliminaron las sales en la suspensión mediante lavado del gel con 10 volúmenes de lecho de agua sobre un embudo de vidrio sinterizado.

Retrocruzamiento: se llevó a cabo retrocruzamiento con epíclorhidrina como agente de retrocruzamiento y según Porath (Gel product for separation, 1982, EP 81850244) con 4 veces la epíclorhidrina establecida y NaOH.

40 Funcionalización: para proporcionar un intercambiador de iones, se añadieron grupos de amonio cuaternario (grupos Q) a las partículas retrocruzadas según métodos muy conocidos. Se llevó a cabo titulación de Cl<sup>-</sup> con AgNO<sub>3</sub> 0,1 M después de la adición para medir la cantidad de grupos Q funcionales.

Envase columna: las partículas envasadas según se describió anteriormente se envasaron en columnas HR 5/20 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) con agua desionizada como líquido de envasado. Las columnas primero se

## ES 2 608 638 T3

llenaron a una velocidad de flujo de 306 cm/h durante aproximadamente 15 minutos y después a una velocidad de flujo de 764 cm/h durante aproximadamente 15 minutos. El envase de columna se ensayó por medición de la asimetría punta después de inyectar 25 µl de acetona al 0,4% a una velocidad de flujo de 76 cm/h. Las columnas con asimetría punta entre 0,8 y 1,8 se consideraron aceptables en este estudio.

5 Ejemplos 2-4: prototipos de partículas.

Comenzando con matrices de Sepharose comercialmente disponibles, se prepararon prototipos según se describió anteriormente con variación de sales, tiempos de tratamiento y duraciones. Los resultados se señalan en las siguientes tablas.

Ejemplos 5-6: ejemplos comparativos de partículas.

10 Se realizaron dos ejemplos comparativos, ensayando las dos matrices de Sepharose™ usadas como materiales de inicio en los ejemplos 2-4 anteriores pero omitiendo la etapa de tratamiento de sal.

Resultados.

Tabla 1: velocidad de flujo.

Prototipo	Matriz base	Tratamiento de sal M(mol/litro partículas en suspensión)	Temp. Máxima (°C)	Diámetro de partículas (Malvern, d50 <sub>v</sub> ) (µm)	Velocidad de flujo (max) (ml/min)
Ej. 2 U1262069	Sepharose™ 4B	MgSO <sub>4</sub> 0,35 M + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	96,8	58	34,5
Ej. 3 U1262073	Sepharose™ 6B	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,3 M	96,7	76	32,5
Ej. 4 U1262074	Sepharose™ 6B	MgSO <sub>4</sub> 0,5 M + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	96,9	55	85
Ej. 5 comparativo U1262066	Sepharose™ 4B	-	-	83	6
Ej. 6 comparativo U1262067	Sepharose™ 6B	-	-	89	10

15 Tabla 2: prueba de eficacia.

Prototipo	Asimetría	Número de placa (Nm)
Ej. 2 U1262069	1,00	1609
Ej. 3 U1262073	0,77	2520
Ej. 4 U1262074	1,26	1489
Ej. 5 comparativo U1262066	0,75	2281
Ej. 6 comparativo U1262067	0,49**	886**

\*asimetría aceptable para el propósito presente

\*\*incluso después de repetir este envasado 4 veces, todavía no cumplía los criterios establecidos en la presente prueba.

Tabla 3: superficie de poro disponible.

Prototipo	Matriz base	Velocidad de flujo (max) (ml/min)	Diámetro de partículas (Malvern, d50 <sub>v</sub> ) (µm) 110000)
Ej. 2 U1262069	Sepharose™ 4B	34,5	0,67
Ej. 3 U1262073	Sepharose™ 6B	32,5	0,59
Ej. 4 U1262074	Sepharose™ 6B	85	0,10
Ej. 5 comparativo U1262066	Sepharose™ 4B	6	0,65
Ej. 6 comparativo U1262067	Sepharose™ 6B	10	0,46

Ejemplos 7-10: tratamiento de sal de membranas.

5 Ejemplo 7: impregnación de membrana en disolución de agarosa – Membrana A.

Se preparó una disolución de agarosa al 1% disolviendo 0,3 g de agarosa en 30 ml de agua a 95°C durante 3 h. Después una membrana de celulosa regenerada (Sartorius, 0,45 µm, producto nº 3S18406-047N) se sumergió en la disolución de agarosa durante 1 h a 95°C. Después la membrana se eliminó de la disolución de agarosa y se dejó enfriar a temperatura ambiente de modo que la agarosa podía gelificar en la estructura de membrana.

10 Ejemplo 8: tratamiento de membrana en la disolución de sal – Membrana B.

La membrana híbrida A preparada según se describe en el ejemplo 7 se sumergió en sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (disolución 1M) (50 ml) a 96°C durante 1 h y después se eliminó de la disolución y se dejó enfriar. La membrana se lavó extensamente con agua.

Ejemplo 9: medición de la capacidad de flujo de membrana.

15 Se puso un trozo de membrana preparada y tratada según se describió anteriormente en un embudo de filtro de diámetro 15 mm y se aplicó vacío de 0,7 bar. Se vertió 50 ml de agua en el embudo y se inició un cronómetro. Se registró el tiempo hasta que todo el agua pasó por la membrana. Se realizó el análisis por triplicado.

Se calculó el flujo en ml por centímetro cuadrado y minutos.

Ejemplo 10: resultados de la capacidad de flujo de membrana.

Membrana	Disolución de agarosa (%)	Tratamiento de sal	Flujo (ml/min/cm <sup>2</sup> )
Referencia	-	-	21,8
Membrana A	1	No	2,1
Membrana B	1	Si	18,7

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar un matriz de separación, cuyo método comprende:
  - (a) proporcionar una suspensión acuosa de partículas comprendida por un polisacárido nativo gelificado;
  - (b) tratamiento de sal de las partículas suspendidas por adición de al menos una sal; y
  - (c) retrocruzamiento de las partículas tratadas con sal,

5 En la que la sal(es) se añade hasta una concentración de sal en la suspensión en el intervalo de 0,5 a 1,3 M y en el que la temperatura durante el tratamiento de sal está en el intervalo de 94-98°C.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el polisacárido es agarosa.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anión de la sal añadida en la  
10 etapa (b) es un sulfato.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el catión de la sal se selecciona del grupo que consiste en Mg; Na; K; Li; y Cu.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que el catión de la sal se selecciona a partir del grupo que  
15 consiste en Mg y Na.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la sal es MgSO<sub>4</sub>.
7. Un método según la reivindicación 1, en el que la temperatura durante el tratamiento de sal es 96°C.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas de polisacárido  
de la etapa (a) se han preparado por emulsión en un disolvente orgánico.
9. Un método según la reivindicación 8, en el que las partículas se lavan después de la emulsión.
- 20 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (c), la etapa de retrocruzamiento comprende la adición de un agente de retrocruzamiento.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa posterior de  
adicionar ligandos de cromatografía a grupos hidroxilo del polisacárido gelificado.